

# Kolorektal kanserde anjiyogenez ve anti-anjiyogenik tedaviler

## Angiogenesis and anti-angiogenic treatments in colorectal cancer

Sedef Hande AKTAŞ, Hakan AKBULUT

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı, Ankara

Kanserde anjiyogenez hastalığın ilerlemesinde son derece önemli bir süreçtir. Anjiyogenezi baskılayarak tümörlerin gerilemesini sağlamaya yönelik tedavi yaklaşımları üzerinde uzun zamandan beri araştırmalar devam etmektedir. Kolorektal kanserli hastalarda gerek tekli tedavi (monoterapi) ya da kemoterapi tedavisine ek olarak verilen monoklonal antikörlerin gerekse tirozin kinaz inhibitörlerinin sağkalımı artırdığı bilinmektedir. Bu hedefe yönelik tedavilerin anlaşılması ve geliştirilmesi son derece önem arz etmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Anjiyogenez; anti-anjiyogenik tedavi; anti-anjiyogenik tedavi direnci; kolorektal kanser; tirozin kinaz inhibitörü.

Angiogenesis is extremely important in cancer progression. The therapeutic approaches that target regression of tumors through suppression of angiogenesis have been under investigation for a long time. In addition to chemotherapy, monotherapy as well as monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors increase the survival of patients with colorectal cancer. Considering this point of view, understanding the intrinsic molecular mechanisms will afford great opportunity to develop targeted therapies to combat colorectal cancer.

**Key words:** Angiogenesis; anti-angiogenic treatment; resistance to anti-angiogenic treatment; colorectal cancer; tyrosine kinase inhibitors.

Kolorektal kanserler gelişmiş ülkelerde önemli bir sağlık sorunudur. Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı 2008 yılı istatistiklerine göre erkeklerde dördüncü (insidansı yüzbinde 20.8) kadınlarda ise üçüncü (insidansı yüzbinde 13.2) en sık görülen kanser türüdür.<sup>[1]</sup> Erken evrelerde tanı alan hastalarda şifa oranları %40-90 arasında değişmektedir. Son yıllarda özellikle cerrahi tekniklerde ve adjuvan tedavilerdeki gelişmeler kolorektal kanserlerde şifa oranlarını artırmıştır. Fakat yine de tüm bu gelişmelere karşın tanı konulan hastaların yaklaşık yarısı bu hastalıktan kaybedilmektedir.

Kanserde anjiyogenez hastalığın ilerlemesinde son derece önemli bir süreçtir. Anjiyogenezi baskılayarak tümörlerin gerilemesini sağlamaya yönelik tedavi yaklaşımları üzerinde uzun zamandan beri araştırmalar devam etmektedir. Anjiyogenezde

anahtar rol oynayan vasküler endotelial büyüme faktörü'ne (VEGF) karşı geliştirilen monoklonal antikör (bevasizumab) ile VEGF ve plasental büyüme faktörü (PlGF) bağlayan ziv-aflibercept kolorektal kanserli hastalarda kemoterapi ile birlikte kullanıldığında sağkalım sürelerinde anlamlı bir artış sağlamıştır. Yine VEGF yolağında yer alan bir çok molekülün tirozin kinaz aktivitesini inhibe eden regorafenib tek başına kullanıldığında kolorektal kanserli hastalarda etkili olduğu gösterilmiştir.

### Anjiyogenez ve Kanser

Tümör hücreleri karsinojenik etkiyle malin potansiyel kazanıp kontrolsüz çoğalmaya başlayana kadar oldukça uzun ve sessiz bir dönem geçirirler. Bu dönemden sonra özellikle damarlanmayla birlikte tümörlerde hızlı bir progresyon dönemi

başlar. Tümör hücreleri kapiller damarlar etrafında oksijenin diffüzyon mesafesi olan 200-300 mikron mesafeye kadar dizilirler. Buldukları dokuda yeni damar oluşumuna gerek duymadan ancak 2-3 mm büyüklüğe kadar ulaşabilirler.<sup>[2]</sup> Daha fazla büyüebilmeleri için yeni damar oluşumuna (anjiogenez) gereksinim vardır. Yeni damar gelişimi olmayan tümörler asemptomatik lezyonlar olarak kalır. Tümörler çok sayıda anjiyojenik faktör (epidermal büyüme faktörü; EGF, fibroblast büyüme faktörü-1, -2, -3, -4; FGF-1, -2, -3, -4, granülosit koloni uyarıcı faktör; G-CSF, interlökin-8; IL-8, hepatosit büyüme faktörü; HGF, transforme edici büyüme faktör-a, -b; TGF-a, -b, vasküler-endothelial büyüme faktörü; VEGF gibi) salgılar ve bunların çoğu komşu küçük damarlara diffüze olarak endotel hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlanır ve sonuçta yeni damar oluşumu ile sonuçlanacak olaylar dizisini aktive ederler.<sup>[2,3]</sup> Endotel hücre aktivasyonunun yanı sıra tümör hücreleri<sup>[2]</sup> matrisi eritici enzimleri ile endotel hücrelerinin invazyonunu kolaylaştırır,<sup>[3]</sup> salgıladıkları bir takım kemotaktik faktörlerle ilave anjiyojenik faktör salgılayabilecek olan makrofajları ve mast hücrelerinin kendilerine çekerler ve<sup>[4]</sup> stromadaki fibroblastları proanjiyojenik moleküller yapmalarını uyarmak suretiyle de anjiyogenezi hızlandırır.<sup>[4]</sup>

Normal hücreler anjiyojenik değildirler çünkü normalde az miktarda anjiyogenetik faktör salgılayabilirken daha fazla miktarlarda anjiyogenez inhibitörleri (anjiostatin, interferonlar, interlökin 1, 12, retinoik asit, protamin, platelet faktör 4; PF4, trombospondin; TSP-1, doku metalloproteinaz inhibitörü; TIMP gibi) salgırlar. Dolayısıyla normal bir hücrenin malin transformasyona uğrarken aynı zamanda anjiyojenik fenotip de kazanması da gerekmektedir. Anjiyogenez olayında önemli rol oynayan endotel hücreleri ise salgıladıkları bazı büyüme faktörleri (ör. Bazik fibroblast büyüme faktörü; bFGF, granülosit-stimüle edici faktör; G-CSF, platelet-kaynaklı büyüme faktörü, PDGF, insülin-benzeri büyüme faktörü; IGF, heparin-bağlayıcı epidermal büyüme faktörü benzeri büyüme faktörü gibi) vasıtasıyla kendi aktivasyonlarını artırırken aynı zamanda bu faktörler tümör hücreleri için de parakrin büyüme faktörleri olarak rol oynar. Malin transformasyonda anjiyojenik özelliklerin

kazanılmasında pek çok hücrede onkogenler rol oynamaktadır. Onkogenlerin en belirgin etkisi tümör hücrelerinde anjiyogenetik faktörlerin yapımlarını ve salgılanmalarını uyarmalarıdır (ör. H-ras – G-CSF, IGF-1, VEGF, N-ras – TNF-a, G-CSF, v-src – VEGF gibi).<sup>[5,6]</sup>

Endotel hücrelerinin aktivasyonunda esas rolü oynayan faktör VEGF'dir. VEGF molekül ailesi ligandları (VEGF-A (VEGF), VEGF-B, -C, -D, -E ve plasental büyüme faktörü (PIGF)-1 ve -2'nin damar ve lenfatiklerdeki endotel hücreleri üzerinde bulunan reseptörlerine bağlanırlar. Reseptör tirozin kinaz grubunda yer alan ve VEGF ligandlarını bağlayan başlıca üç tane VEGF reseptörü tanımlanmıştır. VEGFR-1 (Flt-1) endotel hücreleri ile bazı tümör hücrelerinde eksprese edilir ve esas olarak VEGF nin endotel migrasyonunu uyarıcı etkisine aracılık eder. VEGFR-2 (KDR, FLK-1) endotel hücreleri, primitif hematopoietik kök hücreler ve bazı tümör hücreleri ile az sayıda erişkin hücrede eksprese edilir ve VEGF ligandlarının (VEGF, VEGF-C ve VEGF-D) endotel hücrelerinin proliferasyonu, sağ kalımı ve damar geçirgenliği etkilerine aracılık eder. VEGFR-3 (Flt-4) esas olarak VEGF-C ve VEGF-D'yi bağlar, lenfatik ve tümör endotel hücrelerinde eksprese edilir ve lenfanjiyogenezin gelişmesinden sorumludur. Tümör anjiyogenezinde başlıca sorumlu VEGFR-2 aracılı sinyal iletim yoludur. VEGFR-2 nin bloke edilmesi hücre proliferasyonu, migrasyonu ve sağkalımını ve damar permeabilitesini azalttığı bilinmektedir VEGFR-1 (Flt-1) in tümör anjiyogenezinin yanı sıra tümör hücrelerinin proliferasyonu, invazyonu ve metastazında da rol oynaması nedeniyle kanser tedavisinde önemli hedefler arasında yer almaktadır.<sup>[7]</sup>

Nitrik oksit anjiyogenez sürecinde önemli rol oynadığı uzun zamandır bilinmektedir.<sup>[8,9]</sup> Nitrik oksit VEGFR1 tarafından uyarılan bir aracı molekül olduğu bilinmektedir. Ayrıca VEGFR2 de NO'yu uyararak endotel hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Proanjiyojenik moleküllerden bFGF, angiopoietin1 ve anjiyopoetin bağlantılı peptid1, yine endotel hücrelerinde salgılanan endothelial nitrik oksit sentetazı (eNOS, NOS3) aktive ederek NO yapımını artırır ve anjiyogenezi uyarır.<sup>[10,11]</sup>

**Tablo 1**NCCN kılavuzunda (Version 1, 2014) anti-anjiyogenik ilaçların kolorektal kanserli hastalarda kullanımı ile ilgili öneriler<sup>[54]</sup>

Yoğun kemoterapiye uygun hastalarda birinci basamak tedavide	İkinci basamak tedavide	Üçüncü basamak tedavi önerileri
FOLFOX ya da CapeOX +/- bevasizumab FOLFOX +/- panitumumab*	FOLFIRI ± ziv-aflibercept Irinotekan±ziv-aflibercept	Regorafenib Setuksimab**/ panitumumab**
FOLFIRI +/- bevasizumab	FOLFIRI ± setuksimab**/ Panitumumab**	
FOLFIRI +/- cetuximab ya da panitumumab* 5-FU/LV ya da capecitabine +/- bevasizumab FOLFOXIRI +/- bevasizumab	Csetuxksimab**/Panitumumab**	
Yoğun kemoterapiye uygun OLMAYAN hastalarda birinci basamak tedavide 5-FU/LV ya da capecitabine +/- bevasizumab Panitumumab*/Setuksimab*		

\*Sadece K-ras yabanıl tip; \*\*KRAS yabanıl tip ve daha önceki basamaklarda bu ilaçları almadi ise.

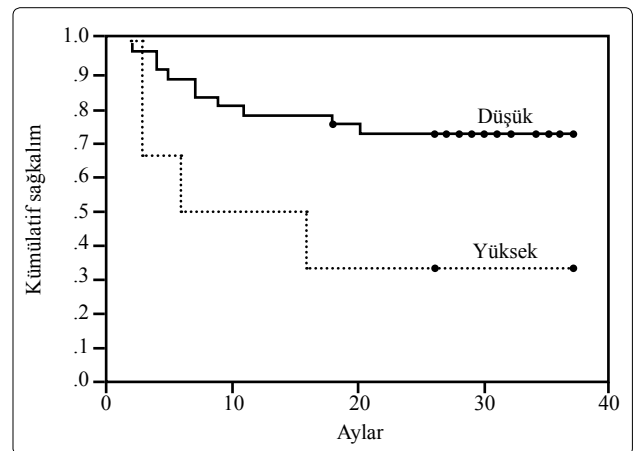
NO bu etkisini çözünür guanil siklaz ve cGMP yolağındaki molekülleri aktive ederek gösterir. Potent endojen anjiyogenez inhibitörleri olan trombospondin-1 ve 2 (TSP1 ve TSP2) CD36 ve CD47 reseptörleri aracılığıyla NO'nun endotel hücreleri ve düz kas hücreleri üzerindeki etkilerini antagonize eder.<sup>[12,13]</sup> Nitrik oksit yolağı ve özellikle NOS3 tümör anjiyogenezinde önemli bir hedef haline gelmiştir. Daha önce yaptığımız bir çalışmada kolorektal kanserli hastalarda NO ile hastalığın klinik evresi arasında bir ilişki olduğunu ve özellikle tümör yüküne paralel olarak VEGF ve bFGF düzeylerini de içeren bir anjiyogenez indeksinin hastalığın prognozunu belirlemede anlamlı olabileceğini göstermiştik (Şekil 1).<sup>[14]</sup> Söz konusu çalışmamızda, o dönemde henüz endikasyonu olmadığı için, hastalar anti-anjiyogenik tedavi almamışlardı.

### Biyobelirteç Olarak Anjiyogenez

Solid tümörlerde anjiyogenezin prognostik rolü son yıllarda geniş bir şekilde araştırılmıştır. Özellikle anti-anjiyogenik tedavi modalitelerinin rutin tedaviye girmesi ile birlikte bunların etkinliğini önceden belirleyebilecek biyomarker çalışmaları da hız kazanmıştır. Anjiyogenezde anahtar rol oynayan VEGF ile ilgili çalışmalar bu faktörün kan düzeylerinin prognostik rolü konusunda çelişkili sonuçlar ortaya koymuştur.<sup>[15,16]</sup> Genellikle tümör

yükü fazla olan hastalarda VEGF düzeyleri daha yüksek bulunmakla birlikte bunun bağımsız bir prognostik faktör olabileceği yönünde güçlü veriler bulunmamaktadır. Ayrıca serum VEGF düzeyleri ile anti-VEGF antikor (bevasizumab) tedavisinin etkinliği arasında da anlamlı bir bağlantı da ortaya konamamıştır.<sup>[17]</sup>

Pek çok çalışmada dolaşımdaki anjiyogenetik faktörlerin anti-anjiyogenik tedavi etkinliğini be-



**Şekil 1.** Erken evre kolon kanserli hastalarda anjiyogenez indeksinin prognostik rolü. Düşük AI sahip hastaların yüksek AI sahip hastalara göre daha anlamlı sağkalımını gösteren ortalama DFS ve iki yıllık DFS oranı (AI) (p=0.021) ve p=0.039.<sup>[14]</sup>

lirlemedeki rolü araştırılmıştır. VEGFA düzeyleri ile prognoz arasında birçok tümör tipinde ilişki gösterilirken, tedavi yanıtı ile bir ilişkisi gösterilememiştir.<sup>[18-20]</sup> Vücuttaki toplam VEGF-A düzeyinde, tümörlerin katkısı çok net olmadığı için plazma VEGF düzeyleri ile yapılan çalışmalar tedavi etkinliğini değerlendirmede genellikle yetersiz kalmaktadır. Bu çalışmalarda daha çok VEGF'nin 165 aa lik uzun izoformları çalışılmıştır. Sadece VEGF-A'nın kısa izoformunun plazmada ELISA ile ölçümünün sınırlı yararı gösterilmiştir. VEGFA'nın kısa izoformları özellikle heparan sülfat proteoglikanlara bağlanmadan daha uzun mesafelere diffüze olabilmektedir. Kısa izoformları ile yapılan çalışmalarda VEGF121'in anti-anjiyojenik tedavi yanıtını belirlemede yararlı olabileceğini gösteren çalışmalar vardır.<sup>[21,22]</sup> Bevasizumab direncinde bağlı olmayan-VEGF'nin rolü olduğu düşünülmele birlikte bu konu çok net değildir. Fakat bu ilişki başta kolorektal kanser olmak üzere bazı tümörlerde ise gösterilememiştir.

Bevasizumab tedavisinin ayrıca PlGF düzeylerinde artışa yol açtığı ve artış izlenen hastalarda yanıtın daha iyi olduğu gösterilmiştir.<sup>[23]</sup> Glioblastomalı hastalarda anti-anjiyojenik TKI ajan olan sediranib ile yapılan bir çalışmada PlGF ve basic FGF yanıt ile ilişkisi gösterilmiştir.<sup>[24]</sup>

Akciğer kanserli hastalarda TKI- olan pazopanib ile yapılan bir başka çalışmada çok sayıda anjiyojenik faktörün prognostik ve prediktif değeri araştırılmış bunlardan sadece sVEGFR2 ve IL-4 ün tedavi cevabı ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur.<sup>[25]</sup>

VEGFR1 hücre içine sinyalleri ileterek ya da VEGFR2'nin transfosforilasyonunu dolaylı olarak artırarak tümör anjiyogenezini uyarır.<sup>[26]</sup> Dokularda bulunan sVEGFR1 tümörden kaynaklanan VEGF-A'yı bağlayıp ekstraselüler matriksde tutarak bunların bevasizumab tarafından nötralize edilmesini engelleyebilmektedir. Dolayısıyla VEGFR1 ifadesindeki artış ilaç direncinde etkili faktörlerden biri olabilmektedir.<sup>[27]</sup>

NRP1 ve VEGF-A arasındaki bağlantıyı bloke eden antikolar tümör gelişimini yavaşlatmaktadır.<sup>[28]</sup> Anti-NRP1 ve anti-VEGFA antikolarının kom-

bine kullanılması ise farelerde tümör damarlanmasını belirgin azaltmış ve tedavi etkinliğini belirgin olarak artırmıştır.<sup>[29]</sup> VEGFa'nın ayrıca nöropilinlerin aracılığıyla kanser kök hücrelerini uyurabileceği gösterilmiştir.<sup>[30]</sup>

Anti-anjiyogenez tedavi etkinliğini değerlendirmede genetik değişikliklerin de rolü incelenmiştir. Özellikle endotel hücrelerinin bu ilaçlara cevabını belirlemede bazı SNP lerin rolü olabileceği ortaya konmuştur. Örneğin meme kanserli hastalarda VEGFA ile ilişkili rs699947 ve rs1570360 mutant taşıyıcılarında bevasizumab alan kolda genel sağkalım daha iyi bulunmuştur.<sup>[31]</sup> Kolorektal kanserli hastalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur.<sup>[32]</sup> Fakat gerek meme gerekse kolorektal kanserli hastalarda sağkalım açısından anlamlı fark bulunurken bevasizumab yanıtı ile bir ilişki gösterilememiştir. Başta VEGF reseptörleri olmak üzere IL-8 ve CXCR2 vb kemokinler dahil diğer anjiyojenik faktörlerle ilgili SNP analizlerinde değişik sonuçlar elde edilmiştir. Henüz genel kabul görmüş ve tüm tümör gruplarında anti-anjiyofenik tedavi etkinliğini belirlemede kullanılabilecek bir genetik faktör tanımlanamamıştır. Başta bevasizumab olmak üzere TKI anjiyogenez inhibitörleri ile yapılan klinik çalışmalarda bu konuda biyomarker bulma çalışmaları devam etmektedir.

Kolorektal kanserli hastalarda VEGFA geni amplifikasyonunun kötü bir prognostik faktör olduğu gösterilmiş olmakla birlikte randomize çalışmalarda bu net olarak ortaya konamamıştır.<sup>[33]</sup> ECOG2100 randomize meme kanseri çalışmasında VEGFA gen amplifikasyonunun tek-değişkenli analizinde sağkalım ve progresyonsuz yaşam açısından anlamlı olduğu bulunurken çok değişkenli analizde anlamlı bulunmamıştır.<sup>[34]</sup> Yakın zamanda yapılan bir çalışmada dokularda VEGF-bağımlı genler (VVG) olarak adlandırılacak VEGF sinyal yolağında bulunan genlerin mikrodizin analizi ile incelenmesi fare tümör modellerinde ve yine klinik çalışmalardan elde edilen hasta doku örneklerinde bu genlerin ifadesinin arttığı olgularda anti-VEGF tedavilerden yarar görebileceği gösterilmiştir.<sup>[35]</sup>

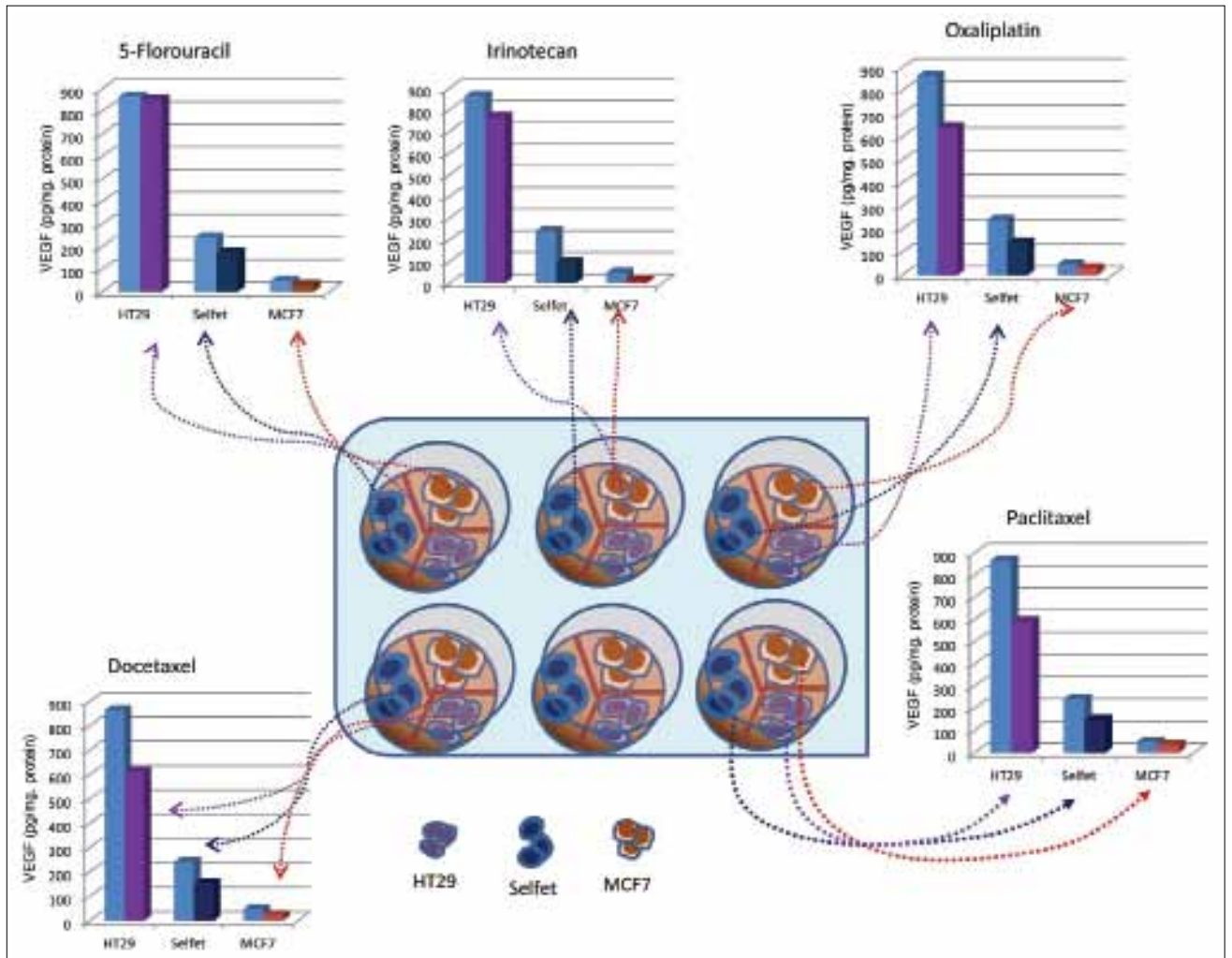
2013 yılındaki bir araştırma bevasizumabın kemoterapi ile birlikte kullanıldığında karşılaşılan en sık yan etkilerinden olan ve bu etkideki mekaniz-

ması tam olarak anlaşılmayan arteriyal hipertansiyonun hastalığın sağkalım ve cevap açısından anlamlı bir prognostik faktör olabileceğini ifade etmektedir.<sup>[36]</sup>

### Kemoterapi ve Anjiyogenez

Kemoterapi ilaçları genellikle tümör hücrelerine maksimum sitotoksikite gösteren maksimum tolere edilebilir dozlarda kullanılmaktadır. Sitotoksik ilaçlar tümör hücrelerinin yanı sıra endotel hücrelerinde de apoptozu artırmakta ve hatta dolaşımdaki endotel hücresi sayısını azaltmaktadır.<sup>[37]</sup> Kolon kanseri tedavisinde kullanılan irinotekan, okzaliplatin ve fluorourasilin anjiyogenez üzerindeki etkileri le ilgili farklı sonuçlar bildirilmiştir. Örneğin irinotekanın TSP-1 ekspresyonunu uyararak en-

dotel hücre proliferasyonunu ve tümör dokusunda mikrodamar yoğunluğunu azalttığı gösterilmiştir.<sup>[38,39]</sup> Buna karşılık okzaliplatin ve 5-fluorourasilin doza bağımlı olmak üzere tümör hücre hatlarında VEGF ekspresyonu üzerinde farklı etkileri olabileceği gösterilmiştir.<sup>[40,41]</sup> Okzaliplatin ve 5-FU özellikle düşük dozlarda hem anti-anjiyogenik ve hem de anti-tümöral etkinlik gösterebilmektedir.<sup>[42]</sup> Tümör hücre hatlarında yakın zamanda yaptığımız bir çalışmada irinotekan ve okzaliplatinin metronomik dozlarda uygulandığında kolon kanseri hücrelerinde VEGF sekresyonunu baskıladığını gösterdik.<sup>[43]</sup> Bu dozlarda irinotekan ve okzaliplatinin bevasizumab ve diğer anti-anjiyogenik ilaçlarla kombine edilerek klinik çalışmalarda test edilmesi gerekmektedir.



Şekil 2. Bazı kemoterapötik ilaçların VEGF sekresyonuna etkisi.<sup>[43]</sup> (Bu şekil “World Biomedical Frontiers 2013” de yayınlanan çalışma özetinde yer almış olup 43 no.lu kaynak makedalede yer almamaktadır).

## Kolorektal Kanserlerde Güncel Tedavi Seçenekleri

Hastalığın seyrini belirleyen en önemli prognostik parametre günümüzde hala hastalık evresidir. Metastatik hastalık evresinde ise hastaların performansı ve hastalık yaygınlığı önemli prognostik parametreler olarak göze çarpmaktadır.<sup>[44]</sup> Bu parametreler özellikle sitotoksik kemoterapinin uygulanabileceği hastaları seçmek açısından önemlidir.

Metastatik kolorektal kanserli hastalarda kemoterapi yaşam süresini önemli ölçüde uzatmaktadır. Kemoterapi uygulanmayan hastalarda medyan sağkalım süresi altı-yedi ay civarında iken 5-fluorourasil ile tek ajan olarak tedavi uygulananlarda bu süre üç-altı ay arasında uzamaktadır. Bu hastaların tedavisinde uzun yıllar tek başına 5-fluorourasil kullanılmıştır. 1990'lı yılların sonlarına doğru klinik kullanıma giren okzaliptatin ve irinotekan ile 5-fluorourasil ve daha sonraları geliştirilen oral 5-FU preparatları (kapesitabin vb) kombinasyonları standart tedavi seçenekleri arasına girmiştir. İrinotekan ve okzaliptatinin 5-FU ile kombinasyonlarında (FOLFOX, FOLFIRI) yanıt oranları %40-50'ye ve ortalama sağkalım oranları ise 15-18 aya kadar çıkmıştır.<sup>[45,46]</sup>

Kanserde anjiyogenez hastalığın ilerlemesinde son derece önemli bir süreçtir. Anjiyogenezi baskılayarak tümörlerin gerilemesini sağlamaya yönelik tedavi yaklaşımları üzerinde uzun zamandan beri araştırmalar devam etmektedir. Anjiyogenezde anahtar rol oynayan vasküler endotelial büyüme faktörü'ne (VEGF) karşı geliştirilen monoklonal antikör (bevasizumab) kolorektal kanserli hastalarda kemoterapi ile birlikte kullanıldığında sağkalım sürelerinde anlamlı bir artış sağlamıştır. Klinik etkinliğinin randomize çalışmalarda da gösterilmesi ile bevasizumab, kolorektal kanserli hastalarda kemoterapi ile birlikte kullanılmak üzere ruhsat almıştır. Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı, birinci basamak tedavide kemoterapi ile kombine olarak kullanılmasına ruhsat vermiştir.

Metastatik hastalıkta sitotoksik kemoterapinin yanı sıra bevasizumab (anti-VEGF antikoru), setüksimab (anti-EGFR antikoru), panitumumab

(anti-EGFR antikoru) gibi monoklonal antikörler da rutin tedaviye girmiştir. Anti-anjiyogenik bir ajan olan bevasizumab metastatik kolorektal kanserli hastalarda sitotoksik kemoterapiye eklendiğinde sağkalım oranlarını anlamlı oranda uzatmıştır.<sup>[47]</sup> Yine ikinci ve üçüncü basamak tedavi seçenekleri olarak kullanıldığında anjiyogenez yollarını hedefleyen regorafenib (VEGFR2 ve TIE2 tirozin kinaz inhibitörü) ve VEGF-A, VEGF-B ve PlGF ü bağlayan bir füzyon proteini olan aflibercept de sağkalımda artış sağlamıştır.

Bu ilaçların sağkalım artışı istatistiksel olarak anlamlı olsa da hastaların önemli bir kısmı da (yaklaşık %50-60) yarar görmemektedir. Vasküler komplikasyonları ve tedavi maliyetleri düşünüldüğünde hastaların hemen hemen yarısından fazlasında hiçbir yarar beklenmemesine rağmen tedavi toksisitesine maruz kalmakta ve ülke ekonomisine de yük getirmektedir. Anti-anjiyogenik tedavilerden yarar görebilecek hastaların önceden belirlenebilmesi bu açıdan büyük önem taşımaktadır.

## Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Kolorektal Kanserde Kullanımı

Tirozin kinaz inhibitörleri (TKI), sinyal iletim kaskadı ile pek çok proteinin aktive edilmesinden sorumlu bir enzim ailesi olan tirozin kinazları inhibe ederek işlev gösteren küçük molekülü ilaçlardır. Klinikte kullanılan tüm tirozin kinaz inhibitörleri, ilgili hedef protein tirozin kinazların ATP bağlama bölgesine bağlanarak etki gösterir. Bilinen VEGF reseptörlerinde ortak bir mekanizma olarak tirozin kinaz aktivitesi bulunması nedeniyle TKI'nın anjiyogenezin hedeflenmesinde de kullanılması söz konusu olmuştur. Bu inhibitörler kullanıldığında hücre iletişimi ve çoğalması yavaşlamakta ve tümör çoğalmasının durması ile sonuçlanan kanserli hücre çoğalması azalmaktadır. Sonuçta apoptoz uyarılmakta ve anjiyogenez süreci kırılmaktadır. Böylece kanserli hücreler yıkıma uğratılarak ve tümörün gelişimine zemin hazırlayan anjiyogenez süreci kırılarak tümörün gelişimi önlenmiş olmaktadır. Özetle; bu inhibitörler kanser hücrelerinde tümör kitlesinin küçülmesini sağlayarak spesifik etkilere sahip olan hedefli terapiler olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak başka birçok hücre reseptör sinyal yollarında da tirozin kinaz aktivitesine

sahip proteinler yer aldığı için TKI kullanımının istenmeyen yan etkileri de mevcuttur. Bu ilaçların kullanımı ile ilgili olarak sıklıkla izlenen yan etkiler; hipertansiyon, proteinüri ve hemoraji şeklindedir. Ancak genelde bu yan etkiler tolere edilebilecek düzeylerde kalmakta olup nadiren ilaç kesilmesini ya da doz azaltılmasını gerektirmektedir.

Regorafenib 2012 yılında metastatik kolorektal kanser tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı alan ve oral olarak kullanılan bir tirozin kinaz inhibitörüdür. VEGF inhibitörü ve antineoplastik kategorisinde yer almaktadır. Daha önce fluoropirimidin, oxaliplatin ve irinotekan temelli kemoterapi, anti-VEGF terapi ve KRAS yabancıl tip varsa anti EGFR terapi almış olan hastalarda kullanılmak üzere endikasyon almıştır. Kolorektal kanserde rutin tedavide onaylanmış tek tirozin kinaz inhibitörü olan regorafenib çoklu bir tirozin kinaz inhibitörü olup hedeflediği moleküller başlıca RET, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, KIT, PDGFR-alpha, PDGFR-beta, FGFR1, FGFR2, TIE2, DDR2, TrkA, Eph2A, RAF-1, BRAF, BRAFV600E, SAPK2, PTK5 ve Abl'dir. Regorafenib FDA endikasyonu dışında

kolorektal kanserde birinci basamak tedavide kemoterapi ile kombine olarak kullanılmakta ve adjuvant kullanımına ilişkin klinik çalışmalar halen devam etmektedir.

### Kolorektal Kansere Tedavisinde Kemoterapi ve Anti-Anjiyogenik Tedavide Güncel Durum

Anti anjiyogenez tedavisinde kullanılan ilaçlar başlıca iki ana kategori altında incelenebilir;

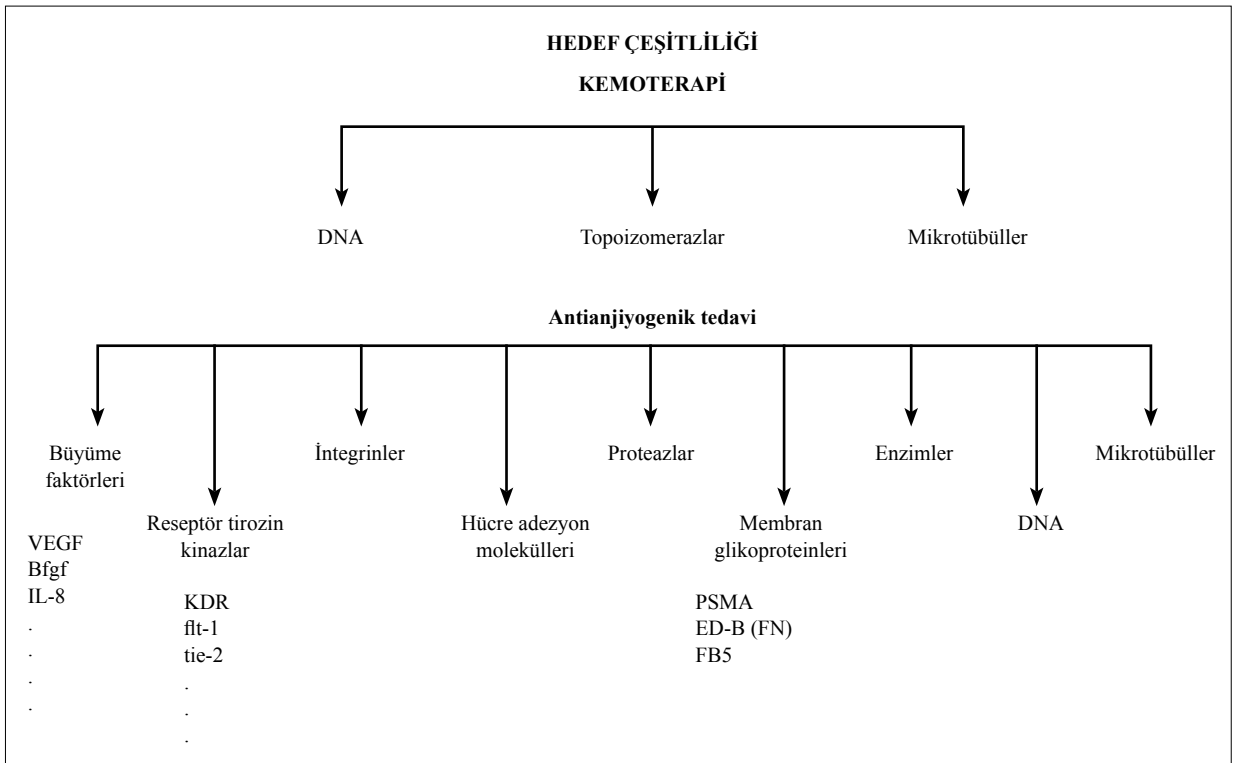
1- Hücreler arasındaki sinyalleri etkileyen ilaçlar.

a. Vasküler endotelial büyüme faktörünü bloke eden ilaçlar

b. Plasental büyüme faktörünü bloke eden ilaçlar

2- Hücre içi sinyal iletimini bloke eden ilaçlar.

Vasküler endotelial büyüme faktörünü bloke eden ilaçlara örnek olarak bevasizumab ve ziv-aflibercept verilebilir. Bevasizumab rekombinant humanize monoklonal IgG1 antikorudur. İnsan VEGF'nin biyolojik aktivitesini inhibe eder. İnsan IgG1 molekülünün iskeletini ve VEGF'nin bağlandığı kısımlarında fare antikoruna ait komple-

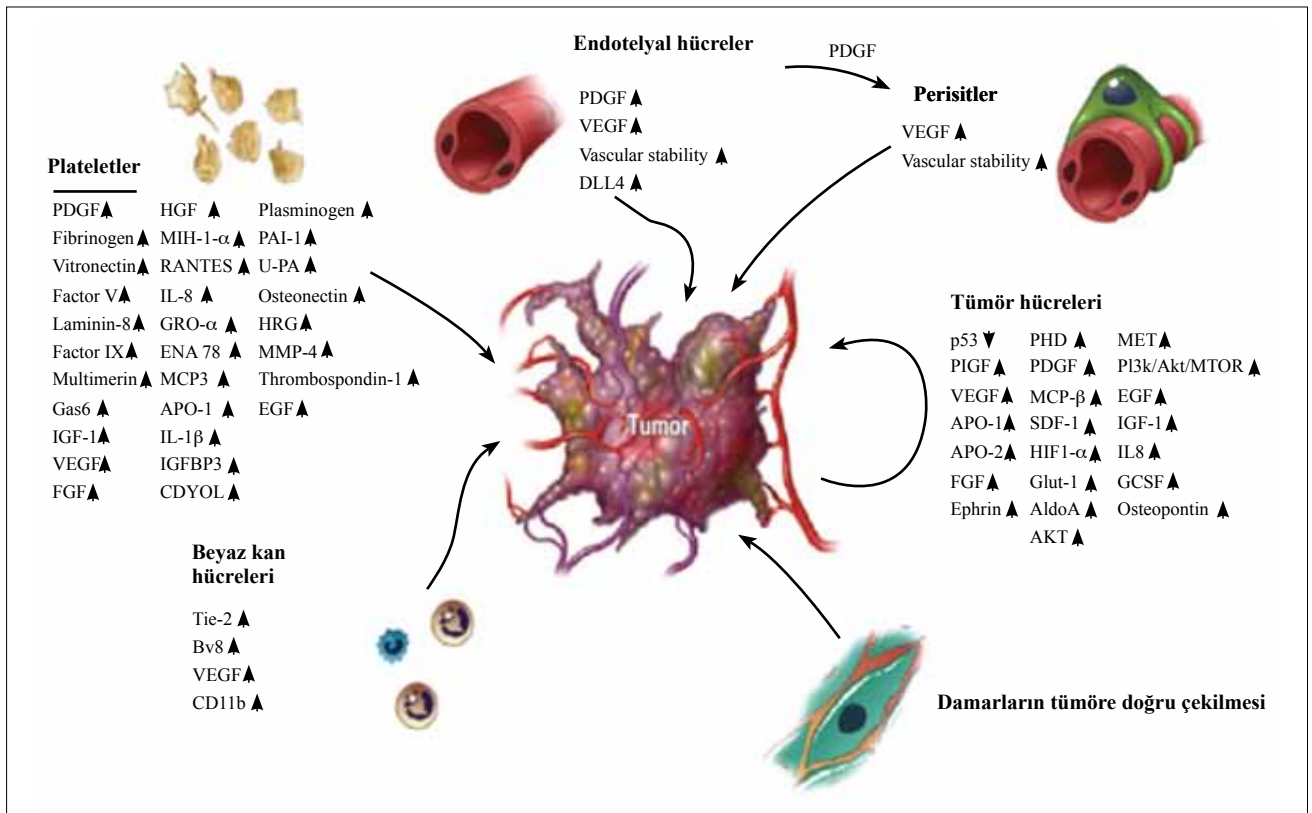


Şekil 3. Kemoterapötik ilaçlarda ve anti-anjiyogenik tedavilerde belli başlı bazı hedefler (48 no.'lu kaynaktan uyarlanmıştır).

menter tanımlayıcı bölgeleri içerir. Ziv-afibercept insan VEGF reseptörleri 1 ve 2'nin hücre dışı etki kısımlarındaki damar endotelial büyüme faktörü (VEGF) bağlama bölgeleri ile insan immunoglobulin G1'in Fc parçalarının füzyonu sonucu oluşturulan bir rekombinant füzyon proteinidir. Hem VEGF'yi ve hem de Plasental growth faktörü (PlGF) bağlar ve Vegf trap olarak adlandırılır. Ziv-Afibercept, Ağustos 2012'den beri FDA tarafından kullanımına onay verilen daha önce oxaliplatin rejimi almış yada dirençli olan metastatik kolorektal kanserli hastalarda 5-FU, lökovorin ve irinotekan (FOLFORI) kombinasyonu ile birlikte rutin tedavide kullanılan bir ilaçtır.<sup>[49]</sup> Bevasizumab içeren tedavi rejimleri NCCN klavuzunda birinci basamak tedavide öneri olarak yer almaktadır.<sup>[50]</sup> Yine VEGF trap olarak adlandırılan ziv-afibercept de NCCN klavuzunda ikinci basamak tedavide irinotekan içeren kemoterapi rejimleri ile kombine kullanımda öneri olarak yer almaktadır.<sup>[50]</sup>

Her ne kadar tedavi kılavuzlarında yer almasa da metronomik kemoterapi uygulamalarında, kemoterapi ilaçlarının düşük dozlarda kullanılması ile başta VEGF olmak üzere bazı anjiyogenik moleküllerin sentezinin ve salgısının baskılanabildiği gösterilmiştir.<sup>[51]</sup> Daha önce yaptığımız bir çalışmada kolorektal kanser tedavisinde kullanılan 5-fluorourasil, oksaliplatin ve irinotekanın tümör hücrelerini öldürmeyen düşük dozlarında in-vitro olarak VEGF yapımını baskıladığını göstermiştik.<sup>[52]</sup>

Hücre içindeki anjiyogenez sürecini uyan sinyal iletimini bloke eden ilaçlara örnek olarak tirozin kinaz inhibitörleri verilebilir. Bunlar BCL-ABL tirozin kinaz inhibitörleri, epidermal büyüme faktörü tirozin kinaz inhibitörleri, vasküler endotelial büyüme faktörü tirozin kinaz inhibitörleridir. Vasküler endotelial büyüme faktörü tirozin kinaz inhibitörlerine örnek olarak ise semaxinib, vatalanib, sunitinib, sorafenib ve regorafenib verilebilir. Bu moleküllerden yalnızca regorafenib kolorektal



**Şekil 4.** Anjiyogenez sürecinde rol oynayan hücreler ve salgıladıkları moleküller. Bu moleküller çoğu zaman anti-anjiyogenik tedavide uyarılmış alternatif anjiyogenez yolları olarak da karşımıza çıkmaktadır.<sup>[71]</sup>



kanserde FDA onayı almıştır.

Preklinik çalışmalardan başarılı bir şekilde çıkan antianjiyogenez ilaçlarından bevasizumab ise klinik safhaya geçtiğinde preklinik çalışmalarda gözlemlenen sonuçlardan farklı olarak yalnızca/çoğunlukla kemoterapi ile kombine edildiğinde daha iyi sonuç vermiştir. Bu da çoğunlukla tümör damar ağını normalize ederek kemoterapi ilacının tümör dokusunda daha iyi dağılımını sağlaması ile ilişkilidir. Tirozin kinaz inhibitörlerinin ise farklı pek çok hedefi olduğu için tekli tedavi olarak uygulanabilmektedir. TKI lerin diğer kemoterapi ajanları ile kombinasyonu da denenmektedir ancak tek başlarına kullanıldıklarında da etkili olabilmektedirler. Ayrıca çok yakın bir zamanda yayınlanan bir randomize faz II çalışmada metastatik kolorektal kanserli hastalarda birinci basamak tedaviden yarar göremeyen ve modifiye FOLFOX-6 ya da FOLFIRI tedavisine axitinib yada bevasizumab eklenen hastalarda bevasizumabın daha iyi tolere edildiğini göstermektedir.<sup>[53]</sup>

Benzer şekilde regorafenib de metastatik kolorektal kanserli hastalarda üçüncü basamak tedavide tek ajan olarak NCCN klavuzunda kategori 2b düzeyinde öneri olarak yer almıştır.

### **Anti-Anjiyogenik Tedavi Direncini Etkileyen Faktörler**

Bevasizumab ile başta kolon kanseri olmak üzere diğer kanser türlerinde de başlangıçta yanıt elde edilen hastalarda bir süre sonra tümör yanıtında bir duraklama ve takiben tümörde büyüme izlenmektedir. Klinik ilaç direnci olarak adlandırılan bu durum kemoterapi ilaçları için iyi tanımlanmış bir antite olmakla birlikte bevasizumab için net olarak tanımlanmış ilaç direnç mekanizmaları bulunmamaktadır. Deneysel çalışmalarda ve bazı klinik çalışmalarda bevasizumab alan ve klinik olarak direnç gelişen hastalarda bazı sitokinlerin ve proanjiyogenik faktörlerin (plasental büyüme faktörü (PIGF), matriksmetalloproteinaz-9 (MMP-9), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), platelet-kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF) vb) arttığı gösterilmiştir.<sup>[20,55]</sup>

Bevasizumab humanize bir monoklonal antikordur. Monoklonal antikörlere karşı hastada an-

tikor cevabı gelişmesi bu tür ilaçların etkinliğini değiştirebilmektedir. Örneğin romatoid artrit tedavisinde kullanılan anti-TNF monoklonal antikörlarına (infiximab, etanercept, adalimumab) karşı gelişen antikörların bu ilaçların kan düzeylerinin düşmesinde ve tedavi etkinliğinin azalmasında rol oynadığı gösterilmiştir.<sup>[56]</sup> Bevasizumab tedavisi esnasında bu ilaca karşı antikör cevabı gelişip gelişmediği ve gelişebilecek bu antikör cevabının ilaç direncindeki rolü henüz iyi bilinmemektedir. Vitreus içine uygulanan bevasizumaba karşı nötralizan antikörlar gelişebildiği ve bu antikörların da bevasizumab etkinliğini değiştirebileceği gösterilmiştir.<sup>[57]</sup>

Antianjiyogenik tedaviler kanser tedavisinde faydalı olmakla beraber hangi hastanın direnç geliştireceğinin tam olarak öngörülebilmesi bu tedavinin kullanım alanını sınırlandırmaktadır. Tümörlerin antianjiyogenik tedavilerden kaçış mekanizmaları tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Çok sayıda faktörün bu mekanizmalarda rol oynadığı düşünülmektedir. Bunlardan biri tümör anyiyogenezinde rol oynayan alternatif sinyal iletim yollarının harekete geçmesidir. Anjiyogenez oluşumunu sağlayan en potent uyaran tümörlerin istirahat halindeki endotel hücrelerini bölünmeye teşvik ederek yeni kan damarları oluşturmasını sağlayan VEGF'dir.<sup>[58]</sup> VEGF yolağından farklı olarak anjiyogenezde çok önemli rolleri olan anjiyopoietinler (Ang-1 ve Ang-2), notch ve integrin yolları gibi yollar da bulunmaktadır.<sup>[59]</sup> Ayrıca plasental büyüme faktörü (PIGF) endotel hücreleri, perisitleri ve düz kas hücrelerini uyarmak suretiyle patolojik anjiyogenezi doğrudan ve makrofaj ve kemik iliği öncü hücreleri çekerek de dolaylı olarak aktive etmektedir.<sup>[60]</sup> VEGF'nin değişik boyutlarda varyantlarının sentezlenmesi ise bir başka direnç mekanizmasıdır. mRNA düzeyinde alternative birleşmeler farklı VEGF izoformları oluşturmaktadır.<sup>[61]</sup> İlaç direncinden hangi izoformların sorumlu olduğunu bilmek dirençli hastalarda alternative tedavi stratejileri geliştirmek açısından önemli olabilir. VEGF tek nükleotid (SNPs) polimorfizmleri kanser gelişiminde, anti-anjiyogenik tedavilere cevapta ve yan etkilerde rol oynayabilecek olası faktörler arasında yer alır.<sup>[62]</sup> Hipoksi ve HIF bağımlı cevapların antianjiyogenik ajanlara dirençte önemli ro-

lünün olabileceği düşünülmektedir. Anjiyogenez inhibisyonu ile ortaya çıkan hipoksinin tümörleri daha agresif ve metastatik forma dönüştüren yolakları tetiklediği öngörülmektedir. Tek ajanlı antianjiyogenik tedavi ile uyarılan hipoksinin diğer proanjiyogenik faktörleri artırdığı ve ilaca direnç gelişimi ile sonuçlandığı gösterilmiştir.<sup>[63]</sup> Fibroblast, perisit, mezenkimal ve hematopoietik hücreler gibi pro-anjiyogenik stromal hücrelerin artışı (up-regulation) bazı mekanizmalar ile tümör gelişimini desteklemektedir. Tümör bağlantılı fibroblastların (TAFs) VEGF ve PDGF-C üreterek antianjiyogenik tedaviye dirençte önemli rollerinin olabileceği xenograflar ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca makrofajların ve tümörü infiltre eden nötrofillerin hipoksik tümör alanında birikerek tümör anjiyogenezine yardımcı olan sitokinler salgılamaları da antianjiyogenik tedaviye dirençte önemlidir.<sup>[64,65]</sup> Antianjiyogenik tedavi sonrası damar regresyonu sonucu oluşan hipoksi, tümör endotelyumunu oluşturan kemik iliği kaynaklı hücrelerin (BMDCs) artışına sebep olur.<sup>[66]</sup> CD11b+Gr1+ myeloid hücreleri kemik iliği kaynaklı hücrelerin bir türüdür ve Bv8 proteini de dahil olmak üzere bazı anjiyogenik faktörler salgılamaktadır.<sup>[67]</sup> Bunun yanı sıra mutant p-53 genine sahip tümörlerin anlamlı oranda daha fazla vasküler yoğunluğa sahip olduğu gösterilmiştir. Anjiyogenez protein dizisi (array) çalışmaları mutant p-53 genine sahip tümörlerin trombospodin-1, koagülasyon faktörü III, serpin E1'de anlamlı artışlara neden olurken MMP-9 da anlamlı azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu durumda apoptoza direnç de geliştiği için sonuç olarak antianjiyogenik tedaviye direnç geliştiği gösterilmiştir.<sup>[68,69]</sup>

Dirençte bir diğer önemli konu ilaç taşınımı konusudur. ABC (ATP bağlama kaseti) taşıyıcılarının çoklu direnç gelişiminde (MDR) önemli rollerinin olduğu bilinmektedir. P-glikoprotein en çok çalışılan akış pompasıdır. Yapılan bir çalışmada p-glikoproteininin platelet aktive edici faktörü salgılaması yoluyla ant-I-anjiyogenik ilaç direnci gelişimine katkı sağlayabileceği ortaya konmuştur.<sup>[70]</sup>

Sonuç olarak günümüzde kolorektal kanserde anti-anjiyogenik tedavilerin etkinliği gösterilmiş ve bu ilaçlar rutin tedaviye girmiştir. Söz konusu

bu ilaçlar kolorektal kanserli hatalarda sağkalım oranlarını artırmakla birlikte etkilerine karşı direnç gelişmesi ya da bu ilaçlara karşı primer direnç antianjiyogenik tedavilerde tedavi başarısızlığına yol açan en önemli etkenlerden biridir. Tümörlerin kullanılan ilaçlara karşı direnç mekanizmaları geliştirerek hedefe yönelik bu tedavileri kendi lehine çevirebilecekleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Bu gibi durumlarda tedavi şemalarına yeni hedefe yönelik ilaçların eklenmesi bir çıkış yolu olabilir. Nitekim hedefe yönelik ilaçların kombine kullanımları ile ilgili klinik çalışmalar halen devam etmektedir. Özellikle VEGF yolağındaki reseptör tirozin kinazları hedefleyen ilaçların bevasizumab, aflibercept gibi ilaçlarla kombine eden çalışmaların sonuçları bize anti-anjiyogenik tedavilerin daha rasyonel kullanımı konusunda yol gösterici olacaktır. Ayrıca yeni geliştirilecek olan anti-anjiyogenik tedaviler gibi hedefe yönelik tedavi kombinasyonları ile hastalar klasik kemoterapi kombinasyonlarına göre daha az ilaç yan etkisine maruz kalacak ve daha fazla klinik fayda sağlayabileceklerdir.

### Kaynaklar

1. Yılmaz HH, Yazıhan N, Tunca D, Sevinç A, Olcayto EÖ, Özgül N, et al. Cancer trends and incidence and mortality patterns in Turkey. *Jpn J Clin Oncol* 2011;41(1):10-6. [CrossRef](#)
2. Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 2006;57:1-18. [CrossRef](#)
3. Liu Y, Deisseroth A. Tumor vascular targeting therapy with viral vectors. *Blood* 2006;107(8):3027-33. [CrossRef](#)
4. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29(6 Suppl 16):15-8.
5. Yu JL, May L, Klement P, Weitz JI, Rak J. Oncogenes as regulators of tissue factor expression in cancer: implications for tumor angiogenesis and anti-cancer therapy. *Semin Thromb Hemost* 2004;30(1):21-30. [CrossRef](#)
6. Arbiser JL. Molecular regulation of angiogenesis and tumorigenesis by signal transduction pathways: evidence of predictable and reproducible patterns of synergy in diverse neoplasms. *Semin Cancer Biol* 2004;14(2):81-91. [CrossRef](#)
7. Kaliberov SA, Kaliberova LN, Stockard CR, Grizzle WE, Buchsbaum DJ. Adenovirus-mediated FLT1-targeted proapoptotic gene therapy of human prostate cancer. *Mol Ther* 2004;10(6):1059-70. [CrossRef](#)
8. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-

- induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(5):2604-9. [CrossRef](#)
9. Powell JA, Mohamed SN, Kerr JS, Mousa SA. Antiangiogenesis efficacy of nitric oxide donors. *J Cell Biochem* 2000;80(1):104-14. [CrossRef](#)
  10. Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Monge JC, Mohamed F, Bendeck MP, Stewart DJ. Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor. *Circ Res* 1998;82(9):1007-15. [CrossRef](#)
  11. Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Zhang Q, Jones N, Dumont DJ, Stewart DJ. Angiogenic actions of angiotensin-1 require endothelium-derived nitric oxide. *Am J Pathol* 2003;162(6):1927-36. [CrossRef](#)
  12. Isenberg JS, Yu C, Roberts DD. Differential effects of ABT-510 and a CD36-binding peptide derived from the type 1 repeats of thrombospondin-1 on fatty acid uptake, nitric oxide signaling, and caspase activation in vascular cells. *Biochem Pharmacol* 2008;75(4):875-82.
  13. Isenberg JS, Romeo MJ, Maxhimer JB, Smedley J, Frazier WA, Roberts DD. Gene silencing of CD47 and antibody ligation of thrombospondin-1 enhance ischemic tissue survival in a porcine model: implications for human disease. *Ann Surg* 2008;247(5):860-8. [CrossRef](#)
  14. Akbulut H, Altuntas F, Akbulut KG, Ozturk G, Cindoruk M, Unal E, et al. Prognostic role of serum vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and nitric oxide in patients with colorectal carcinoma. *Cytokine* 2002;20(4):184-90. [CrossRef](#)
  15. Kuroi K, Toi M. Circulating angiogenesis regulators in cancer patients. *Int J Biol Markers* 2001;16(1):5-26.
  16. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001;19(4):1207-25.
  17. Bergsland E, Dickler MN. Maximizing the potential of bevacizumab in cancer treatment. *Oncologist* 2004;9 Suppl 1:36-42. [CrossRef](#)
  18. Ljungberg B, Jacobsen J, Häggström-Rudolfsson S, Rasmuson T, Lindh G, Grankvist K. Tumour vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in relation to serum VEGF protein levels and tumour progression in human renal cell carcinoma. *Urol Res* 2003;31(5):335-40. [CrossRef](#)
  19. Stimpfl M, Tong D, Fasching B, Schuster E, Obermair A, Leodolter S, et al. Vascular endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8(7):2253-9.
  20. Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, Wolff RA, Eng C, Glover KY, et al. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J Clin Oncol* 2010;28(3):453-9. [CrossRef](#)
  21. Miles DW, de Haas SL, Dirix L, Chan A, Pivot X, Tomczak P, et al. Plasma biomarker analyses in the AVADO Phase III randomized study of first-line bevacizumab + docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor (HER) 2-negative metastatic breast cancer. *Cancer Res* 2010;(Suppl 2; abstr P2-16-04):70.
  22. Jayson GC, de Haas S, Delmar P, Miles DJ, Shah MA, Van Cutsem E, et al. Evaluation of plasma VEGF-A as a potential predictive pan-tumour biomarker for bevacizumab. *Proceedings of the 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress, Stockholm, Sweden, September 23-7, 2011 (abstr 804)*.
  23. Loupakis F, Cremolini C, Fioravanti A, Orlandi P, Salvatore L, Masi G, et al. Pharmacodynamic and pharmacogenetic angiogenesis-related markers of first-line FOLFOXIRI plus bevacizumab schedule in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2011;104(8):1262-9.
  24. Batchelor TT, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Plotkin SR, Gerstner E, et al. Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2010;28(17):2817-23.
  25. Nikolidakos PG, Altorki N, Yankelevitz D, Tran HT, Yan S, Rajagopalan D, et al. Plasma cytokine and angiogenic factor profiling identifies markers associated with tumor shrinkage in early-stage non-small cell lung cancer patients treated with pazopanib. *Cancer Res* 2010;70(6):2171-9. [CrossRef](#)
  26. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, et al. Role of PIGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003;9(7):936-43.
  27. Mazzone M, Dettori D, Leite de Oliveira R, Loges S, Schmidt T, Jonckx B, et al. Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell* 2009;136(5):839-51. [CrossRef](#)
  28. Bagri A, Tessier-Lavigne M, Watts RJ. Neuropilins in tumor biology. *Clin Cancer Res* 2009;15(6):1860-4.
  29. Pan Q, Chantry Y, Liang WC, Stawicki S, Mak J, Rathore N, et al. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* 2007;11(1):53-67. [CrossRef](#)
  30. Beck B, Driessens G, Goossens S, Youssef KK, Kuchnio A, Caauwe A, et al. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature* 2011;478(7369):399-403. [CrossRef](#)
  31. Schneider BP, Wang M, Radovich M, Sledge GW, Badve S, Thor A, et al. Association of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 genetic polymorphisms with outcome in a trial of paclitaxel compared with paclitaxel plus

- bevacizumab in advanced breast cancer: ECOG 2100. *J Clin Oncol* 2008;26(28):4672-8. [CrossRef](#)
32. Koutras AK, Antonacopoulou AG, Eleftheraki AG, Dimitrakopoulos FI, Koumariou A, Varthalitis I, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms and clinical outcome in colorectal cancer patients treated with irinotecan-based chemotherapy and bevacizumab. *Pharmacogenomics J* 2012;12(6):468-75.
33. Vljajnic T, Andreozzi MC, Schneider S, Tornillo L, Karamitopoulou E, Lugli A, et al. VEGFA gene locus (6p12) amplification identifies a small but highly aggressive subgroup of colorectal cancer [corrected] patients. *Mod Pathol* 2011;24(10):1404-12. [CrossRef](#)
34. Schneider BP, Gray RJ, Radovich M, Shen F, Vance G, Li L, et al. Prognostic and predictive value of tumor vascular endothelial growth factor gene amplification in metastatic breast cancer treated with paclitaxel with and without bevacizumab; results from ECOG 2100 trial. *Clin Cancer Res* 2013;19(5):1281-9. [CrossRef](#)
35. Brauer MJ, Zhuang G, Schmidt M, Yao J, Wu X, Kaminker JS, et al. Identification and analysis of in vivo VEGF downstream markers link VEGF pathway activity with efficacy of anti-VEGF therapies. *Clin Cancer Res* 2013;19(13):3681-92. [CrossRef](#)
36. Cai J, Ma H, Huang F, Zhu D, Bi J, Ke Y, Zhang T. Correlation of bevacizumab-induced hypertension and outcomes of metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg Oncol* 2013;11:306. [CrossRef](#)
37. Shaked Y, Emmenegger U, Man S, Cervi D, Bertolini F, Ben-David Y, et al. Optimal biologic dose of metronomic chemotherapy regimens is associated with maximum antiangiogenic activity. *Blood* 2005;106(9):3058-61.
38. Koizumi F, Kitagawa M, Negishi T, Onda T, Matsumoto S, Hamaguchi T, et al. Novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors. *Cancer Res* 2006;66(20):10048-56. [CrossRef](#)
39. Bocci G, Falcone A, Fioravanti A, Orlandi P, Di Paolo A, Fanelli G, et al. Antiangiogenic and anticancer effects of metronomic irinotecan chemotherapy alone and in combination with semaxinib. *Br J Cancer* 2008;98(10):1619-29. [CrossRef](#)
40. Fan F, Gray MJ, Dallas NA, Yang AD, Van Buren G 2nd, Camp ER, et al. Effect of chemotherapeutic stress on induction of vascular endothelial growth factor family members and receptors in human colorectal cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2008;7(9):3064-70. [CrossRef](#)
41. Riedel F, Götte K, Goessler U, Sadick H, Hörmann K. Targeting chemotherapy-induced VEGF up-regulation by VEGF antisense oligonucleotides in HNSCC cell lines. *Anticancer Res* 2004;24(4):2179-83.
42. Fioravanti A, Canu B, Ali G, Orlandi P, Allegrini G, Di Desidero T, et al. Metronomic 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan in colorectal cancer. *Eur J Pharmacol* 2009;619(1-3):8-14. [CrossRef](#)
43. Aktas SH, Akbulut H, Akgun N, Icli F. Low dose chemotherapeutic drugs without overt cytotoxic effects decrease the secretion of VEGF by cultured human tumor cells: a tentative relationship between drug type and tumor cell type response. *Cancer Biomark* 2012-2013;12(3):135-40.
44. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(7):979-94.
45. Goldberg RM. Therapy for metastatic colorectal cancer. *Oncologist* 2006;11(9):981-7. [CrossRef](#)
46. Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 2000;343(13):905-14. [CrossRef](#)
47. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figuer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008;26(12):2013-9. [CrossRef](#)
48. Kerbel RS, Yu J, Tran J, Man S, Vilorio-Petit A, Klement G, et al. Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev* 2001;20(1-2):79-86. [CrossRef](#)
49. Patel A, Sun W. Ziv-aflibercept in metastatic colorectal cancer. *Biologics* 2014;8:13-25.
50. Strickler JH, Hurwitz HI. Palliative treatment of metastatic colorectal cancer: what is the optimal approach? *Curr Oncol Rep* 2014;16(1):363. [CrossRef](#)
51. Calleri A, Bono A, Bagnardi V, Quarna J, Mancuso P, Rabascio C, et al. Predictive Potential of Angiogenic Growth Factors and Circulating Endothelial Cells in Breast Cancer Patients Receiving Metronomic Chemotherapy Plus Bevacizumab. *Clin Cancer Res* 2009;15(24):7652-7. [CrossRef](#)
52. Aktas SH, Akbulut H, Akgun N, Icli F. Low dose chemotherapeutic drugs without overt cytotoxic effects decrease the secretion of VEGF by cultured human tumor cells: a tentative relationship between drug type and tumor cell type response. *Cancer Biomark* 2012-2013;12(3):135-40.
53. Bendell JC, Tournigand C, Swieboda-Sadlej A, Barone C, Wainberg ZA, Kim JG, et al. Sobrero, axitinib or bevacizumab plus FOLFIRI or modified FOLF-OX-6 after failure of first-line therapy for metastatic

- colorectal cancer: a randomized phase II study. *Clinical Colorectal Cancer* 2013;12(4):239-47. [CrossRef](#)
54. [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp).
  55. Bagley RG, Ren Y, Weber W, Yao M, Kurtzberg L, Pinckney J, et al. Placental growth factor upregulation is a host response to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res* 2011;17(5):976-88. [CrossRef](#)
  56. Jamnitski A, Krieckaert CL, Nurmohamed MT, Hart MH, Dijkmans BA, Aarden L, et al. Patients non-responding to etanercept obtain lower etanercept concentrations compared with responding patients. *Ann Rheum Dis* 2012;71(1):88-91. [CrossRef](#)
  57. Forooghian F, Chew EY, Meyerle CB, Cukras C, Wong WT. Investigation of the role of neutralizing antibodies against bevacizumab as mediators of tachyphylaxis. *Acta Ophthalmol* 2011;89(2):e206-7. [CrossRef](#)
  58. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9(6):669-76.
  59. Ferrara N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21(1):21-6. [CrossRef](#)
  60. Adini A, Kornaga T, Firoozbakht F, Benjamin LE. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res* 2002;62(10):2749-52.
  61. Olsson AK1, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(5):359-71.
  62. Jain RK, Duda DG, Willett CG, Sahani DV, Zhu AX, Loeffler JS, et al. Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6(6):327-38. [CrossRef](#)
  63. Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, O'Brien S, Senino B, Nakahara T, et al. Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest* 2006;116(10):2610-21. [CrossRef](#)
  64. Shojaei F, Ferrara N. Role of the microenvironment in tumor growth and in refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies. *Drug Resist Updat* 2008;11(6):219-30. [CrossRef](#)
  65. Liang WC, Wu X, Peale FV, Lee CV, Meng YG, Gutierrez J, et al. Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF. *J Biol Chem* 2006;281(2):951-61. [CrossRef](#)
  66. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;358(19):2039-49. [CrossRef](#)
  67. Shojaei F, Singh M, Thompson JD, Ferrara N. Role of Bv8 in neutrophil-dependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(7):2640-5. [CrossRef](#)
  68. Yu JL, Rak JW, Coomber BL, Hicklin DJ, Kerbel RS. Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science* 2002;295(5559):1526-8. [CrossRef](#)
  69. Teodoro JG, Evans SK, Green MR. Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome. *J Mol Med (Berl)* 2007;85(11):1175-86. [CrossRef](#)
  70. Raggars RJ, Vogels I, van Meer G. Multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) secretes platelet-activating factor. *Biochem J* 2001;357(Pt 3):859-65. [CrossRef](#)
  71. Bottsford-Miller JN, Coleman RL, Sood AK. Resistance and escape from antiangiogenesis therapy: clinical implications and future strategies. *J Clin Oncol* 2012;30(32):4026-34. [CrossRef](#)