



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

---

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΕΤΟΣ 2015

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΣΧΗΜΑΤΑ  
ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΕ  
ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ: IN VITRO  
ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ  
ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗΣ ΒΙΝΟΡΕΑΜΠΙΝΗΣ.**

**ΕΙΡΗΝΗ ΜΠΙΖΙΩΤΑ**

**ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2015







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

---

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΕΤΟΣ 2015

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΣΧΗΜΑΤΑ  
ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΕ  
ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ: IN VITRO  
ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ  
ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗΣ ΒΙΝΟΡΕΑΜΠΙΝΗΣ.**

**ΕΙΡΗΝΗ ΜΠΙΖΙΩΤΑ**

**ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2015



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ. Μπιζιώτα Ειρήνης: 16-10-2007

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 620<sup>α</sup>/20-11-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Παππάς Περικλής Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής  
Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μαρσέλος Μάριος –Αθανάσιος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής  
Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μπριασούλης Ευάγγελος Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής  
Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 18-12-2007

*«Επίδραση κυτταροστατικών φαρμάκων σε σχήματα προσομοίωσης μετρονομικής θεραπείας σε  
ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα: In vitro μεταφραστική μελέτη κλινικής εφαρμογής μετρονομικής  
βινορελμπίνης»*

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 780<sup>α</sup>/2-7-2015

|                            |                                                                                              |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Κωνσταντή Μαρία            | Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του<br>Πανεπιστημίου Ιωαννίνων                |
| Κακολύρης Στυλιανός        | Καθηγητής Κλινικής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του<br>Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης |
| Μαρσέλος Μάριος –Αθανάσιος | Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του<br>Πανεπιστημίου Ιωαννίνων                 |
| Μπριασούλης Ευάγγελος      | Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του<br>Πανεπιστημίου Ιωαννίνων                    |
| Παπανδρέου Χρήστος         | Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του<br>Πανεπιστημίου Θεσσαλίας        |
| Φώτης Θεόδωρος             | Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του<br>Πανεπιστημίου Ιωαννίνων            |
| Παππάς Περικλής            | Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής<br>του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων     |

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 9-9-2015

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Η Γραμματέας του Τμήματος

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

*Σε αυτούς που νικήθηκαν από τον  
καρκίνο.....*

*Σε αυτούς που παλεύουν*

*ακόμα.....*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μελέτη αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα 2007-2015, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Περικλή Παππά. Η Διδακτορική αυτή Διατριβή δε θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την αμέριστη βοήθεια και ενεργή συμμετοχή όλων των μελών του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

- Τον Καθηγητή Φαρμακολογίας, κ. **Μάριο-Αθανάσιο Μαρσέλο**, Διευθυντή του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να γίνω μέλος της του εργαστηρίου. Μου διέθεσε απλόχερα όλη την υλικοτεχνική υποδομή του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας και ήταν πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει σε όποιο πρόβλημα αντιμετώπιζα.

- Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας, κ. **Περικλή Παππά**, επιβλέποντα καθηγητή της διατριβής μου, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος. Οι γνώσεις του και η καθοδήγηση του ήταν σημαντικές για τη πραγματοποίηση του συγκεκριμένου πονήματος. Ήταν πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει σε πρακτικές δυσκολίες και απορίες, ενώ διέθεσε πολύ από το προσωπικό του χρόνο προκειμένου να ολοκληρωθεί η συγκεκριμένη εργασία. Θα ήθελα να του εκφράσω την εκτίμηση, την αγάπη και την μεγάλη ευγνωμοσύνη μου για την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπό μου. Η συμπαράσταση και η υπομονή του ήταν σημαντικές για την ολοκλήρωση του συγκεκριμένου στόχου.

- Τον Καθηγητή Ογκολογίας, κ. **Ευάγγελο Μπριασούλη**, ο οποίος με καθοδήγησε και με συμβούλεψε στα πρώτα κλινικά μου βήματα, με μύησε στον κόσμο της κλινικής και μεταφραστικής έρευνας και μου μετέφερε καθημερινά τις γνώσεις του. Ως κύριος εμπνευστής του θέματος της μετρονομικής θεραπείας, με παρότρυνε καθημερινά και ήταν πάντα διαθέσιμος για την επίλυση προβλημάτων που προέκυπταν με τη Διδακτορική Διατριβή. Θα ήθελα να του εκφράσω την μεγάλη ευγνωμοσύνη μου για την έμπρακτη υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε παρόλες τις αντιξοότητες.

- Την Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, κ. **Μαρία Κωνσταντή** για την άριστη συνεργασία και τη συνεχή καθοδήγησή της σε θέματα που άπτονταν της εξειδίκευσής της.
- Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, κ. **Κατερίνα Αντωνίου**, για την άψογη συνεργασία και τη προθυμία της να με βοηθήσει σε προβλήματα που τυχόν προέκυπταν στη καθημερινότητα.
- Τον συνάδελφο **Λεωνίδα Μαυροειδή**, υποψήφιο Διδάκτορα της Ιατρικής, που με τη πολύτιμη βοήθεια του τους τελευταίους μήνες κατάφερα να ολοκληρώσω τη Διδακτορική μου Διατριβή. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την ανεκτίμητη βοήθεια, τη συμπαράσταση και το ευχάριστο κλίμα που δημιουργούσε τις ατελείωτες ώρες στο εργαστήριο.
- Τις κ **Μάρθα Νικολαΐδου**, **Όλγα Χουλιάρα**, **Γεωργία Ρέντση** και τον κ. **Ευάγγελο-Παναγιώτη Δασκαλόπουλο**, Διδάκτορες της Ιατρικής Σχολής, για την εκμάθηση διαφόρων μοριακών πειραματικών τεχνικών και την ανεκτίμητη βοήθεια τους στα αρχικά βήματα αυτής της Διδακτορικής Διατριβής. Τέλος, θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για την ευχάριστη παρέα που δημιουργούσαμε καθημερινά στο Εργαστήριο.
- Τις κυρίες **Ακυλίνα Μπαλωμένου**, **Όλγα Τσουμάνη** και **Μαριάνθη Σωτηροπούλου** για τη αρωγή τους σε όλα τα θέματα που άπτονταν των αρμοδιοτήτων τους και για τις συμβουλές τους καθ' όλη τη διάρκεια της Διδακτορικής μου Διατριβής.

Εκτός από τους συνεργάτες μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους, τους φίλους μου, που με στήριζαν όλα αυτά τα χρόνια, και παρέμειναν κοντά μου ακόμα και σε πολύ δύσκολες καταστάσεις. Χωρίς την αμέριστη ηθική τους υποστήριξη δεν θα κατάφερνα να ολοκληρώσω την Διδακτορική αυτή Διατριβή.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου, που στάθηκαν δίπλα μου με αγάπη και αφοσίωση και με παρότρυναν να κυνηγήσω τα όνειρά μου.

Ιωάννινα, Σεπτέμβριος 2015

Ειρήνη Μπιζιώτα

---

Μέρος της Διδακτορικής Διατριβής και συγκεκριμένα το πειραματικό πρωτόκολλο συγχορήγησης μετρονομικής βινορελμπίνης με έναν ενεργοποιητή του PPAR $\gamma$  (ροσιγλιταζόνη) πραγματοποιήθηκε με την οικονομική ενίσχυση-υποτροφία της Εταιρείας Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδος (ΕΟΠΕ) το 2009.

**“....doctors have already used low-dose chemotherapy successfully without knowing why it works. Clinicians come up all the time and say: ‘I want to tell you a secret. I keep giving chemotherapy, but I was afraid to mention it, because everyone thought I was giving homeopathic doses.’**

**...they have an explanation. All that’s missing is the proof”**

**Judah Folkman, JNCI 2000**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....</b>                                                               | <b>1</b>  |
| <b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....</b>                                                             | <b>5</b>  |
| <b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ .....</b>                                                             | <b>10</b> |
| <b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>                                                               | <b>13</b> |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ. ....</b>         | <b>15</b> |
| 1.1) Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ- Η ΕΝΝΟΙΑ ΤΟΥ ΛΟΓΑΡΙΘΜΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ..... | 16        |
| 1.2) ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ .....                                                        | 18        |
| 1.2.1) Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου.....                                         | 18        |
| 1.2.2) Παράγοντες που επιδρούν στον κυτταρικό κύκλο. ....                           | 20        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΤΙΜΙΤΩΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ. ....</b>          | <b>21</b> |
| 2.1) Μηχανισμοί δράσεις των MTAs.....                                               | 22        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ .....</b>                                 | <b>26</b> |
| 3.1) ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ.....                                                         | 27        |
| 3.1Α) Αντι- αγγειογενετική δράση.....                                               | 27        |
| 3.1Α.1) Μετρονομική Χ/Θ και CEP. ....                                               | 30        |
| 3.1Α.2) Μετρονομική Χ/Θ και παράγοντες αγγειογένεσης. ....                          | 32        |
| 3.1Β) Ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας. ....                                     | 34        |
| 3.1Γ) Επαγωγή της κατάστασης αδράνειας του όγκου (Tumor dormancy).....              | 35        |
| 3.1Δ) Άμεση επίδραση στα καρκινικά κύτταρα (The 4D Effect). ....                    | 37        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ .....</b>                                               | <b>40</b> |
| 4.1) ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ.....                                                  | 40        |
| 4.2) ΣΤΑΔΙΑ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ.....                                                      | 42        |
| 4.3) ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΓΟΝΙΚΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....                            | 44        |
| 4.4) ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΚΚΙΝΗΣΗ - ANGIOGENIC SWITCH.....                               | 46        |

|                                                                                                                                                                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.5) ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ.....                                                                                                                                                               | 49        |
| 4.5.1) ΠΡΟ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....                                                                                                                                                                    | 49        |
| 4.5.1.1) Παράγοντας των Ινοβλαστών - FGF ( Fibroblast Growth Factor).....                                                                                                                                     | 49        |
| 4.5.1.2) Αγγειοενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας - VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).....                                                                                                             | 51        |
| 4.5.1.3) Επαγωγίμος Παράγοντας της Υποξίας - HIF (Hypoxia Inducible Factor).....                                                                                                                              | 55        |
| 4.5.1.4) Ιντερλευκίνη 8 - IL-8 (Interleukin- 8 ). ....                                                                                                                                                        | 57        |
| 4.5.1.5) Κυκλοοξυγενάση 2 - COX-2 (Cyclooxygenase-2). ....                                                                                                                                                    | 62        |
| 4.5.1.6) Πυρηνικός παράγοντας-κΒ -NF-κΒ (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). ....                                                                                                | 64        |
| 4.5.2) ΑΝΤΙ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ. ....                                                                                                                                                                  | 67        |
| 4.5.2.1) Θρομβοσπονδίνη 1 - TSP-1 (Thrombospondin-1). ....                                                                                                                                                    | 67        |
| 4.5.2.2) Peroxisome proliferator-activated receptor γάμμα - PPARγ. ....                                                                                                                                       | 76        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ. ....</b>                                                                                                                                         | <b>80</b> |
| 5.1) ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗ.....                                                                                                                                                          | 84        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΓΧΟΡΗΓΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΩΝ ΤΟΥ PPARγ (ΡΟΣΙΓΛΙΤΑΖΟΝΗ) ΜΕ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗ. ....</b>                                                                                                      | <b>86</b> |
| <b>ΣΚΟΠΟΣ.....</b>                                                                                                                                                                                            | <b>88</b> |
| <b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>                                                                                                                                                                                     | <b>90</b> |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΟ ΣΧΗΜΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ VRL ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΥ ΔΟΣΗΣ .....</b>                                                             | <b>91</b> |
| 8.1) ΥΛΙΚΟ. ....                                                                                                                                                                                              | 91        |
| 8.2) ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....                                                                                                                                                                                         | 92        |
| 8.3) ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ. ....                                                                                                                                                                                 | 92        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ VRL ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ ΤΗΣ DVRL ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ, ΕΦΑΡΜΟΖΟΝΤΑΣ ΕΝΑ ΜΟΝΤΕΛΟ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ .....</b> | <b>94</b> |
| 9.Α) ΥΛΙΚΑ .....                                                                                                                                                                                              | 94        |
| 9.Α1) κυτταρική σειρά. ....                                                                                                                                                                                   | 94        |

|                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 9.A2) φαρμακευτική ουσία. ....                                                                                | 95  |
| 9.B) ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ .....                                                                                        | 97  |
| 9.B1) Απομόνωση και καλλιέργεια των HUVEC. ....                                                               | 97  |
| 9.B2) Πρωτόκολλο Απομόνωσης RNA από κύτταρα HUVEC.....                                                        | 99  |
| 9.B3) Πρωτόκολλο Απομόνωσης πρωτεϊνών από κύτταρα HUVEC.....                                                  | 101 |
| 9.B4) Πρωτόκολλο Απομόνωσης κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών από κύτταρα HUVEC. ....                | 102 |
| 9.B5) Μελέτη Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού.....                                                                  | 104 |
| 9.B6) Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης qRT-PCR. ....                                                           | 105 |
| 9.B6.1) Έλεγχος της ποιότητας των δειγμάτων RNA. ....                                                         | 106 |
| 9.B6.2) Ποσοτικοποίηση των δειγμάτων RNA. ....                                                                | 107 |
| 9.B6.3) Σύνθεση cDNA.....                                                                                     | 107 |
| 9.B7) Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική μέτρηση (Enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA). ....               | 109 |
| 9.B8) Κυτταρομετρία Ροής. ....                                                                                | 110 |
| 9.B8.1) Απόπτωση. ....                                                                                        | 110 |
| 9.B8.2) Κυτταρικός κύκλος. ....                                                                               | 111 |
| 9.B9) Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western Blotting.....                                                     | 112 |
| 9.B9.1) Προετοιμασία δειγμάτων –ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών.....                                                 | 112 |
| 9.B9.2) Ηλεκτροφόρηση.....                                                                                    | 112 |
| 9.B9.3) Μεταφορά των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών από τη πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. .... | 116 |
| 9.B9.4) Ανίχνευση πρωτεϊνών. ....                                                                             | 117 |
| 9.B9.5) Stripping. ....                                                                                       | 119 |
| 9.B9.6) Ποσοτικοποίηση. ....                                                                                  | 120 |
| 9.B10) Ανοσοαποτύπωση πυρηνικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών κατά Western Blot.....                       | 120 |
| 9.B11) Φαρμακοκινητική ανάλυση. ....                                                                          | 121 |

|                                                                                                           |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 9.B12) Δοκιμασία μετανάστευσης (Wound healing Assay). .....                                               | 122        |
| 9.Γ) ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....                                                                             | 122        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: ΣΥΓΧΟΡΗΓΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΩΝ ΤΟΥ PPARG (ΡΟΣΙΓΛΙΤΑΖΟΝΗ) ΜΕ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗ .....</b> | <b>123</b> |
| 10.1) ΥΛΙΚΑ .....                                                                                         | 123        |
| 10.1Α) Φαρμακευτική ουσία. ....                                                                           | 123        |
| 10.1Β) κυτταρική σειρά. ....                                                                              | 123        |
| 10.2) ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....                                                                                    | 124        |
| <b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>                                                                                  | <b>125</b> |
| <b>ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ. ....</b>      | <b>126</b> |
| <b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ In VITRO ΜΕΛΕΤΗΣ. ....</b>                                                                | <b>129</b> |
| 12.1) Επίδραση της VRL/DVRL στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.....                                             | 129        |
| 12.2) Φαρμακοκινητική ανάλυση. ....                                                                       | 132        |
| 12.3) Επίδραση της VRL στο κυτταρικό κύκλο και στην απόπτωση.....                                         | 134        |
| 12.4) Επίδραση της VRL στους μοριακούς δείκτες αγγειογένεσης σε επίπεδο μεταγραφής.....                   | 136        |
| 12.4.1) Επίδραση της VRL στους προ-αγγειογενετικούς δείκτες. ....                                         | 136        |
| 12.4.2) Επίδραση της VRL στους αντι-αγγειογενετικούς δείκτες. ....                                        | 139        |
| 12.5) Επίδραση της VRL/DVRL στις εκκρινόμενες πρωτεΐνες. ....                                             | 140        |
| 12.6) Επίδραση της VRL στις ολικές πρωτεΐνες.....                                                         | 141        |
| 12.7) Πυρηνική έκφραση μεταγραφικών παραγόντων. ....                                                      | 143        |
| 12.8) Μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων.....                                                             | 144        |
| <b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΓΧΟΡΗΓΗΣΗΣ RSG ΜΕ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ VRL.....</b>                                              | <b>145</b> |
| 13.1) Επίδραση της συγχορήγησης RSG με μετρονομική VRL στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.....                 | 145        |
| 13.2) Επίδραση της συγχορήγησης RSG με μετρονομική VRL στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση. ....        | 146        |

|                                                                                                    |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <u>13.3) Επίδραση της RSG στην έκφραση παραγόντων που συμμετέχουν στην αγγειογένεση.</u>           | 148        |
| <u>13.3.1) Επίδραση της RSG στους παράγοντες αγγειογένεσης.</u>                                    | 148        |
| <u>13.3.2) Συγχρόνηση μετρονομικής VRL με RSG και αγγειογένεση.</u>                                | 149        |
| <b><u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u></b>                                                                             | <b>152</b> |
| <b><u>ΣΥΣΧΕΤΗΣΗ ΤΩΝ IN VITRO ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ MOVIN.</u></b>                     | <b>153</b> |
| <b><u>IN VITRO ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ VRL</u></b>                                                             | <b>155</b> |
| <b><u>ΣΥΓΧΟΡΗΓΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΩΝ ΤΟΥ RPARγ ΜΕ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ VRL ΣΕ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HUVEC.</u></b> | <b>161</b> |
| <b><u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u></b>                                                                         | <b>165</b> |
| <b><u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u></b>                                                                         | <b>166</b> |
| <b><u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u></b>                                                                             | <b>169</b> |
| <b><u>SUMMARY</u></b>                                                                              | <b>172</b> |
| <b><u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u></b>                                                                         | <b>175</b> |

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

**MTX:** μετρονομική χημειοθεραπεία

**MTD:** maximum tolerated dose, μέγιστη ανεκτή δόση

**MTAs:** microtubule-targeting agents, φάρμακα που στοχεύουν στους μικροσωληνίσκους

**CEPs:** Circulating Endothelial Progenitors, κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα

**CECs:** Circulating endothelial cells, κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα

**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

**VEGFR1-2:** vascular endothelial growth factor receptor 1-2, υποδοχέας του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα

**bFGF ή FGF-2:** basic Fibroblast Growth Factor, βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών

**TSP-1:** Thrombospondin-1, θρομβοσπονδίνη-1

**CD36:** Cluster of Differentiation 36, τμήμα διαφοροποίησης 36, υποδοχέας θρομβοσπονδίνης

**CD47:** Cluster of Differentiation 47, τμήμα διαφοροποίησης 47, υποδοχέας θρομβοσπονδίνης

**HUVEC:** Human Umbilical Vein Endothelial Cells, ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα από ομφαλική φλέβα

**MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinase, ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση του μιτογόνου

**PCK:** Protein Kinase C, πρωτεϊνική κινάση C

**PLCγ:** Phospholipase C-γ, Φωσφολιπάση C-γ

**JNK:** c-Jun N-terminal kinase, κινάση του N-τελικού άκρου του c-Jun

**PI3K:** phosphatidylinositol-3' kinase, φωσφατιδυλινωσιτόλη-3 κινάση

**HIF-1a:** Hypoxia Inducible Factor, Επαγώγιμος από την υποξία παράγων 1α

**ANGPT1-2:** Angiotensin 1-2, αγγειοποιητίνη 1-2,

**Treg:** T regulatory cells, Τα ρυθμιστικά κύτταρα

**MMPs:** matrix metalloproteinases, μεταλλοπρωτεϊνάσες

**PDGF:** Platelet-derived Growth Factor, παράγοντας διάσπασης των αιμοπεταλίων

**IL-8:** Interleukine-8, Ιντερλευκίνη 8

**TNF-a:** Tumor Necrosis Factor-a, παράγοντας νέκρωσης των όγκων

**NF-κB:** Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, πυρηνικός παράγοντας των ελαφρών κάππα αλυσίδων.

**EGF:** Epidermal growth factor, Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας

**COX-2:** Cyclooxygenase-2, Κυκλοοξυγενάση 2

**TSRs:** thrombospondin structural homology repeats, ομόλογες δομικές επαναλήψεις της θρομβοσπονδίνης

**TGFβ1:** transforming growth factor, Αυξητικός παράγων μετασχηματισμού

**PPARγ:** Peroxisome proliferator-activated receptor γαμμα, ενεργοποιημένος υποδοχέας γάμμα του πολλαπλασιασμού του περοξεισώματος

**BSA:** αλβουμίνη βόειου ορού

**EDTA:** αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ

**TTF:** time-to-treatment failure, ο χρόνος μέχρι αποτυχίας της θεραπείας

**PFS:** progression-free survival, χρονικό διάστημα ελεύθερο εξέλιξης της νόσου

**VRL:** vinorelbine, βινoreλμπίνη

**DVRL:** 4-O-deacetylvinorebine, άλας ενεργού μεταβολίτη της VRL.

**G-CSF:** granulocyte-colony stimulating factor, διεγερτικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων

**HGF:** hepatocyte growth factor, αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων

**GM-CSF:** granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, διεγερτικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Παρά τη μεγάλη πρόοδο στη έρευνα του καρκίνου, τα σημερινά θεραπευτικά πρωτόκολλα δεν κατάφεραν να έχουν ουσιαστικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της πλειονότητας των μεταστατικών καρκίνων. Επιπλέον, η κλασική χημειοθεραπεία αλλά και νεότεροι θεραπευτικοί παράγοντες προκαλούν ανεπιθύμητες παρενέργειες που οδηγούν σε μείωση των χορηγούμενων δόσεων. Επομένως, ήταν επιτακτική ανάγκη η αναζήτηση νέων θεραπευτικών στόχων αλλά και νέων θεραπευτικών στρατηγικών για τη βελτίωση της αντικαρκινικής θεραπείας. Τις τελευταίες δεκαετίες και έπειτα από τις πρωτοπόρες μελέτες του Folkman, η έρευνα στράφηκε στην αγγειογένεση, που πλέον θεωρείται βασικό σημείο-κλειδί στο προχωρημένο και μεταστατικό καρκίνο. Εύλογα η επιστημονική κοινότητα αναθεώρησε τον τρόπο σκέψης, αναπροσάρμοσε τη κλασική χημειοθεραπεία και δημιούργησε νέα θεραπευτικά πρωτόκολλα συχνά προσθέτοντας στη θεραπευτική αγωγή αντιαγγειογενετικούς παράγοντες. Επιπλέον, η ανακάλυψη πως κάποια αντινεοπλασματικά φάρμακα διαθέτουν αντιαγγειογενετικές ιδιότητες όταν χορηγούνται σε μικρές και συχνές δόσεις, οδήγησε σε μια εναλλακτική θεραπευτική στρατηγική, αυτή της μετρονομικής χημειοθεραπείας.

Το 2006, η ερευνητική ομάδα του Ε. Μπριασούλη σε συνεργασία με την Ελληνική Συνεργαζόμενη Ογκολογική Ομάδα ξεκίνησε δυο κλινικές δοκιμές φάσης I και II με από του στόματος χορήγηση VRL σε σχήμα κλασματικής μετρονομικής χορήγησης 3 φορές την εβδομάδα χωρίς διακοπή, σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους. Η κλινική δοκιμή της μετρονομικής VRL καταγράφηκε στο μητρώο κλινικών δοκιμών [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (NCT00278070) και είχε στόχο την ανεύρεση της βέλτιστης δόσης, τον έλεγχο της τοξικότητας, τη φαρμακοκινητική και την ανάδειξη προβλεπτικών μοριακών δεικτών. Στη μελέτη φάσης II, εκτός από τις προηγούμενες παραμέτρους, υπολογίστηκε ο χρόνος μέχρι την αποτυχία της θεραπείας και το διάστημα ελεύθερο προόδου της νόσου.

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης κλινικής δοκιμής, το 2007 ξεκίνησε παράλληλα η παρούσα ερευνητική μελέτη με σκοπό να διερευνήσει τις κυτταρικές και μοριακές επιδράσεις της VRL σε ένα *in vitro* μοντέλο προσομοίωσης μετρονομικής χημειοθεραπείας σε ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και να προσφέρει επιπλέον πειραματικά δεδομένα που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μεταφραστική βάση επεξήγησης των κλινικών αποτελεσμάτων.

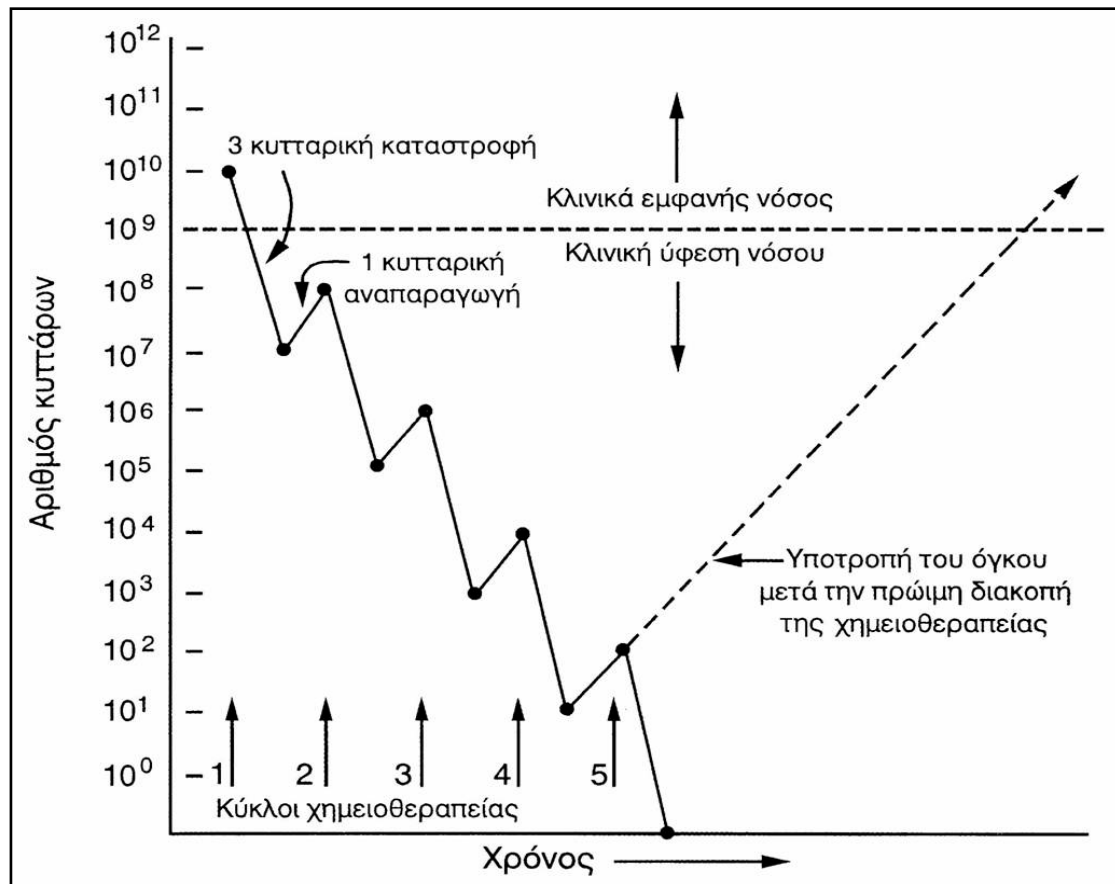
## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.**

Για την ανάπτυξη ενός νεοπλάσματος βασική προϋπόθεση είναι η διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική καταστροφή με αποτέλεσμα, στον κυτταρικό πληθυσμό, ο αριθμός των κυττάρων που παράγονται να υπερσκελίζει τον αριθμό των κυττάρων που πεθαίνουν την ίδια χρονική στιγμή. Τα νεοπλασματικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται όπως και τα φυσιολογικά κύτταρα. Για τον πολλαπλασιασμό τους χρησιμοποιούν τη μιτωτική διαίρεση, κατά τη διάρκεια της οποίας παρατηρούνται διαταραχές των μηχανισμών ελέγχου και αυτορρύθμισης, με αποτέλεσμα από τη μίτωση να προκύπτουν πολυπλοειδικά ή ανευπλοειδικά κύτταρα. Σύμφωνα λοιπόν με τους Hanahan και Weinberg, καθώς τα φυσιολογικά κύτταρα προοδευτικά εξελίσσονται σε μία νεοπλασματική κατάσταση, αποκτούν διαδοχικά συγκεκριμένα χαρακτηριστικά και αποκτούν την ικανότητα να γίνουν καρκινικά. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι: 1) η διατήρηση της σηματοδότησης πολλαπλασιασμού των κυττάρων, 2) η διαφυγή από σήματα καταστολής της ανάπτυξης, 3) η αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο 4) η ενεργοποίηση της αέναης πολλαπλασιαστικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων, 5) η ενεργοποίηση της αγγειογένεσης και 6) η ενεργοποίηση μηχανισμών διήθησης και μετάστασης (1). Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από αυξημένο ποσοστό πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (κλάσμα αύξησης) σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Επομένως, ο πολλαπλασιασμός ενός κυττάρου αλλά και οι μοριακές διαταραχές που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου είναι το πρώτο βήμα για τη δημιουργία ενός όγκου.

### **1.1) Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ- Η ΕΝΝΟΙΑ ΤΟΥ ΛΟΓΑΡΙΘΜΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ.**

Η έννοια του λογαριθμικού θανάτου παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από τους Skipper και συνεργάτες στην προσπάθεια τους να εξηγήσουν γιατί οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι χημειοθεραπείας με κυτταροτοξικά φάρμακα μπορούσαν να εξουδετερώσουν όλα τα καρκινικά κύτταρα ενώ μια εφάπαξ δόση δεν είχε την ίδια αποτελεσματικότητα (2).

Η βασική ιδέα στηρίζεται στο γεγονός ότι μετά από κάθε κύκλο χημειοθεραπείας επιβιώνει πάντα δεδομένος αριθμός νεοπλασματικών κυττάρων που δεν διαφέρουν από τα κύτταρα που καταστράφηκαν από τη χορήγηση του προηγούμενου κύκλου. Επιπλέον, μετά από κάθε κύκλο καταστρέφεται πάντα το ίδιο ποσοστό κυττάρων και όχι ο ίδιος αριθμός. Επίσης, λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται ανάμεσα στους δύο κύκλους και ότι ο νεοπλασματικός πληθυσμός αυξάνεται κατά έναν λογάριθμο, τότε χρειάζονται περίπου 5 κύκλοι θεραπείας για να καταστραφεί και το τελευταίο καρκινικό κύτταρο **(Εικόνα 1)**. Αυτό, όμως, δεν ισχύει σε προχωρημένα στάδια της νόσου καθώς το κλάσμα ανάπτυξης του όγκου μειώνεται και υπάρχει μειωμένη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία.



**Εικόνα 1:** Σχέση ανάμεσα στη χορηγούμενη χημειοθεραπεία και την επιβίωση των κυττάρων (ΦΟΥΝΤΖΗΛΑΣ-Βασικές αρχές θεραπείας του καρκίνου).

## 1.2) ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Το χρονικό διάστημα που παρεμβάλλεται μεταξύ μιας κυτταρικής διαίρεσης-μίτωσης και της επόμενης διαίρεσης ονομάζεται κυτταρικός κύκλος. Ο κυτταρικός κύκλος χαρακτηρίζεται από τη φάση της μίτωσης, τη φάση της σύνθεσης πρωτεϊνών και πυρηνικών οξέων και τα μεταξύ τους μεσοδιαστήματα (χάσματα - gaps). Μετά την ολοκλήρωση της μίτωσης τα κύτταρα είτε συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται μετά από βραχεία ανάπαυλα (G1) είτε μπαίνουν σε μακρύτερο διάστημα αδράνειας (G0). Στη φάση αυτή ένα φυσιολογικό σωματικό κύτταρο χωρίς κυτταρογενετικές ανωμαλίες, θα περιέχει διπλοειδή αριθμό χρωματοσωμάτων και επομένως διπλοειδή ποσότητα DNA.

### 1.2.1) Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Ο χρόνος που μεσολαβεί από το τέλος της μίτωσης μέχρι την έναρξη της επόμενης μίτωσης ονομάζεται μεσόφαση. Η μεσόφαση υποδιαιρείται επιπλέον σε φάσεις-περιόδους, οι οποίες ορίζονται με σημείο αναφοράς το χρόνο σύνθεσης του DNA ως εξής:

**Φάση G1:** Πραγματοποιείται σύνθεση RNA και πρωτεϊνών, χωρίς να γίνεται σύνθεση-αντιγραφή του DNA. Το κύτταρο παρουσιάζει αυξημένη βιοχημική και βιοσυνθετική δραστηριότητα. Η φάση αυτή καταλαμβάνει χρονικά το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού κύκλου. Η απόφαση για την αντιγραφή του DNA λαμβάνεται κατά τη φάση G1. Εάν πληρούνται οι προϋποθέσεις, τότε το κύτταρο περνάει από ένα σημείο δέσμευσης και μετά μεταβαίνει στη φάση S. Το σημείο αυτό ονομάζεται σημείο περιορισμού (restriction point).

**Φάση S:** Η έναρξη της αντιγραφής του DNA σηματοδοτεί τη μετάβαση στη φάση S. Με την ολοκλήρωσή της, το κύτταρο αυξάνει το συνολικό του περιεχόμενο σε DNA από τη διπλοειδή του τιμή (2n) στην αντιγραμμένη (4n). Κατά τη φάση αυτή, λειτουργούν σημεία ελέγχου ώστε να αποτραπεί η συνέχιση της αντιγραφής σε περίπτωση που υπάρχουν βλάβες στο DNA.

**Φάση G2:** Το χρονικό διάστημα από το τέλος της φάσης S μέχρι τη μίτωση ονομάζεται G2. Είναι η μικρότερη φάση του κύκλου, όπου το κύτταρο προετοιμάζεται για την διαίρεση. Υπάρχει σημείο ελέγχου για το σωστό διπλασιασμό του DNA το οποίο παίρνει την απόφαση για να προχωρήσει το κύτταρο στη μίτωση.

**Μίτωση:** Το πρώτο σήμα ότι ένα κύτταρο θα εισέλθει στη φάση M είναι ότι συμπυκνώνεται το γενετικό του υλικό και εμφανίζονται τα χρωμοσώματα. Ο διαχωρισμός των αδερφών χρωματίδων και το μοίρασμα στα δύο θυγατρικά κύτταρα είναι το βασικό γεγονός της μίτωσης και διεκπεραιώνεται από την μιτωτική άτρακτο που αποτελείται από τους μικροσωληνίσκους. Η διαίρεση του κυτταροπλάσματος γίνεται με τη διαδικασία της κυτταροκίνησης με τη βοήθεια του κυτταροσκελετού. Η μίτωση διακρίνεται στη πρόφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση.

Πρόφαση: Τα ινίδια της χρωματίνης συμπυκνώνονται για να πάρουν την κλασική μορφή των χρωμοσωμάτων. Σχηματίζεται η μιτωτική άτρακτος. Τα κεντροσώματα σχηματίζουν τους δυο πόλους της ατράκτου και δημιουργούνται οι μικροσωληνίσκοι οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να αυξάνονται και να βραχύνονται εξαιτίας του πολυμερισμού και αποπολυμερισμού των μορίων της τουμπουλίνης α και β.

Μετάφαση: Ο πυρηνικός φάκελος αποδιατάσσεται και οι μικροσωληνίσκοι μπορούν να προσεγγίσουν τα χρωμοσώματα.

Ανάφαση: Κατά την ανάφαση γίνεται ο αποχωρισμός των δύο αδερφών χρωματίδων που αρχίζουν να μετακινούνται προς τους πόλους με τους μικροσωληνίσκους.

Τελόφαση: Σε κάθε πόλο της ατράκτου συγκεντρώνονται μια όμοια σειρά χρωμοσωμάτων, επανασχηματίζεται ο πυρηνικός φάκελος και τα χρωμοσώματα αρχίζουν να αποσυσπειρώνονται.

**Φάση G0:** Η φάση αδράνειας-ανάπαυσης του κυττάρου. Φαινομενικά είναι μια παρατεταμένη φάση G1 αλλά διαφέρει από αυτήν γιατί τα κύτταρα είναι ανθεκτικά σε κάθε κυτταροτοξικό φάρμακο.

### **1.2.2) Παράγοντες που επιδρούν στον κυτταρικό κύκλο.**

Ο κυτταρικός κύκλος ελέγχεται από σειρά ρυθμιστικών μηχανισμών καθένας από τους οποίους εξαρτάται από την πραγμάτωση κάποιας προηγούμενης διαδικασίας, με αποτέλεσμα η διαταραχή ενός μηχανισμού να οδηγήσει σε μια σειρά απορρυθμίσεων του κύκλου. Κάποιοι από τους παράγοντες που επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο είναι οι εξής:

- Εξωγενείς αυξητικοί παράγοντες.
- Εξωγενείς ανασταλτικοί παράγοντες.
- Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων στην μεμβράνη και στον, πυρήνα.
- Κινάσες-ένζυμα που ελέγχουν διάφορες πρωτεϊνικές λειτουργίες.
- Κυκλίνες-ενδοκυττάριοι ρυθμιστές που ενεργοποιούν τις κινάσες για να επιτύχουν την κυτταρική διαίρεση.
- Ογκοκατασταλτικά γονίδια (3).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΤΙΜΙΤΩΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.**

Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη νέων φαρμάκων, οι στοχευμένες θεραπείες (4) αλλά και οι συνδυασμοί παλαιότερων φαρμάκων σε νέα θεραπευτικά πρωτόκολλα, φαίνεται να βοήθησαν στην εξέλιξη των αντικαρκινικών θεραπειών (5). Η φαρμακευτική αντιμετώπιση του καρκίνου συνεχίζει να βασίζεται στην κλασική-συμβατική (conventional) χημειοθεραπεία (ΚΧ), δηλαδή στην κυκλική χορήγηση κυτταροτοξικών φαρμάκων στις μέγιστες ανεκτές δόσεις (maximum tolerated dose, MTD) που στοχεύουν στην μέγιστη αναστολή του πολλαπλασιασμού των ταχέως αναπτυσσόμενων καρκινικών κυττάρων (6) και την επαγωγή της απόπτωσής τους. Για να πετύχει όμως το σκοπό της, η κλασική χημειοθεραπεία οφείλει να ισορροπεί ανάμεσα στο μέγιστο θεραπευτικό όφελος και στην μικρότερη τοξικότητα των κυτταροτοξικών φαρμάκων στους φυσιολογικούς ιστούς. Επομένως, είναι απαραίτητη η μεσολάβηση ενός χρονικού διαστήματος 2-3 εβδομάδων ανάμεσα σε κάθε κύκλο χορήγησης μέγιστης ανεκτής δόσης, για να μπορέσουν να ανανήψουν οι πολλαπλασιαζόμενοι φυσιολογικοί ιστοί και τα προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών (2). Δυστυχώς, παρά την εκτεταμένη εφαρμογή της και την τεκμηριωμένη δραστηριότητα, η κυκλική-κλασική χημειοθεραπεία δεν κατάφερε να παρατείνει σημαντικά την επιβίωση των ασθενών με μεταστατικούς καρκίνους (7). Υποστηρίζεται λοιπόν, ότι τα μεσοδιαστήματα της κυκλικής χημειοθεραπείας αποτελούν βασικό μειονέκτημα, καθώς δίνεται η δυνατότητα επανεποικισμού των όγκων με ανθεκτικότερους και ταχύτερα αναπτυσσόμενους κλώνους (8).

Την αποτελεσματικότητα της κλασικής χημειοθεραπείας μπορούν να επηρεάσουν διάφοροι παράγοντες όπως: η ετερογένεια και η γονιδιωματική αστάθεια των καρκινικών κυττάρων, η προστατευτική δράση του μικροπεριβάλλοντος και η καταστολή της ανοσολογικής απάντησης (9). Βασική γνώση, αποτελεί το γεγονός ότι οι περισσότεροι συμπαγείς όγκοι είναι αποτέλεσμα πολλαπλών γενετικών ανωμαλιών και περιέχουν ετερογενείς υποπληθισμούς κυττάρων με διαφορετικές ικανότητες όσον αφορά στην κινητική, στο μεταστατικό και διηθητικό δυναμικό και στην

αγγειογένεση (10). Επιπλέον, μετά από ένα χρονικό διάστημα χημειοευαισθησίας, το οποίο ποικίλλει, τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα κυτταροτοξικά φάρμακα που προκαλούν βλάβες στο DNA, γεγονός που σχετίζεται με την υποκείμενη γονιδιωματική αστάθεια (11). Επίσης, η κυκλική χημειοθεραπεία είναι πιο αποτελεσματική στους πρωτοπαθείς όγκους παρά στις μεταστάσεις (12). Τέλος, οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο μικροπεριβάλλον και στον όγκο παίζουν καθοριστική σημασία στην ανάπτυξη του όγκου, στη διηθητικότητα, στη μετάσταση αλλά και στην ανταπόκριση στη θεραπεία. Η αλληλεπίδραση αυτή καθορίζεται μέσω ενζύμων και κυτταροκινών, τα οποία σηματοδοτούν τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την αγγειογένεση (13).

Τις τελευταίες δεκαετίες, εκτεταμένες έρευνες πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς της αγγειογένεσης. Οι πρωτοπόρες μελέτες του Folkman και των συνεργατών του, βοήθησαν στην ανάπτυξη αντι-αγγειογενετικών παραγόντων αλλά και στην επαναξιολόγηση παλαιότερων κλασικών κυτταροτοξικών φαρμάκων, τα οποία δεν είναι δραστικά μόνο απέναντι στα καρκινικά κύτταρα αλλά και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων των όγκων (14). Ανάμεσα στα κυτταροτοξικά φάρμακα που έχουν αντι-αγγειογενετικές ικανότητες, αυτά που στοχεύουν τους μικροσωληνίσκους (microtubule-targeting agent-MTAs) φαίνεται να πλεονεκτούν (15). Τα MTAs χωρίζονται σε δυο βασικές κατηγορίες: σε αυτά που σταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους (microtubule stabilizing) και διατηρούν σταθερό τον πολυμερισμό τους όπως είναι οι ταξάνες και σε αυτά που αποπολυμερίζουν τους μικροσωληνίσκους όπως είναι τα αλκαλοειδή της Vinca rosea. Με αυτόν τον τρόπο παρεμβαίνουν ανασταλτικά στη δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου στα καρκινικά κύτταρα, και μέσω αυτού του μηχανισμού παρακωλύουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και δυνητικά επάγουν απόπτωση (16).

### **2.1) Μηχανισμοί δράσεις των MTAs.**

Η αγγειογένεση στον καρκίνο είναι μια πολύπλοκη διαδικασία με πολλά και αλληλεξαρτώμενα στάδια, στα οποία εμπλέκονται τόσο τα καρκινικά όσο και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έχει αποδειχθεί λοιπόν, ότι τα MTAs μπορούν να δράσουν

στα διάφορα στάδια και να την αναστείλουν, ασκώντας είτε άμεσα είτε έμμεσα αντι-αγγειογεννητικές επιδράσεις. Την τελευταία εικοσαετία, η έρευνα για τα MTAs αποκάλυψε ότι μπορούν να επηρεάσουν την ικανότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων να πολλαπλασιαστούν, να μεταναστεύσουν, να δημιουργήσουν αγγειακές δομές και να διασπάσουν την βασική μεμβράνη (17, 18) Σε μερικές έρευνες, τα MTAs φάνηκε πως διαθέτουν μια επιπλέον ιδιότητα που εκφράζεται μέσω του αποπολυμερισμού των μικροσωληνίσκων, με αποτέλεσμα να αλλάζει δραματικά η μορφολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων και να οδηγεί σε καταστροφή του αγγειακού δικτύου του όγκου γεγονός που συμβαίνει σε υψηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου (19). Αντίθετα, πλειάδα αντιαγγειογεννητικών δράσεων των φαρμάκων αυτών παρατηρούνται όταν χρησιμοποιούνται είτε σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις είτε για παρατεταμένο χρονικό διάστημα έκθεσης (20). Βρέθηκε λοιπόν, ότι τα MTAs μπορούν να αναστείλουν την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και το σχηματισμό μικρών αγγείων, σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις χωρίς να επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό αλλά ούτε και τις δομές του κυτταροσκελετού (21). Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα αντιμιτωτικά φάρμακα φαίνεται να επιτυγχάνουν τη δράση τους χωρίζονται σε άμεσους και έμμεσους.

Στους **άμεσους** μηχανισμούς ανήκουν κυρίως:

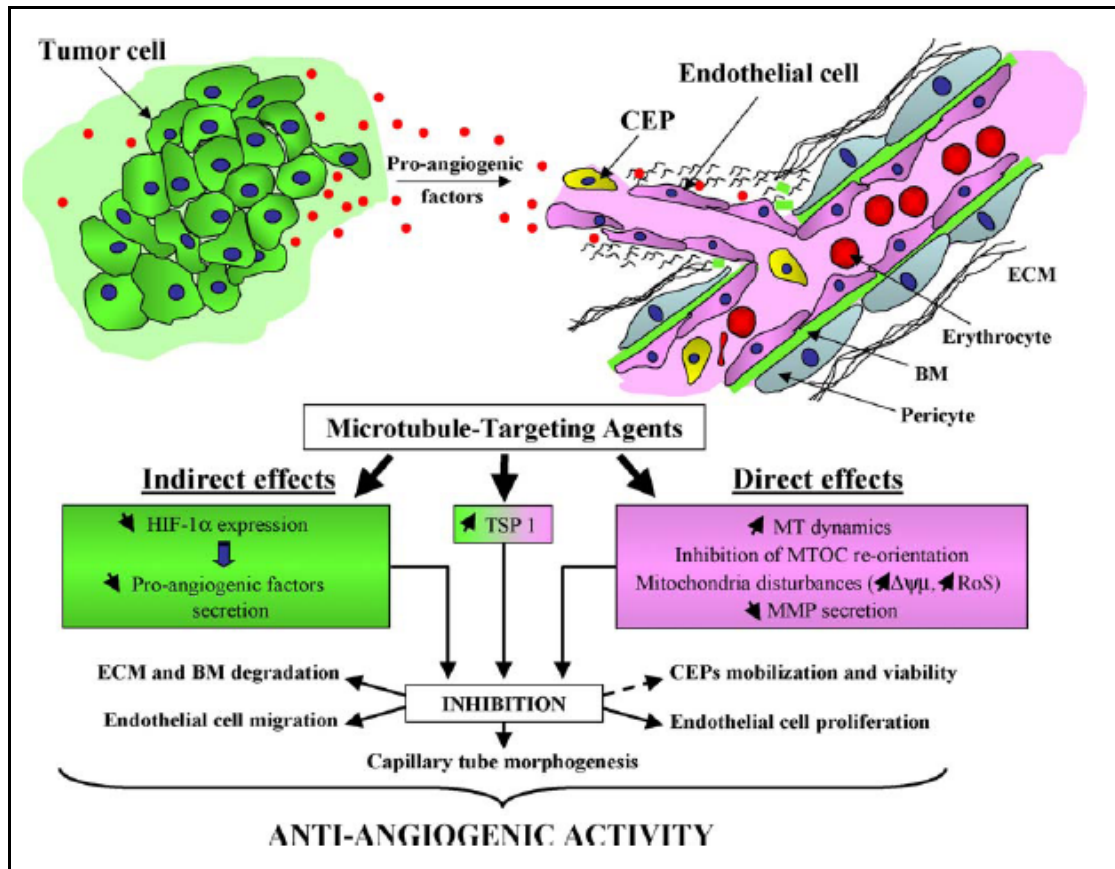
1. Η καταστροφή στο οργανωτικό κέντρο των μικροσωληνίσκων (MTCO) και η διαταραχή στη πλαστικότητα (MT plasticity) του κυτταροσκελετού (22).
2. Η αύξηση στη δυναμική αστάθεια του κυτταροσκελετού (MT dynamic instability) που σχετίζεται με την αναστολή της κυτταρικής κινητικότητας (21).

**Άλλοι μηχανισμοί** που σχετίζονται με τις αντιαγγειογεννητικές δράσεις των MTAs είναι:

- Η αναστολή του πολυμερισμού της ακτίνης με αποτέλεσμα τον περιορισμό της κυτταρικής κινητικότητας (23).
- Αναστολή σηματοδοτικών μονοπατιών (24).
- Μείωση των τοπικών συνδέσεων προσκόλλησης (25).

- Μείωση των ενώσεων των μορίων VE- cadherin (26).
- Έναρξη-ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού χωρίς όμως την ολοκλήρωσή του, μέσω παροδικής αύξησης του λόγου έκφρασης των Bax/Bcl-2 (18).
- Μείωση της κινητικότητας και της βιωσιμότητας των CEPs (27).
- Μείωση των επιπέδων των προ-αγγειογενετικών παραγόντων, όπως ο VEGF και ο FGF-2 (28).

Ήδη από το 1996, ο Belloti απέδειξε ότι τα πιο σημαντικά και εντυπωσιακά αποτελέσματα της αντιαγγειογενετικής δράσης των MTAs παρατηρήθηκαν *in vitro*, όταν αυτά χορηγήθηκαν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αργότερα, τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσαν και *in vivo* μελέτες, χορηγώντας αντιμιτωτικά φάρμακα σε πολύ χαμηλές δόσεις-μη τοξικές (πολύ χαμηλότερες από τη MTD) για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα σε ποντίκια. Αυτός ο τρόπος χορήγησης ονομάστηκε «μετρονομική χημειοθεραπεία» (29) και αποτέλεσε πεδίο έρευνας τα τελευταία χρόνια.



**Εικόνα 2:** Μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντιαγγειογενετική δράση των MTAs (30). Το σχήμα παρουσιάζει τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην αγγειογένεση του όγκου (κορυφή) και αυτούς που περιλαμβάνονται στην αντιαγγειογενετική δράση των MTDs (βάση). Μόλις συμβεί η αγγειογενετική έναρξη (angiogenic switch), η έκκριση των προαγγειογενετικών παραγόντων αυξάνεται, οδηγώντας σε ενεργοποίηση των γειτονικών ενδοθηλιακών κυττάρων. Η ενεργοποίηση οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, μετανάστευση, διάσπαση της βασικής μεμβράνης (basement membrane–BM) και τελικά στο σχηματισμό μικρών αγγειακών δομών. Τα κυκλοφορούντα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (Bone-marrow-derived circulating endothelial progenitor cells –CEPs) συμμετέχουν επίσης στην αγγειογένεση του όγκου. Οι δράσεις των MTDs μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε άμεσες, όταν δρουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα και έμμεσες όταν δρουν στα καρκινικά κύτταρα. Οι επιδράσεις της θρομβοσπονδίνης (TSP-1) είναι μεικτές καθώς σχετίζονται με τα ενδοθηλιακά και τα καρκινικά κύτταρα. Όλα αυτά οδηγούν στην αναστολή της αγγειογένεσης μέσω αναστολής της μετανάστευσης, του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης καθώς και της διάσπασης της βασικής μεμβράνης.

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Με τον όρο μετρονομική χημειοθεραπεία (MTX) εννοούμε τη χημειοθεραπεία που χαρακτηρίζεται από τη ρυθμική, αδιάλειπτη χορήγηση κυτταροτοξικών φαρμάκων σε πολύ χαμηλές, υποτοξικές δόσεις και για μακροχρόνιο διάστημα. Αποτελεί εναλλακτική θεραπευτική επιλογή, με διαφορετικό σχεδιασμό στη χορήγηση, στη διάρκεια αλλά και στη συγκέντρωση του φαρμάκου σε σύγκριση με την κλασική χημειοθεραπεία (KX). Όπως ήδη αναφέρθηκε, στη κλασική χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται η μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση του φαρμάκου (MTD), ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (συνήθως 2-4 εβδομάδων), για καθορισμένο χρόνο. Η χρονική απόσταση ανάμεσα στους κύκλους είναι απαραίτητη για να επανέλθουν οι φυσιολογικοί ιστοί από την κατασταλτική δράση των κυτταροτοξικών φαρμάκων. Σε αντίθεση, στην MTX, υποτοξικές συγκεντρώσεις φαρμάκου χορηγούνται σε πολύ πυκνά χρονικά διαστήματα και μακροχρόνια, χωρίς να υπάρχει ανάγκη διαλείμματος για την ανάκαμψη των φυσιολογικών ιστών. Ουσιαστικά, η έννοια της μετρονομικής χημειοθεραπείας προέκυψε από την ανάγκη να καλυφθούν τα μειονεκτήματα της KX και είναι αρκετά πρόσφατη, καθώς υπάρχει στη βιβλιογραφία τα τελευταία 30 χρόνια. Στη δημιουργία της συνέβαλλαν οι γνώσεις πάνω στην αγγειογένεση των καρκινικών όγκων, που προήλθαν από την πρωτοπόρα έρευνα του Folkman και των συνεργατών του. Το 1991, ο Kerbel διατύπωσε πως τα αντικαρκινικά φάρμακα θα μπορούσαν να στοχεύσουν την αγγείωση του όγκου, καθώς το τοίχωμα τους αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα και αυτά είναι ανώριμα και πολλαπλασιαζόμενα (31). Δέκα χρόνια αργότερα, οι Klement (32) και Browder (33) απέδειξαν την ανταπόκριση του όγκου στη MTX σε ποντίκια, ακόμα και μετά από τη φάση αντίστασης στη KX, ενώ σημαντικά δεδομένα προστέθηκαν και με τις μελέτες του Hanahan (29), ο οποίος επινόησε και τον όρο της μετρονομικής χημειοθεραπείας.

### 3.1) ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ

Όπως έχει αποδειχθεί μέχρι τώρα, η θεραπεία του καρκίνου για να είναι αποτελεσματική πρέπει να μπλοκάρει πολλούς και διαφορετικούς στόχους όπως:

- καρκινικά και καρκινικά βλαστικά κύτταρα
- αγγείωση του όγκου
- στρώμα του όγκου (ινοβλάστες και μεσεγχυματικά κύτταρα)
- κύτταρα ανοσίας
- εξωκυττάρια ουσία

Η κλασική χημειοθεραπεία έχει σαν κύριο στόχο τα καρκινικά κύτταρα με ταυτόχρονη παράπλευρη ανεπιθύμητη δράση την μερική καταστροφή των υγιών φυσιολογικών ιστών λόγω τοξικότητας. Αντίθετα, η μετρονομική χημειοθεραπεία με τη συνεχόμενη χορήγηση μικρών δόσεων κυτταροτοξικών φαρμάκων φαίνεται να δρα σε περισσότερους από έναν στόχους (34) και με διαφορετικούς μηχανισμούς.

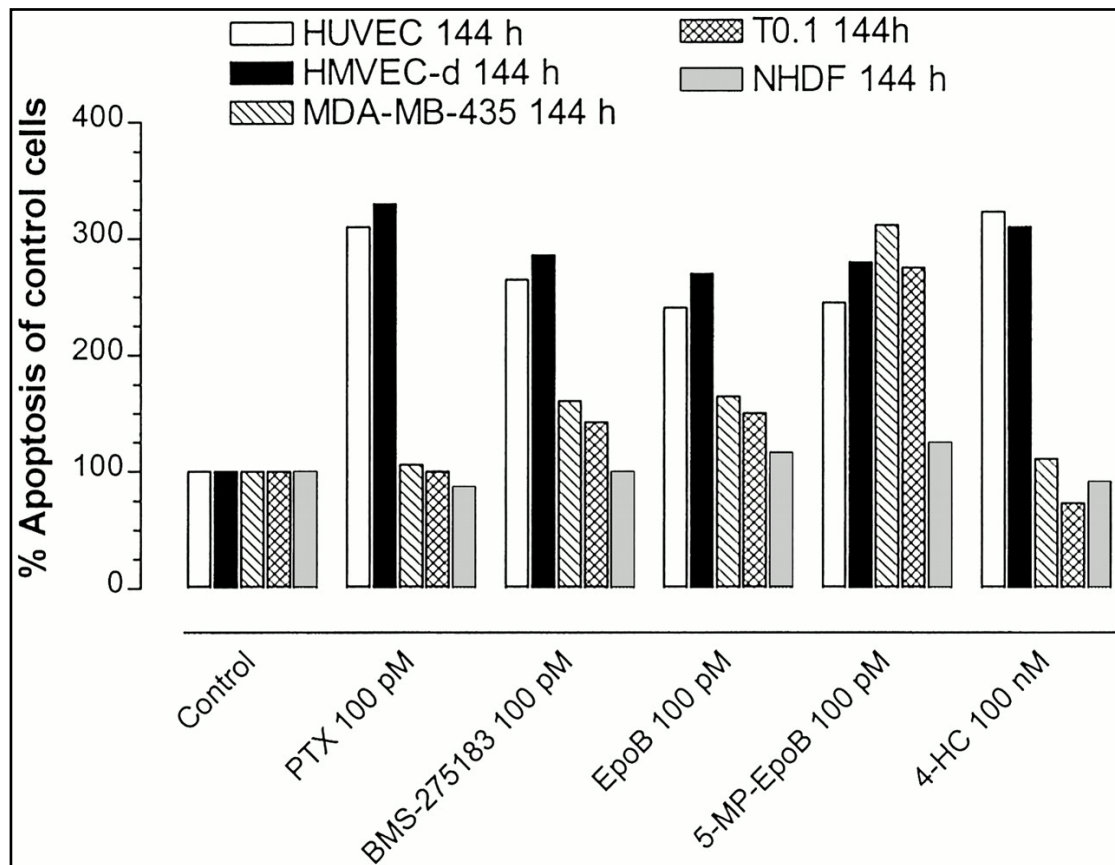
#### 3.1A) Αντιαγγειογενετική δράση.

Σύμφωνα με τις μελέτες του Folkman, η ανάπτυξη ενός όγκου καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητα για αγγειογένεση (δημιουργία νέων αγγειακών κλάδων από τα ήδη υπάρχοντα). Τα αντιμιτωτικά φάρμακα στοχεύουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού δικτύου των όγκων, τα οποία είναι ταχέως πολλαπλασιαζόμενα, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα, και γενετικά πιο σταθερά σε σχέση με τα καρκινικά κύτταρα (31, 35). Αρχικά, ο Browder, απέδειξε πως η κυκλοφωσφαμίδη μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων των όγκων και κατά συνέπεια να μειώσει την αγγειογένεση στα ποντίκια, όταν τη χορήγησε ανά κύκλους. Όμως, παρατήρησε αργότερα, πως το φαινόμενο αυτό ήταν αναστρέψιμο, καθώς στο χρονικό διάστημα που μεσολαβούσε ανάμεσα

στους κύκλους ήταν αρκετό για την επιδιόρθωση των αγγείων. Έτσι, σκέφτηκε να χορηγήσει τη κυκλοφωσφαμίδη σε πιο τακτά χρονικά διαστήματα και σε μικρότερες συγκεντρώσεις με εντυπωσιακά αποτελέσματα όσον αφορά στη σμίκρυνση του όγκου (33). Την ίδια περίοδο, η Klement και οι συνεργάτες προχώρησαν ένα βήμα παρακάτω, συνδυάζοντας τη μετρονομική χημειοθεραπεία μαζί με αντι-αγγειογενετικά μόρια (32). Κατέληξαν λοιπόν στο συμπέρασμα, πως η MTX οδηγεί σε απόπτωση τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων των όγκων και με έμμεσο τρόπο στην υποστροφή τους, γεγονός που εξηγεί πως η MTX μπορεί να ξεπεράσει τη αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στα κυτταροτοξικά φάρμακα. Φαίνεται λοιπόν, πως η MTX αξιοποιεί κάποιες από τις ιδιότητες των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων των όγκων που αφορούν στη κινητική και στη φυσιολογία με σκοπό το θεραπευτικό όφελος. Οι ιδιότητες αυτές είναι:

- Η αγγείωση των όγκων είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητά τους (36).
- Το ενδοθήλιο των αγγείων των όγκων βρίσκεται σε κατάσταση ασταθούς πολλαπλασιασμού (37).
- Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα των όγκων έχουν σημαντικά πιο γρήγορους ρυθμούς πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα (38). Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί με πειραματικά μοντέλα, ότι ο χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού του ενδοθηλίου των μικροαγγείων των όγκων είναι αρκετά μικρός (εκατοντάδες φορές) σε σχέση με το χρόνο διπλασιασμού των φυσιολογικών ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτό συνεπάγεται ότι η τακτική-συνεχόμενη χορήγηση ενός κυτταροτοξικού φαρμάκου, δεν αφήνει χρόνο για την ανάκαμψη του ενεργοποιημένου ενδοθηλίου του όγκου.
- Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκτίθενται άμεσα στις συγκεντρώσεις των φαρμάκων σε αντίθεση με τα καρκινικά, όπου είναι απαραίτητη η διείσδυση μέσω βασικής μεμβράνης (39).
- Τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν περιορισμένους μηχανισμούς ανάπτυξης αντοχής (40).

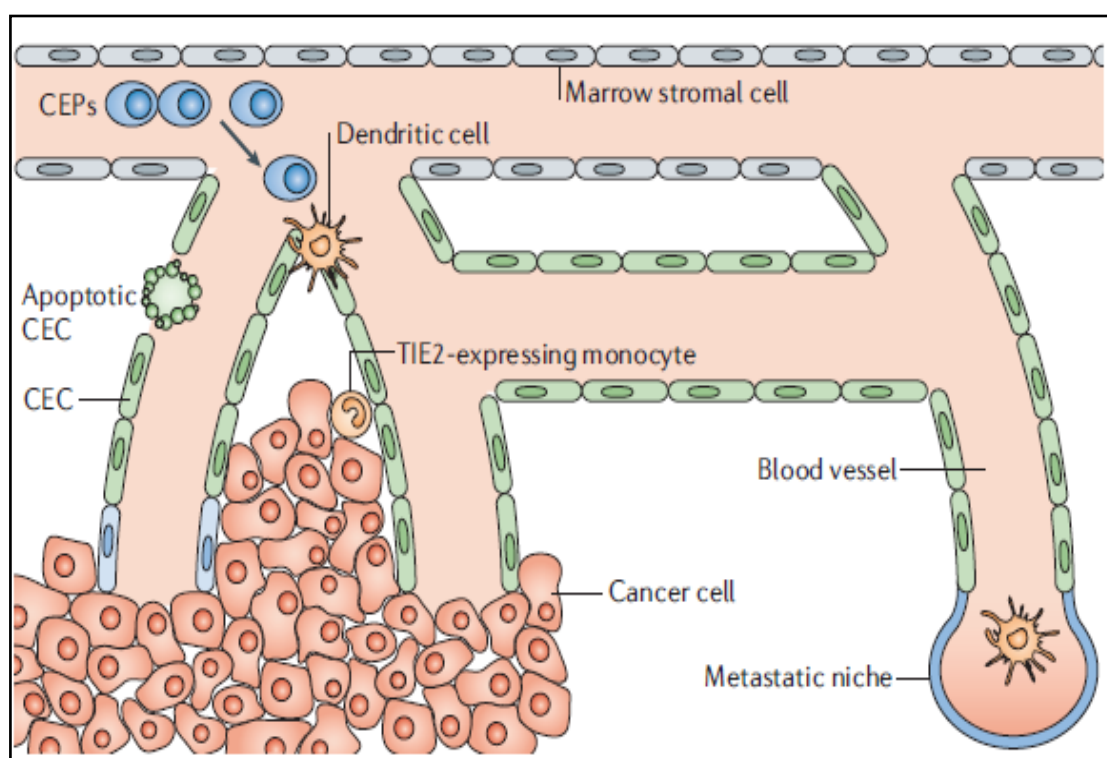
- Τα νεοπλασματικά ενδοθηλιακά κύτταρα είναι ευαίσθητα σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις κυτταροτοξικών φαρμάκων (20, 39).



**Εικόνα 3:** Διαφορές ευαισθησίας ενδοθηλιακών κυττάρων και νεοπλασματικών κυττάρων μετά από έκθεση σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις κυτταροτοξικών φαρμάκων (39). Συγκεκριμένα περιγράφεται το % των αποπτωτικών κυττάρων μετά από 114 ώρες έκθεση σε χαμηλής συγκέντρωσης χημειοθεραπευτικού φαρμάκου σε διάφορων ειδών κύτταρα όπως HUVEC, HMVEC-d, MDA-MB-435, T0.1 and NHDF. Η απόπτωση μελετήθηκε με τη μέθοδο ELISA (Cell Death ELISA kit) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό επί τις εκατό των αποπτωτικών κυττάρων της ομάδας ελέγχου (control).

### 3.1A.1) Μετρονομική Χ/Θ και CEP.

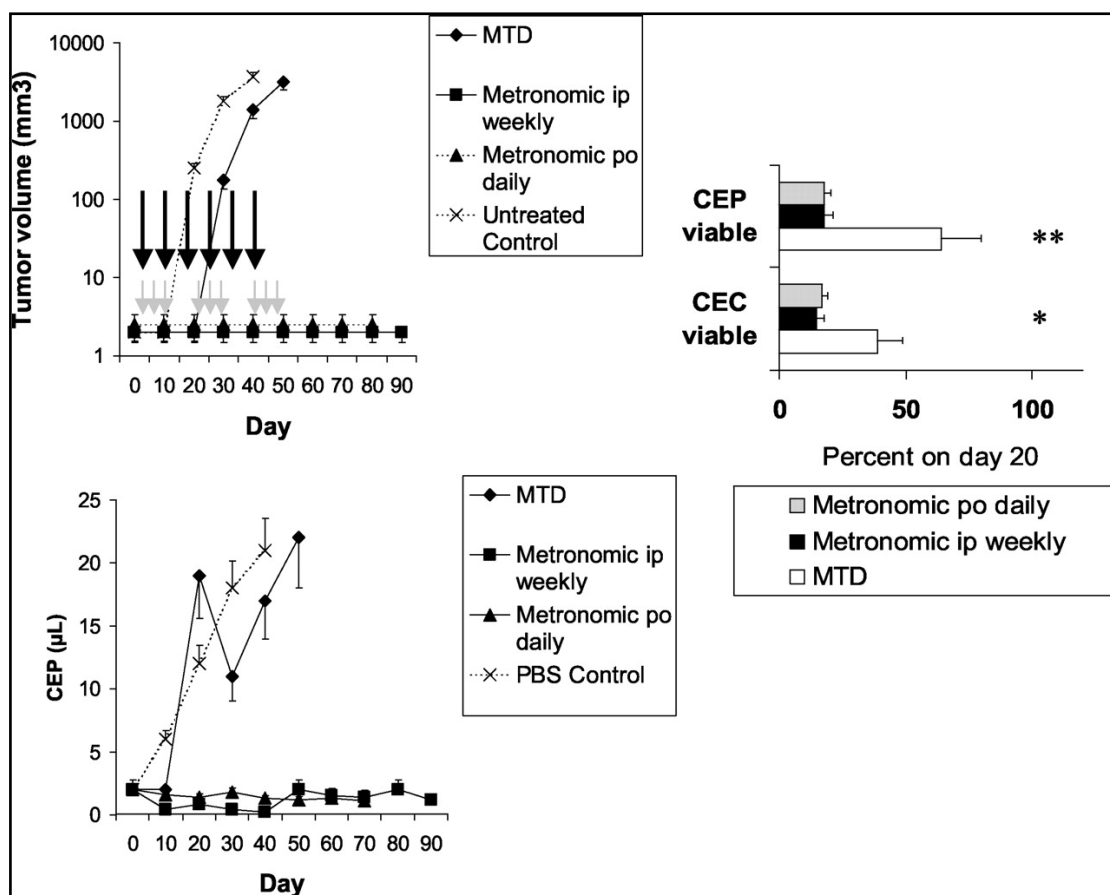
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ένα από τα μειονεκτήματα της κλασικής χημειοθεραπείας είναι το μεσοδιάστημα ανάμεσα στους κύκλους χημειοθεραπείας. Έχει τεκμηριωθεί στη βιβλιογραφία πως, κατά το χρονικό αυτό διάστημα, παρατηρείται κινητοποίηση προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων από το μυελό των οστών στο περιφερικό αίμα, συνέπεια της καταστολής του μυελού από τη χημειοθεραπεία (41). Η κινητοποίηση των CEP έχει μελετηθεί ευρέως και υπάρχουν πλέον ενδείξεις πως σχετίζεται με την ανάπτυξη όγκων σε προκλινικά μοντέλα (42, 43). Επιπλέον, τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά αλλά και τα κυκλοφορούντα προγονικά κύτταρα φαίνεται πως αυξάνονται σε προκλινικά καρκινικά μοντέλα (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4:** Ο ρόλος των CEPs στην αγγειογένεση του καρκίνου (44). Κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα (CECs) με ώριμο φαινότυπο, που παράγονται από το τοίχωμα των αγγείων, αυξάνονται στους ασθενείς με συγκεκριμένους τύπου καρκίνο. Ο ρόλος των κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων (CEPs) διαφέρει ανάλογα το καρκίνο αλλά και το στάδιο. Επίσης, ρόλο στη δημιουργία αγγειακών δομών και στην εξάπλωση παίζουν και άλλα κύτταρα όπως τα δένδριτικά (dendritic cells), μονοκύτταρα που εκφράζουν TIE2 ή κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα VEGFR1 και δημιουργούν μεταστατικές φωλιές.

Το ερώτημα που τέθηκε λοιπόν είναι κατά πόσο η MTX μπορεί να υπερσκελίσει το εμπόδιο των κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών και προγονικών κυττάρων. Αρχικά, απάντηση έδωσαν οι μελέτες του Bertolini. Η ομάδα του το 2003, σε πειράματα που πραγματοποίησε σε ποντίκια με τη βοήθεια καρκινικών μοντέλων προσπάθησε να διαπιστώσει εάν η κυκλοφωσφαμίδη επιδρά διαφορετικά στα CEP, όσον αφορά στην κινητοποίηση τους, χορηγώντας την με διαφορετικά δοσολογικά σχήματα-μοντέλα. Παρατήρησε λοιπόν, πως η χορήγηση της κυκλοφωσφαμίδης με τη MTD δεν εμπόδισε την ανάπτυξη του όγκου και προκάλεσε μεγάλη αύξηση στα CEP. Αντίθετα, στα ποντίκια που έλαβαν μετρονομική κυκλοφωσφαμίδη, παρατηρήθηκε μεγάλη καθυστέρηση στην ανάπτυξη του όγκου, και τα επίπεδα των CEP ήταν μειωμένα σε σχέση με αυτά της συμβατικής- κλασικής χημειοθεραπείας **(Εικόνα 5)**.

Παρόμοια αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την υπόθεση και κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η MTX δεν κινητοποιεί τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα και αυξάνει σε κάποιες περιπτώσεις την απόπτωσή τους. Το γεγονός αυτό αποτελεί ισχυρό στοιχείο της αντιαγγειογενετικής δράσης της MTX μέσω καταστολής της δημιουργίας νέων αγγείων των καρκινικών όγκων.



**Εικόνα 5:** Επίδραση μετρονομικής χημειοθεραπείας σε κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά (CEC) και προγονικά ενδοθηλιακά (CEP) κύτταρα έναντι της επίδρασης συμβατικής χημειοθεραπείας (MTD) (27). Στο διάγραμμα πάνω αριστερά παρουσιάζεται το μέγεθος του όγκου ενώ κάτω αριστερά η κινητική των CEP. Τα γκρι βέλη αντιστοιχούν στη χορήγηση της MTD ενώ τα μαύρα στη μετρονομική θεραπεία. Στα δεξιά παρουσιάζεται η συχνότητα των ζώντων CEC και CEP την 20<sup>η</sup> μέρα.

### 3.1A.2) Μετρονομική Χ/Θ και παράγοντες αγγειογένεσης.

Ένας από τους μηχανισμούς δράσης των αντιμιτωτικών φαρμάκων είναι η μείωση της έκκρισης αντιαγγειογενετικών παραγόντων όπως είναι ο VEGF και ο FGF-2. Εκτός από τη δράση τους ως αυξητικοί παράγοντες, είναι γνωστό ότι προστατεύουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα από την απόπτωση, ενεργοποιώντας τα μονοπάτια της MAPK, JNK και PI3K, και αυξάνοντας την Bcl-2 και την survivin (45, 46). Σε

προηγούμενο κεφάλαιο αναφέρθηκε πως πολλές από τις αντιαγγειογενετικές δράσεις των αντιμιτωτικών φαρμάκων εκδηλώνονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Για παράδειγμα, ο Lau το 1999 απέδειξε πως πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της πακλιταξέλης αναστέλλουν την αγγειογένεση σε ποντίκια μέσω αρνητικής ρύθμισης του VEGF (47). Παρόμοια δράση φαίνεται πως έχουν και η δοσιταξέλη και η βινκριστίνη που δοκιμάστηκαν σε λευχαιμικά T-κύτταρα (48). Λίγο αργότερα, μελέτες εξήγησαν πως, η αναστολή της δράσης του VEGF είναι αποτέλεσμα της αναστολής της δράσης του HIF-1α, που αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα που εκλύεται στην υποξία (49). Τα αποτελέσματα αυτά ενίσχυσε και πρόσφατη μελέτη που χρησιμοποίησε τη δοξορουμπικίνη σε μετρονομικές συγκεντρώσεις, μπλοκάροντας τη σύνδεση του HIF-1α στο DNA αναστέλλοντας τη μετάφραση των γονιδίων αγγειογενετικών παραγόντων (50). Η αναστολή του HIF-1α αυξάνει την καταστροφή στο αγγειακό δίκτυο του όγκου και βοηθά στην μείωση της αντίστασης στις αγγειογενετικές θεραπείες (51).

Ένας ακόμα μηχανισμός που επεξηγεί τις αντιαγγειογενετικές δράσεις των MTAs και της μετρονομικής χημειοθεραπείας είναι η επαγωγή της έκφρασης της TSP-1. Η TSP-1 αποτελεί ενδογενή αναστολέα της αγγειογένεσης που δρα μέσω σύνδεσης στον υποδοχέα CD36, που εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα (52). Οι περισσότερες μελέτες που αφορούσαν την TSP-1 και το ρόλο της στη μετρονομική θεραπεία, πραγματοποιήθηκαν με τη κυκλοφωσφαμίδη (53). Ο Bocci παρατήρησε πως η μακροχρόνια έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις κυκλοφωσφαμίδης αλλά και πακλιταξέλης οδήγησαν σε αύξηση της έκφρασης και έκκρισης της TSP-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα την αύξηση της επιβίωσης. Ένα χρόνο αργότερα, ο Hamano κατέστειλε την έκφραση της TSP-1 σε ποντίκια, τους εμφύτευσε καρκινικούς όγκους και τους χορήγησε μετρονομικά κυκλοφωσφαμίδη. Απέδειξε έτσι την προτίμηση της μετρονομικής χημειοθεραπείας και των MTAs στα ενδοθηλιακά κύτταρα και ανέδειξε την TSP-1 ως τον κυριότερο διαμεσολαβητή της μετρονομικής χημειοθεραπείας (54). Οι επιδράσεις της TSP-1 μπορεί να είναι άμεσες ή έμμεσες καθώς η επαγωγή της παρατηρείται στα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro* (53), στα καρκινικά και στα κύτταρα γύρω από τα αγγεία (54). Επιπλέον, μελέτες υποστηρίζουν πως σε εκείνους τους όγκους που τα επίπεδα της TSP-1 είναι μειωμένα, χαμηλές συγκεντρώσεις πακλιταξέλης και κυκλοφωσφαμίδης μπορούν να

επάγουν εκ νέου την έκφρασή της (55). Τέλος, η αύξηση της έκφρασης της TSP-1 συσχετίστηκε με την ελάττωση της κινητοποίησης και της βιωσιμότητας των CEP, που παρατηρήθηκε μετά από την επίδραση της MTX (27, 56). Συμπερασματικά, η αντιαγγεογενετική δράση των MTAs εκδηλώνεται με ποικίλους μηχανισμούς, είτε άμεσους είτε έμμεσους, που αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους, και τους οποίους εκμεταλλεύεται η μετρονομική χημειοθεραπεία. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ακόμα μοριακά μονοπάτια που δεν έχουν ανακαλυφθεί και που απαιτούν περισσότερη έρευνα.

### **3.1B) Ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας.**

Αυξανόμενα στοιχεία που έρχονται στη βιβλιογραφία, αναφέρουν πως το ανοσοποιητικό σύστημα παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αλλά και στον έλεγχο του καρκίνου. Αρχικά ο Dunn (57) και αργότερα ο Hanahan (58), πρότειναν τη διαφυγή του καρκίνου από τον έλεγχο της ανοσίας ως το 7<sup>ο</sup> χαρακτηριστικό του καρκίνου. Εκτός των γνωστών παρενεργειών των κυτταροτοξικών φαρμάκων στο ανοσοποιητικό σύστημα, φαίνεται πως υπάρχουν και άλλες που σχετίζονται με τα T ρυθμιστικά κύτταρα ( $T_{reg}$ ) και εκδηλώνονται με τη δράση της μετρονομικής χημειοθεραπείας. Τα  $T_{reg}$  είναι  $CD4^+CD25^+$  λεμφοκύτταρα, τα οποία αναστέλλουν την ανοσολογική απάντηση είτε μέσω κυτταροκινών είτε μέσω κυτταρικής επαφής (59). Τα  $T_{reg}$  επομένως, έχουν την δυνατότητα να επιδρούν και να καταστέλλουν τη δράση των ειδικών του όγκου  $CD8^+$  T λεμφοκυττάρων, των  $CD4^+$  T βοηθητικών λεμφοκυττάρων αλλά και μη ειδικών κυττάρων όπως είναι τα T-φυσικοί δολοφόνοι κύτταρα (natural killer cells). Ελάττωση της δραστηριότητας ή και μείωση των  $T_{reg}$  μπορεί να αυξήσει την ανοσολογική απάντηση στα σχετιζόμενα με τον όγκο αντιγόνα (59). Επιπλέον, η αύξηση των  $T_{reg}$  σχετίζεται με την εξέλιξη του όγκου και τη μη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία (60).

Σε μετέπειτα μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν σε ζώα με καρκινικούς όγκους, αποδείχθηκε ότι οι χαμηλές δόσεις κυκλοφωσφαμίδης μειώνουν τον αριθμό και αναστέλλουν τις ανοσοκατασταλτικές δράσεις των  $T_{reg}$  cells. Επιπλέον, αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και τα κύτταρα μνήμης (61). Εκτός της

κυκλοφωσφαμίδης και η τεμοζολαμίδα προκαλεί μείωση στον αριθμό και αναστολή της δραστηριότητας των  $T_{reg}$  cells, όταν δίνεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε αρουραίους με γλοίωμα (62). Πρέπει να τονίσουμε πως η επίδραση στα  $T_{reg}$  cells είναι ειδική καθώς δεν παρατηρήθηκε μείωση στους άλλους τύπους κυττάρων ανοσίας (63). Επίσης, η μείωση στον αριθμό και η αναστολή της δράσης των  $T_{reg}$  cells παρατηρείται μόνο όταν τα φάρμακα δίνονται στις χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ όταν δίνονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρείται μείωση όλων των σειρών. Με τα αυξανόμενα στοιχεία που προκύπτουν από τις νεότερες μελέτες καταλήγουμε στο συμπέρασμα, πως τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε μετρονομικά μοντέλα, μπορούν να δράσουν μέσω αποκατάστασης της ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού στον καρκίνο.

### **3.1Γ) Επαγωγή της κατάστασης αδράνειας του όγκου (Tumor dormancy).**

Πειραματικά και κλινικά δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη αλλά και το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η κατάσταση αδράνειας του όγκου, στην αναστολή της ανάπτυξης αλλά και στην υποτροπής του (64). Η κατάσταση της αδράνειας παρατηρείται στη πρώιμη φάση του καρκίνου, πριν το σημείο αλλαγής για την έναρξη της αγγειογένεσης (angiogenic switch) και στο χρονικό διάστημα μετά την ολοκλήρωση των χημειοθεραπειών όπου ο όγκος προσπαθεί να αναπτυχθεί ξανά από την υπολειπόμενη νόσο πολλά χρόνια αργότερα (65). Σε αυτό συνηγορούν μελέτες που παρατηρούν, πως κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα ανιχνεύονται στο αίμα ασθενών με μαστεκτομή χωρίς όμως να υπάρχουν κλινικές ενδείξεις νόσου (66). Με βάση λοιπόν τα νεότερα δεδομένα, υποθέτουμε πως η επαγωγή και η διατήρηση της αδράνειας του όγκου μπορούν να αποτελέσουν θεραπευτικούς στόχους και καταληκτικά σημεία της θεραπευτικής αντιμετώπισης.

Η αδράνεια του όγκου συμβαίνει σαν αποτέλεσμα της παύσης του κυτταρικού κύκλου (cell cycle arrest) ή μετά από μια κατάσταση δυναμικής ισορροπίας ανάμεσα στον πολλαπλασιασμό και την κυτταρική απόπτωση. Μπορεί να συμβεί είτε στον πρωταρχικό όγκο είτε στις μεταστατικές εστίες και χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες:

αγγειογενετική αδράνεια (angiogenic dormancy), κυτταρική αδράνεια (cellular dormancy) και ανοσολογική εποπτεία (immune surveillance)(67).

Οι μηχανισμοί της αδράνειας του όγκου περιλαμβάνουν διαφορετικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος, οι οποίες είτε μόνες είτε σε συνδυασμό οδηγούν σε αγγειογενετική αδράνεια, κυτταρική αδράνεια (G0-G1 arrest) και ανοσολογική εποπτεία. Από τις πρώτες μελέτες του Folkman και των συνεργατών του, είναι γνωστό πως οι ανάγγειοι όγκοι παραμένουν σε κατάσταση αδράνειας (68). Έτσι, η μετρονομική χημειοθεραπεία, μέσω αναστολής της αγγειογένεσης, μπορεί να επάγει και να διατηρήσει την αδράνεια του καρκινικού όγκου.

Η κυτταρική αδράνεια είναι αποτέλεσμα της γήρανσης των καρκινικών κυττάρων (senescence) ή της αδράνειας-ηρεμίας αυτών (quiescence)(67). Από τη βιβλιογραφία προκύπτουν πολλοί δείκτες της γήρανσης που εμφανίζονται στα καρκινικά κύτταρα μετά από χημειοθεραπεία, όπως η ενεργοποίηση του p53, η αύξηση του p16, και η έκφραση της ειδικής γαλακτοσιδάσης (SA-  $\beta$ -gal) (69). Παρόλα αυτά, η κατάσταση της ηρεμίας μπορεί να εξηγήσει καλύτερα την κυτταρική αδράνεια στον καρκίνο (70). Η κατάσταση της ηρεμίας είναι δευτερεύουσα σε σχέση με το G0-G1 arrest και ερευνητές έχουν αναφέρει πως τα περισσότερα ενήλικα κύτταρα βρίσκονται σε αυτήν την κατάσταση (71). Επιπλέον, η κατάσταση της ηρεμίας είναι αναστρέψιμη - φαινόμενο που παρατηρήθηκε στα stem cells - και το γεγονός αυτό, τη διαφοροποιεί από άλλες καταστάσεις όπως η απόπτωση και η τελική διαφοροποίηση. Τα κύτταρα μπορούν να επέλθουν σε κατάσταση ηρεμίας μετά την επίδραση σημάτων που σχετίζονται με την αναστολή επαφής, την απώλεια προσκόλλησης και την απόσυρση των αυξητικών παραγόντων (72). Εντούτοις, πειράματα με DNA microarrays αποκάλυψαν πως υπάρχει «ένα πρόγραμμα ηρεμίας» που περιλαμβάνει συγκεκριμένα γονίδια και καθορίζει την αναστρεψιμότητα της παύσης του κυτταρικού κύκλου.

Σε προηγούμενο κεφάλαιο, αναλύσαμε πως το ανοσολογικό σύστημα συμμετέχει στον έλεγχο και στην εκρίζωση των καρκινικών κυττάρων. Τα ειδικά του όγκου CD8<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα μπορούν να επιφέρουν απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Παρόλα αυτά, κάποια καρκινικά κύτταρα απομένουν και παραμένουν σε κατάσταση αδρανείας από το ανοσολογικό σύστημα (73). Όταν όμως τα κύτταρα ξεφεύγουν από

την ανοσολογική επιτήρηση η κατάσταση αδρανείας διακόπτεται. Η μετρονομική χημειοθεραπεία μπορεί να επάγει την κατάσταση αδρανείας των καρκινικών κυττάρων μέσω ενίσχυσης της ανοσολογικής απάντησης απέναντι στα καρκινικά κύτταρα όπως αναπτύχθηκε παραπάνω. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν ισχυρές αποδείξεις για το πως η μετρονομική χημειοθεραπεία μπορεί να επάγει την κατάσταση αδρανείας καθώς οι μηχανισμοί που εξηγούν αυτό το φαινόμενο παραμένουν άγνωστοι. Τέλος, το ιδανικό φάρμακο που θα χρησιμοποιηθεί με μετρονομικό πρωτόκολλο θα πρέπει να επάγει και να διατηρεί την κατάσταση αδρανείας και να οδηγεί σε μακροχρόνιο έλεγχο της νόσου χωρίς συμπτώματα.

### **3.1Δ) Άμεση επίδραση στα καρκινικά κύτταρα (The 4D Effect).**

Η MTX πέρα από τη δράση της στο αγγειακό δίκτυο του όγκου και στη τροποποίηση της ανοσολογικής απάντησης, φαίνεται να δρα απευθείας και στα καρκινικά κύτταρα. Ο Pasquier και οι συνεργάτες του πρότειναν ένα θεωρητικό μοντέλο, το οποίο βασίζεται στην επαγωγή της εξάρτησης των καρκινικών κυττάρων από τη χημειοθεραπεία που ακολουθείται από την καταναγκαστική στέρηση του φαρμάκου όταν τελειώνει η χημειοθεραπεία ή ανάμεσα στα μεσοδιαστήματα. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε «the 4D effect» (74). Η λογική της υπόθεσης βασίζεται στις αρχές της εξέλιξης των καρκινικών κυττάρων κατά τη διάρκεια μακροχρόνιας θεραπείας και σε πρόσφατα δεδομένα, από τη θετική επίδραση του διαλείμματος στις μακροχρόνιες αντικαρκινικές θεραπείες.

Η εξέλιξη των καρκινικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας είναι πολύπλοκη διεργασία και περιλαμβάνει πολλά μοριακά μονοπάτια (75). Όταν τα κύτταρα εκτίθενται στη χημειοθεραπεία, μερικοί καρκινικοί κλώνοι θα επιβιώσουν εξαιτίας ανθεκτικών παραγόντων όπως είναι οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες ή ο ανθεκτικός φαινότυπος (76) ενώ άλλα θα καταστραφούν μέσω απόπτωσης και άλλων μηχανισμών. Τα μοντέλα που εξηγούν την διαδικασία της εξέλιξης στηρίζονται στις αρχές του Δαρβίνου, οι οποίες ορίζουν πως η εξέλιξη απαιτεί γενετικές ή/και επιγενετικές αλλαγές που δημιουργούν νέους φαινοτύπους. Στη συνέχεια, οι νέοι φαινότυποι αλληλοεπιδρούν με το περιβάλλον τους, και επιλέγονται με βάση την

δυνατότητα και την ικανότητα για πολλαπλασιασμό και επιβίωση. Στον καρκινικό όγκο, η επίδραση της χημειοθεραπείας οδηγεί τα καρκινικά κύτταρα μέσω γενετικών και επιγενετικών αλλαγών να δημιουργήσουν καινούργιους κλώνους, οι οποίοι αν πολλαπλασιαστούν έχουν πιθανότητες επιβίωσης (77). Όταν εκτίθενται σε μακροχρόνιες, συνεχόμενες θεραπείες, όπως είναι η μετρονομική χημειοθεραπεία, η πλειονότητα των καρκινικών κλώνων μπορεί να γίνει ανθεκτική και να ανταγωνίζονται για επιβίωση και πολλαπλασιασμό. Ο Gatendy και οι συνεργάτες του πρότειναν την θεωρία της προσαρμοστικής χημειοθεραπείας για να εξηγήσουν τις φαινοτυπικές διαφορές που προκύπτουν μέσα από τη διαδικασία της καρκινικής εξέλιξης που συμβαίνει εξαιτίας της χημειοθεραπείας. Ο καινοτόμος τύπος χημειοθεραπείας, που φαίνεται σαν σταδιακά μειούμενη μετρονομική χημειοθεραπεία, υπολογίζει τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ανθεκτικών και μη ανθεκτικών κλώνων (78). Η προσαρμοστική θεραπεία (adaptive therapy) έχει στόχο να διατηρήσει την ισορροπία ανάμεσα στους δυο πληθυσμούς, έτσι ώστε να διαφυλάξει την ευαισθησία του όγκου στη θεραπεία και να επάγει μακροχρόνιο έλεγχο της νόσου, παρά πλήρη εκρίζωση (79).

Στηριζόμενοι σε αυτήν την θεωρία, οι Seruga και Tannock πρότειναν την διακοπτόμενη παρά τη συνεχόμενη στέρηση ανδρογόνων ως τη βασική θεραπεία στον καρκίνο του προστάτου (80), ενώ προκλινικά δεδομένα υποστηρίζουν τα μεσοδιαστήματα χωρίς θεραπεία στη μακροχρόνια χορήγηση αναστολέων αρωματάσης στον καρκίνο του μαστού έτσι ώστε να αναστραφεί η αντίσταση (81). Σε *in vitro* μελέτες, αντιμιτωτικά φάρμακα, όπως είναι οι ταξάνες και τα αλκαλοειδή της Vinca, μπορούν να επάγουν την εξάρτηση των καρκινικών σειρών σε αυτά, μετά από μακροχρόνια έκθεση. Επιπλέον, παρατηρήθηκε θάνατος των κυττάρων αυτών μετά την απόσυρση των συγκεκριμένων φαρμάκων (82). Στην κλινική έρευνα, τα πιο ικανά μετρονομικά πρωτόκολλα που οδήγησαν σε μακροχρόνιες ανταποκρίσεις και σε σταθεροποίηση της νόσου στα παιδιά, περιλαμβάνουν 4-5 φάρμακα, τα οποία διακόπτονται σε τακτική βάση καθένα χωριστά, δημιουργώντας φάσεις όπου τα κύτταρα εκτίθενται στα φάρμακα για μεγάλο χρονικό διάστημα και ταυτόχρονα στερούνται κάποια άλλα που αποσύρονται (83, 84). Φαίνεται λοιπόν, πως δημιουργώντας φάσεις απόσυρσης ενός ή περισσοτέρων φαρμάκων με τη βοήθεια διαλειμμάτων στη μετρονομική χημειοθεραπεία, μπορούμε να αυξήσουμε τη

δραστικότητά της. Συμπερασματικά, η μετρονομική χημειοθεραπεία όχι μόνο στοχεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά τα ανοσοποιητικά, τα καρκινικά και προγονικά καρκινικά κύτταρα μέσω άμεσων και έμμεσων δράσεων, θεωρώντας την ως πολυστοχευτική θεραπεία.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

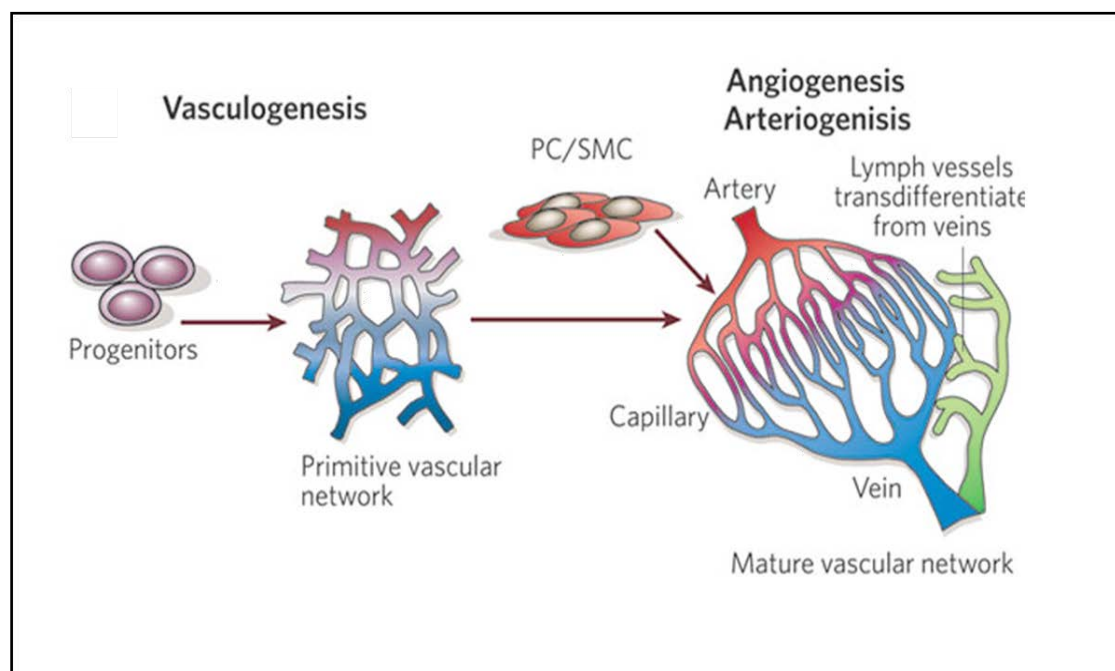
### 4.1) ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ.

Κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης παρατηρείται βαθμιαία συσσώρευση βλαβών σε διαφορετικά γονίδια με αποτέλεσμα τη δημιουργία υποπληθυσμών με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Η γενετική αστάθεια είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων, την καταστολή των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων, την αλόγιστη κυτταρική ανάπτυξη και την ανικανότητα των κυττάρων να οδηγούνται σε απόπτωση (1). Η μεταστατική διαδικασία είναι αποτέλεσμα της συστηματικής διασποράς των κυτταρικών κλώνων, που έχουν τάση να διεισδύουν στους περιβάλλοντες ιστούς.

Η αγγειογένεση παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του πρωτοπαθούς όγκου και στη δημιουργία μεταστάσεων. Η ανάπτυξη ενός κακοήθους όγκου εξαρτάται από την επάρκεια του αγγειακού δικτύου καθώς η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την παροχή οξυγόνου και την προμήθεια θρεπτικών συστατικών. Το οξυγόνο, συγκεκριμένα, διαχέεται μέσω τριχοειδών σε απόσταση μέχρι 150-200  $\mu\text{m}$ . Αυτό όμως δεν επαρκεί. Επομένως, ο όγκος χρειάζεται νέο αγγειακό δίκτυο που δημιουργείται από το υπάρχον μέσω της αγγειογένεσης, προκειμένου να μεταφερθούν όλα τα αναγκαία συστατικά για τη βιωσιμότητα και την εξέλιξη του όγκου (85).

Το αγγειακό δίκτυο αναπτύσσεται μέσω των μηχανισμών της αγγειακής διαφοροποίησης (vasculogenesis) και της αγγειογένεσης (angiogenesis). Κατά την αγγειακή διαφοροποίηση τα αιμοφόρα αγγεία αναπτύσσονται *de novo* από τη διαφοροποίηση αρχέγονων ενδοθηλιακών κυττάρων (αγγειοβλαστών) *in situ* με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός άωρου πλέγματος, ενώ κατά την αγγειογένεση ο σχηματισμός νέων τριχοειδών αγγείων γίνεται από προϋπάρχοντα. Με τη διαδικασία της αγγειακής μυογένεσης (vascular myogenesis), της προσέγκυσης περιενδοθηλιακών κυττάρων στο άωρο αγγείο, το αγγειακό δίκτυο σταθεροποιείται

(86) **(Εικόνα 6).** Στους ενήλικες, τα αγγειακά δίκτυα δημιουργούνται μόνο μέσω αγγειογένεσης και σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται σε αδράνεια, εκτός από τη περίοδο της αναπαραγωγικής ηλικίας στη γυναίκα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ζουν περισσότερο από όλα στο ανθρώπινο σώμα, εκτός από αυτά του κεντρικού νευρικού συστήματος. Συγκεκριμένα, μόνο 1 στα 10000 ενδοθηλιακά κύτταρα είναι σε κυτταρική διαίρεση σε δεδομένη χρονική στιγμή ώστε να διατηρείται η ζωτικότητα των ιστών (38). Όμως, το αδρανές αγγειακό δίκτυο ενεργοποιείται και δημιουργεί νέα αγγεία, κάτω από την επίδραση συγκεκριμένων ερεθισμάτων.



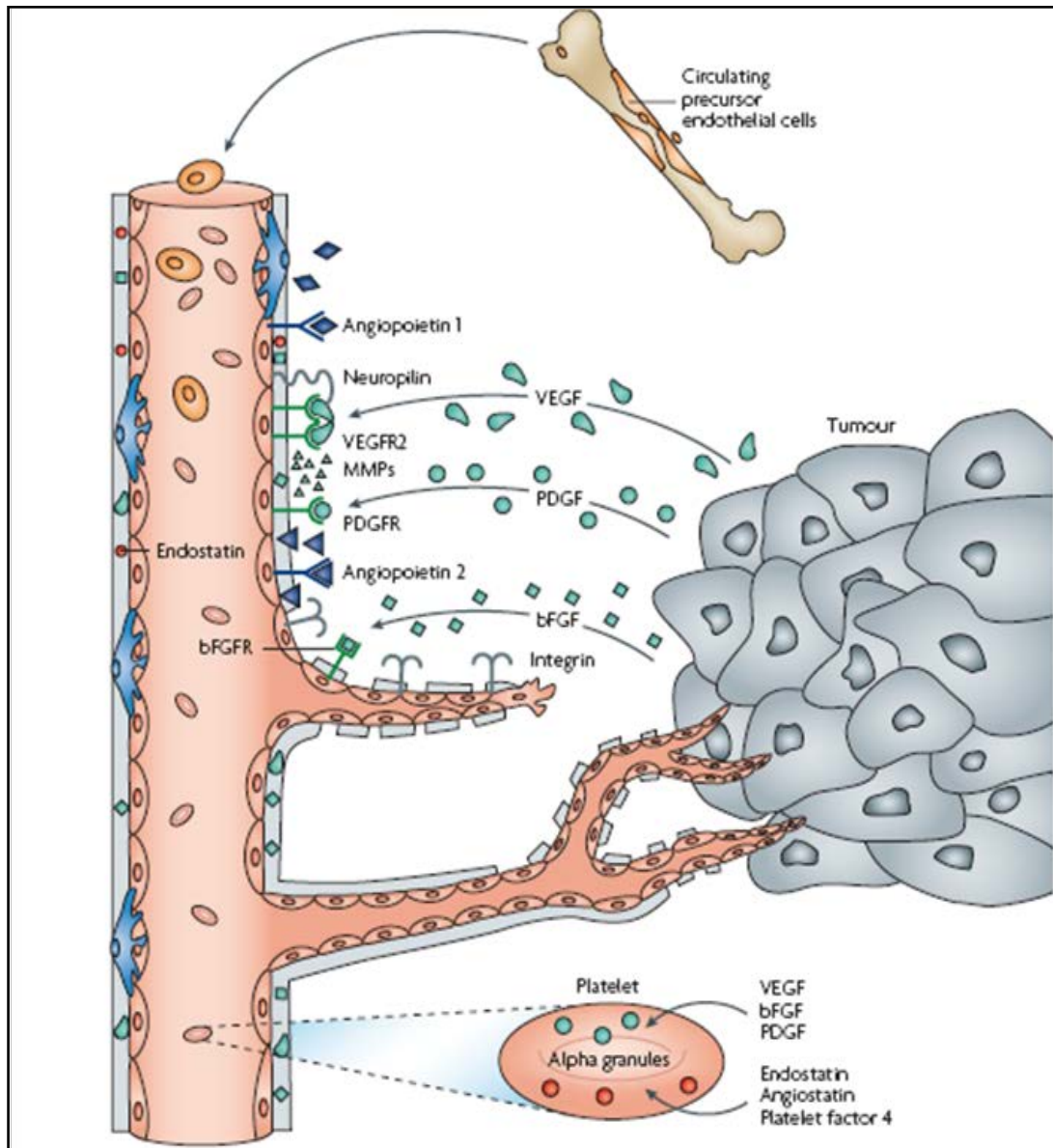
**Εικόνα 6:** Ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου. Κατά τη διάρκεια της αγγειακής διαφοροποίησης, τα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα αναπτύσσουν ένα πρωτόγονο αγγειακό δίκτυο από αρτηρίες και φλέβες. Κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης, το δίκτυο επεκτείνεται, τα περικύτταρα (PCs) και τα λεία μυϊκά κύτταρα (SMCs) καλύπτουν τα νέα κανάλια και οργανώνεται το αγγειακό δίκτυο (87).

## 4.2) ΣΤΑΔΙΑ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ.

Η διαδικασία της αγγειογένεσης είναι πολύπλοκη (88). Ξεκινώντας από το σημείο μηδέν, ένα ερέθισμα προκαλεί την έκκριση αυξητικών παραγόντων, που οδηγούν στη διάσπαση της βασικής μεμβράνης και έπειτα στη δημιουργία μικρών αγγειακών κλάδων και διακλαδώσεων. Συνοπτικά, τα αρχικά βήματα μιας πολύπλοκης διαδικασίας κατά την οποία ενεργοποιούνται χιλιάδες μοριακά μονοπάτια, περιγράφονται στην **εικόνα 7** (89). Συγκεκριμένα:

- Διάφοροι αυξητικοί παράγοντες όπως ο VEGF, ANGPT1, οι MMPs, η ANGPT2, ο PDGF και ο FGF-2 εκκρίνονται από τον καρκινικό όγκο.
- Ο VEGF είναι ο σημαντικότερος προαγγειογενετικός παράγοντας, που με τη σύνδεσή του στον υποδοχέα του VEGFR2 ενεργοποιεί πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια.
- Οι μεταλλοπρωτεΐνες κινητοποιούν με τη σειρά τους αγγειογενετικές πρωτεΐνες από το στρώμα και βοηθούν στη διάσπαση της ενδοστατίνης από το κολλαγόνο του αγγειακού τοιχώματος.
- Οι αγγειοποιητίνες ανταγωνίζονται για την σύνδεση στον υποδοχέα Tie2, με αποτέλεσμα η σύνδεση της ANGPT2 να οδηγήσει στη διάσπαση της βασικής μεμβράνης.
- Η βασική μεμβράνη που περιβάλλεται από ενδοθηλιακά κύτταρα διασπάται τοπικά.
- Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλάζουν σχήμα και εισβάλλουν στο στρώμα.
- Τα ενδοθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και αρχίζουν να δημιουργούν μεταναστευτικές στήλες.
- Έπειτα σταματούν τον πολλαπλασιασμό και προσκολλώνται μεταξύ τους με τη βοήθεια των ιντεγκρινών για να δημιουργήσουν ένα αγγείο.

- Τέλος, τα διακλαδιζόμενα τριχοειδή ενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν μεγαλύτερα αγγεία και στη συνέχεια δημιουργούν ένα νέο δίκτυο.

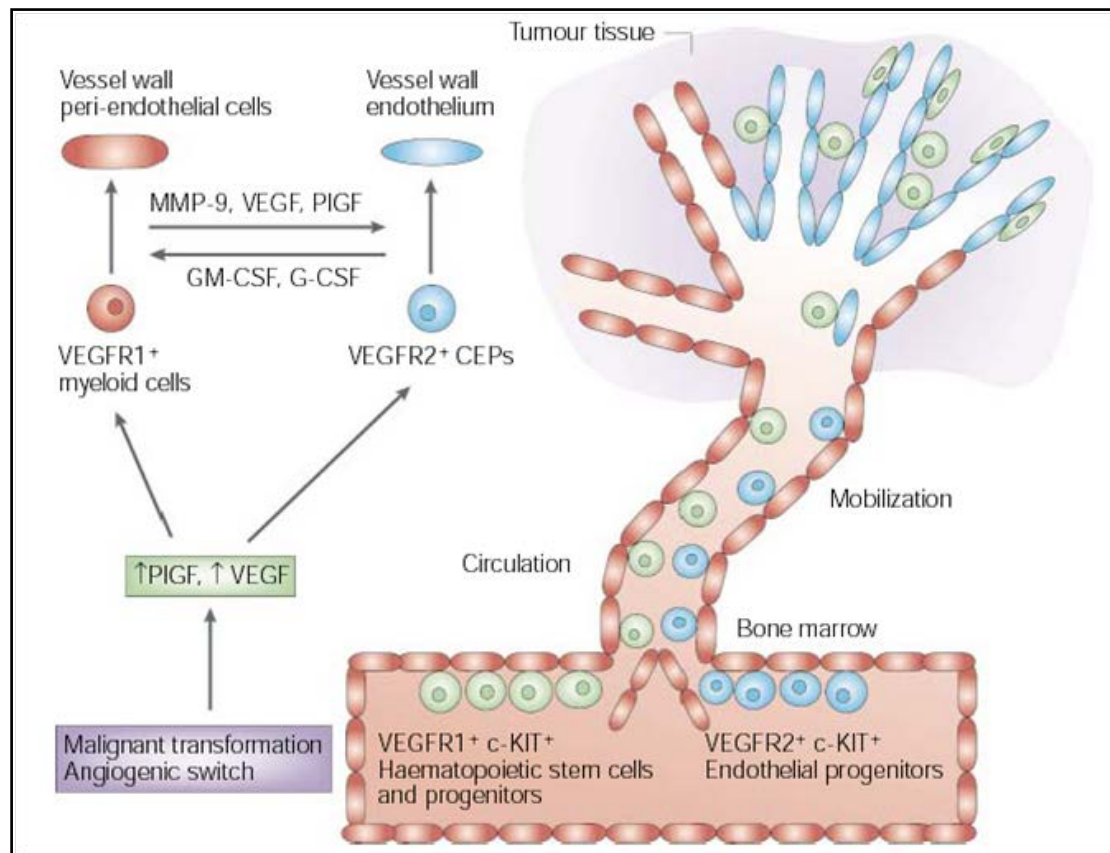


**Εικόνα 7:** Βήματα-«κλειδιά» στην αγγειογένεση του καρκίνου (89).

### 4.3) ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΓΟΝΙΚΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.

Σημαντικό ρόλο στη νεοπλασματική νεοαγγείωση διαδραματίζουν τα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (Endothelial Progenitor Cells - EPCs). Τα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν το CD34, τον VEGFR2, τη VE-cadherin (90) αλλά και τον AC133, έναν ορφανό υποδοχέα που εκφράζεται μόνο στα EPCs και όχι στα ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα (91). Η πλειοψηφία τους βρίσκεται στο μυελό των οστών σε στενή σύνδεση με τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (haematopoietic stem cells – HSCs) και το στρώμα.

Η στρατολόγηση στο χώρο της αγγειογένεσης προκαλείται από τη διαθεσιμότητα των αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων και των κυτταροκινών όπως ο VEGF, η angiopoietin και ο παράγοντας του στρώματος (stromal cell-derived factor-SDF1a) (92, 93). Μετά την άφιξή τους, τα EPCs προσελκύουν και άλλα EPCs καθώς εκκρίνουν με τη σειρά τους αυξητικούς παράγοντες όπως ο VEGF, HGF, G-CSF και GM-CSF(94). Έτσι, τα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα συμβάλλουν στην νεοαγγείωση με δύο τρόπους: είτε διαφοροποιούνται σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα και ενσωματώνονται ως δομικά στοιχεία στα νέα αγγεία είτε δημιουργούν ένα προαγγειογενετικό περιβάλλον με την απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων.



**Εικόνα 8:** Κινητοποίηση των EPCs και των HSCs από κυτταροκίνες (95). Η κινητοποίηση από τις κυτταροκίνες των EPCs αποτελεί μια δυναμική διαδικασία που απαιτεί τη διαδοχική ενεργοποίηση των πρωτεασών, των μορίων προσκόλλησης και των κυτταροκινών. Η ανάπτυξη του όγκου επάγει την έκκριση αυξητικών παραγόντων όπως ο VEGF. Οι αυξητικοί παράγοντες με τη σειρά τους ρυθμίζουν τα μόρια προσκόλλησης και την επαγωγή των μεταλλοπρωτεασών με αποτέλεσμα την κινητοποίηση των HSCs. Οι αλληλεπιδράσεις των HSCs με τα κινητοποιούμενα προγονικά κύτταρα και τα EPCs οδηγούν στην ενσωμάτωση αυτών στα νέα αγγεία.

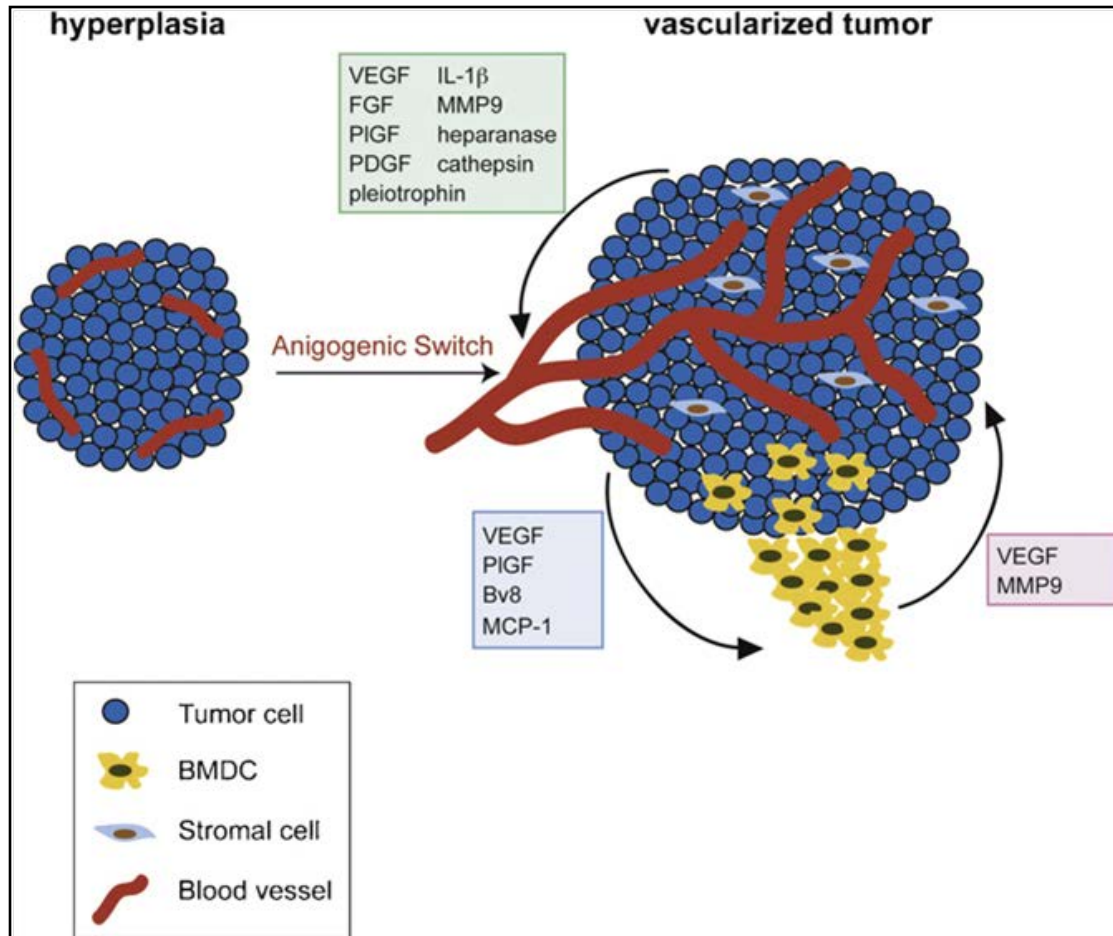
#### 4.4) ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΚΚΙΝΗΣΗ - ANGIOGENIC SWITCH.

Η αγγειογενετική εκκίνηση ή αλλιώς angiogenic switch αποτελεί ένα γεγονός χρονικά περιορισμένο κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης, όπου η ισορροπία ανάμεσα στους προαγγειογενετικούς και τους αντιαγγειογενετικούς παράγοντες διαταρράσσεται, τείνοντας προς τους προαγγειογενετικούς, με αποτέλεσμα τη μετάβαση από τη αδρανή ανάγεια υπερπλασία στον αγγειοβριθή όγκο και την κακοήγη εξαλλαγή (96). Με βάση προκλινικά δεδομένα, προτάθηκαν διάφοροι μηχανισμοί που πιθανόν να εμπλέκονται σε αυτό (97). Επιγραμματικά, οι μηχανισμοί είναι:

- Η ικανότητα των όγκων να διαθέτουν τη δική τους αιματική ροή που τους εξασφαλίζει τα θρεπτικά συστατικά.
- Η στρατολόγηση των ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων στον αγγειακό στρώμα των όγκων.
- Η ενίσχυση του αγγειογενετικού σήματος από τα στρωματικά κύτταρα (μακροφάγα, περικύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα).
- Η ικανότητα των όγκων να οδηγούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε απόπτωση και ταυτόχρονα να δημιουργούν νέες αγγειακές διακλαδώσεις με τα γειτονικά αγγεία (98).

Η αρχή ότι η διαρκής αγγειογένεση είναι απαραίτητη για την επέκταση του καρκινικού όγκου γέννησε στην επιστημονική κοινότητα πολλές ερωτήσεις σχετικά με τη στιγμή που παρατηρείται η αγγειογενετική εκκίνηση – νωρίς στην ογκογένεση ή αργότερα στην εξέλιξη – με το αν αποτελεί αναπόφευκτη συνέπεια της περιορισμένης από τον όγκο αγγειακής δικτύωσης, καθώς και το εάν ο έλεγχος της αποτελεί βασική ικανότητα του όγκου προκειμένου να εξελιχθεί. Τα στοιχεία προήλθαν από μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια και συγκεκριμένες κατηγορίες καρκινικών όγκων και αποδεικνύουν πως η επαγωγή της αγγειογένεσης είναι ένα ξεχωριστό στοιχείο στον φαινότυπο του όγκου, που συμβαίνει νωρίς στα προνεοπλασματικά στάδια (86).

Συγκεκριμένα, ο Folkman και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν τρία ξεχωριστά μοντέλα καρκινικών όγκων σε διαγονιδιακά ποντίκια (καρκίνωμα από κύτταρα νησιδίων, δερματικό ινοσάρκωμα και επιδερμικό πλακώδες καρκίνωμα). Παρατήρησαν λοιπόν, πως η αγγειογενετική εκκίνηση συμβαίνει στα πρώτα στάδια εμφάνισης των συμπαγών όγκων. Επιπλέον, με τη βοήθεια της ιστολογικής ανάλυσης βρέθηκε πως οι αγγειακές διακλαδώσεις και ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων στις νησίδες αποτελούν μέρος μόνο της όλης διαδικασίας (99), και πως ούτε η έκφραση των ογκογονιδίων, ούτε ο πολλαπλασιασμός είναι αρκετά για να ενεργοποιηθεί η αγγειογενετική εκκίνηση που αποτελεί ξεχωριστό βήμα στην πολυσταδιακή διαδικασία της αγγειογένεσης. Τις παρατηρήσεις αυτές επιβεβαίωσαν δεδομένα από πειράματα σε κυτταρικές σειρές καρκινικών όγκων, που υποδεικνύουν πως η αγγειογενετική εκκίνηση συμβαίνει νωρίς, στα προ-νεοπλασματικά στάδια του όγκου και πως αποτελεί βασική ικανότητα ενός εξελισσόμενου όγκου.



**Εικόνα 9:** Σχηματική αναπαράσταση των μοριακών και των κυτταρικών ρυθμιστών της αγγειογενετικής εκκίνησης σε μοντέλα καρκίνου σε διαγονιδιακά ποντίκια (96). Η εκκίνηση συμβαίνει όταν η ισορροπία ανάμεσα στον προ- και αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες διαταράσσεται. Συγκεκριμένα απεικονίζονται οι προαγγειογενετικοί παράγοντες και οι πρωτεάσες που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα (πράσινο πλαίσιο), από τα κύτταρα που ανοσολογικού συστήματος (ροζ πλαίσιο). BMDC: Bone Marrow-derived Dendritic Cell.

## 4.5) ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ.

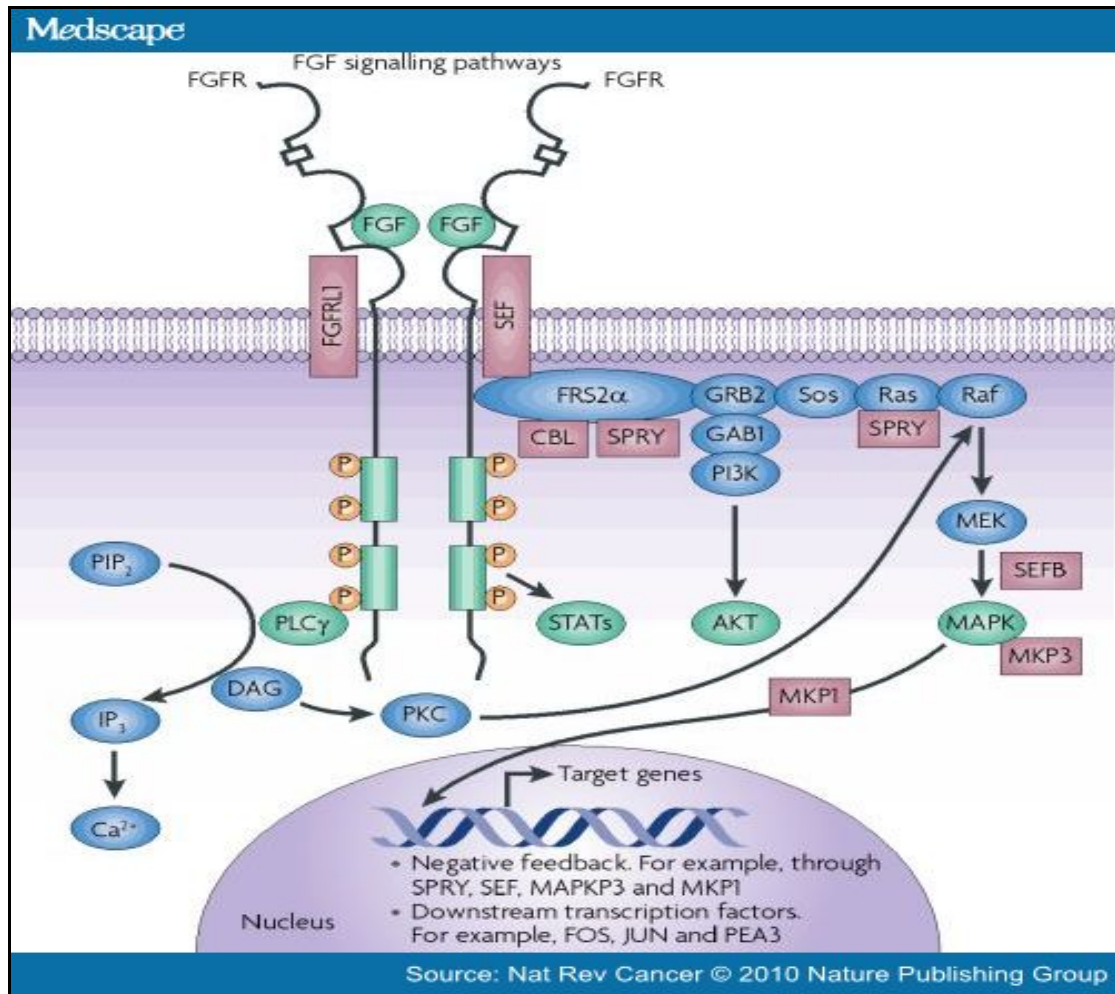
### 4.5.1) ΠΡΟΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.

Η παρατήρηση ότι οι όγκοι μπορούν να εμφυτευθούν είτε σε ανάγγειες περιοχές είτε σε αγγειοβριθείς και να επάγουν τη δημιουργία νέων αγγείων, οδήγησε στην υπόθεση πως υπάρχουν ενεργοποιητές της αγγειογένεσης που μπορούν να προκαλέσουν το αδρανές αγγειακό δίκτυο να δώσει αγγειακές διακλαδώσεις (86). Έτσι με τη βοήθεια δοκιμασιών που μιμούνται την διαδικασία της αγγειογένεσης *in vivo* και *in vitro* ανακαλύφθηκαν πολλά μόρια που προάγουν την νεοαγγειογένεση. Παρακάτω θα αναλύσουμε μερικούς από τους πιο σημαντικούς προαγγειογενετικούς παράγοντες, που αποτέλεσαν και αντικείμενο έρευνας της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

#### 4.5.1.1) Παράγοντας των Ινοβλαστών, FGF.

Το πρώτο μόριο με προαγγειογενετική δράση που ανακαλύφθηκε το 1982 ήταν ο βασικός παράγοντας των ινοβλαστών (bFGF, FGF-2) (100). Στα θηλαστικά, η οικογένεια του FGF περιλαμβάνει 18 μόρια που ασκούν τη δράση τους μέσω τεσσάρων διαμεμβρανικών υποδοχέων τυροσινικής κινάσης (101). Οι FGFs είναι γλυκοπρωτεΐνες που απορροφούνται από την εξωκυττάρια ουσία αλλά και την κυτταρική επιφάνεια μέσω πρωτεογλυκανών θεικής ηπαρίνης (heparin sulfate proteoglycans – HPSGs). Κατά τη σηματοδότηση, οι FGFs απελευθερώνονται από την εξωκυττάρια ουσία με τη βοήθεια ηπαρινασών και πρωτεασών και οι ελεύθεροι FGFs προσκολλώνται στις HPSGs (102). Εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα του μεσοδέρματος και του νευροεξωδέρματος και σε πολλά είδη καρκινικών κυττάρων. *In vitro*, ο FGF-2 αποτελεί έναν ικανό μιτογόνο παράγοντα για τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τους ινοβλάστες (103). Σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων, ο FGF-2 έχει αποδειχθεί πως επάγει τον αγγειογενετικό φαινότυπο, καθώς αυξάνει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, την παραγωγή πρωτεασών και την έκφραση ειδικών ιντεγκρινών (104). *In vivo*, ο FGF-2 είναι ικανός επαγωγέας της αγγειογένεσης και συμμετέχει στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση πολλών οργάνων (105). Βρίσκεται στον βασικό υμένα των τριχοειδών των αγγείων, στις

θέσεις όπου αρχίζουν οι διακλαδώσεις των αγγείων (sprouting) και στο ενδοθήλιο των τριχοειδών των όγκων, γεγονός που υποδηλώνει πως ο FGF-2 μπορεί να ρυθμίσει την αγγειογένεση με αυτοκρινικό τρόπο (106). Οι FGFs διεγείρουν τη δημιουργία νέων αγγείων και την ωρίμανση καθώς αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, προάγουν τη διάσπαση της εξωκυττάριας ουσίας, μεταβάλλουν τις μεσοκυττάριας συνδέσεις και ρυθμίζουν την έκφραση των ιντεγκρινών (107). Η σηματοδότηση του FGF-2 (**Εικόνα 10**) γίνεται συνήθως μέσω ενεργοποίησης των MAPK αλλά για την επαγωγή του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων απαιτείται η ενεργοποίηση της PCK (108). Περαιτέρω στοιχεία για το ρόλο των FGFs στην καρκινική αγγειογένεση αποτελούν: η αύξηση της κινητοποίησης των συνδετών από την εξωκυττάρια ουσία (109), η απελευθέρωση του FGF-2 από τα καρκινικά κύτταρα με παρακρινικό τρόπο, ώστε να δράσει στα ενδοθηλιακά κύτταρα για έναρξη της αγγειογένεσης (110) και η αυτοκρινική απελευθέρωση του FGF-2 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών (111). Τέλος, υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του FGFR και των VEGFRs στην αγγειογένεση, με το σύστημα του FGFR να μεσολαβεί σε περιπτώσεις αντίστασης στους VEGFR (112).

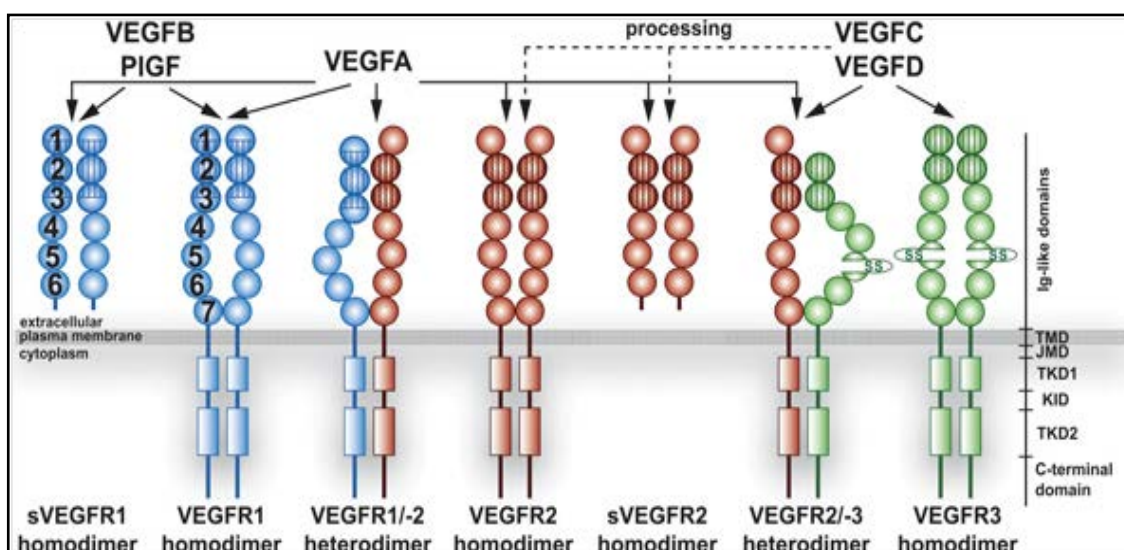


**Εικόνα 10:** *FGFR* σηματοδοτικό μονοπάτι (101).

#### 4.5.1.2) Αγγειοενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, *VEGF*.

Η οικογένεια του VEGF αποτελείται από εκκρινόμενες, διμερείς γλυκοπρωτεΐνες των 40 kD και μέχρι σήμερα στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί 5 μέλη: ο VEGFA, ο VEGFB, ο VEGFC, ο VEGFD και ο αυξητικός παράγοντας του πλακούντα PLGF (placenta growth factor) (113). Ο VEGFA, ο VEGFB και ο PLGF προσδένονται στον υποδοχέα VEGFR1, ο VEGFA συνδέεται και με τον VEGFR2, ενώ οι VEGFC και VEGFD προσδένονται στον VEGFR3 (114). Οι VEGFRs είναι μέλη της οικογένειας των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης, βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου και προκαλούν τον διμερισμό και την ενεργοποίησή τους μέσω φωσφορύλιωσης. Οι

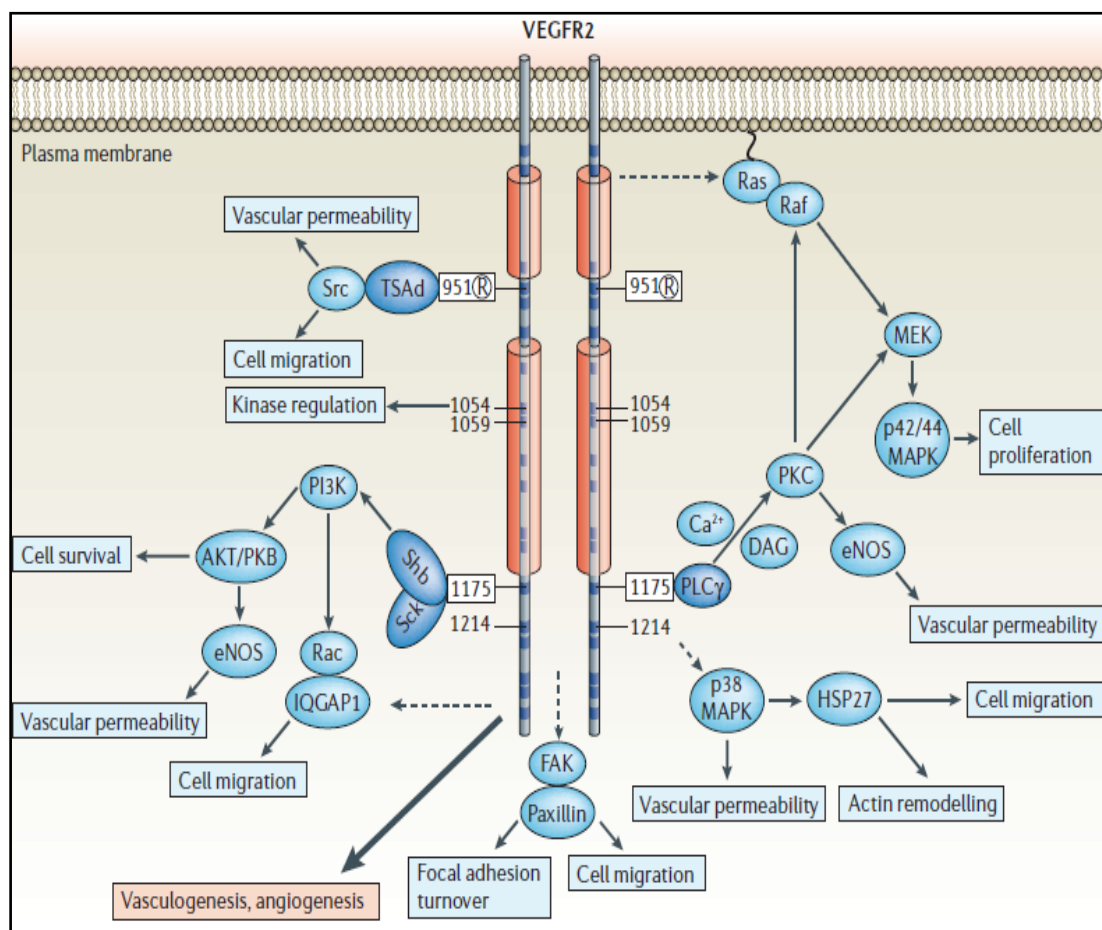
υποδοχείς VEGF αποτελούνται από ένα εξωκυτταρικό τμήμα με 7 περιοχές με δομή ανοσοσφαιρίνης, από μία διαμεμβρανική περιοχή και από ένα ενδοκυτταρικό τμήμα με διττή περιοχή τυροσινικής κινάσης (**Εικόνα 11**). Ο κυριότερος ρυθμιστής της καρκινικής αγγειογένεσης είναι ο VEGFA ή αλλιώς VEGF. Ο VEGF ασκεί την επίδραση του μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα VEGFR2, ο οποίος εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα CEP. Ο VEGF προσδένεται και στον VEGFR1 και μάλιστα με μεγαλύτερη συγγένεια (10 φορές περισσότερο) αλλά με πιο ασθενές σήμα μεταγωγής (115).



**Εικόνα 11:** Η Οικογένεια του VEGF και οι 3 υποδοχείς του (116).

Διάφοροι παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν την επαγωγή ή και την αύξηση της έκφρασης του VEGF στους όγκους, όπως η υποξία, το χαμηλό pH, φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες και ορμόνες. Επίσης, γενετικές αλλαγές όπως η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων και η κατάργηση της δράσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (117). Η πρόσδεση του VEGF στον VEGFR2 οδηγεί σε έναν καταρράκτη διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών, με αποτέλεσμα τη θετική ρύθμιση γονιδίων του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, της επιβίωσης και της αγγειακής διαπερατότητας. Συγκεκριμένα, η πρόσδεση στον συνδέτη οδηγεί στον διμερισμό του υποδοχέα, που ακολουθείται από την ενδοκυττάρια ενεργοποίηση της PLCγ – PKC – Raf κινάση και τελικά το μονοπάτι της MAPK κινάσης με τελικό στόχο την έναρξη σύνθεσης του

DNA και της κυτταρικής ανάπτυξης (**Εικόνα 12**). Σε ένα άλλο σηματοδοτικό μονοπάτι, παρατηρείται η ενεργοποίηση της PI3K που προάγει την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τέλος, η ενεργοποίηση των γονιδίων src προκαλεί αλλαγές στο κυτταροσκελετό της ακτίνης και επάγει τη μετανάστευση (115).



**Εικόνα 12:** Ο υποδοχέας VEGFR2 φωσφορυλιώνει δευτερογενείς διαμεσολαβητές οι οποίοι μεταγουν το σήμα στον πυρήνα όπου και τροποποιούν το μεταγραφικό πρόγραμμα (114). Το κυκλωμένο R υποδεικνύει ότι η θέση της φωσφορυλίωσης εξαρτάται από την αγγειογενετική κατάσταση του ενδοθηλιακού κυττάρου. Τα σκούρα μπλε τετράγωνα στα μόρια των υποδοχέων υποδεικνύουν θέσεις υπόλοιπων τυροσίνης. Η πρόσδεση των σηματοδοτικών μορίων (σκούρα μπλε οβάλ) σε συγκεκριμένες θέσεις (κουτιά με νούμερα) εισάγουν σηματοδοτικά μονοπάτια (γαλάζια οβάλ), τα οποία οδηγούν σε συγκεκριμένες διαδικασίες (ορθογώνια κουτιά). Το τελικό βιολογικό αποτέλεσμα περιγράφεται στα ροζ τετράγωνα (DAG:diacylglycerol, EC:endothelial cell, eNOS:endothelial nitric oxide synthase, FAK: focal adhesion kinase, HPC:haematopoietic progenitor cell, HSP27:heat-shock protein-27, MAPK: mitogen-activated protein kinase, PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase, PKC: protein kinase C, PLCγ: phospholipase C-γ).

Καταληκτικά, ο VEGF ρυθμίζει με την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού σημαντικές αγγειογενετικές ανταποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση, η διαφοροποίηση και η μικροαγγειακή διαπερατότητα (118). Επιπλέον, μελέτες αποδεικνύουν πως προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από την απόπτωση. Τέλος, παίζει ρόλο στην κινητοποίηση των ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων από το μυελό των οστών συνεισφέροντας στη δημιουργία νέων αγγείων με αγγειακή διαφοροποίηση (119).

Οι περισσότεροι τύποι καρκινικών όγκων εκφράζουν τον VEGF και μάλιστα σε αυξημένα επίπεδα (120). Το γεγονός αυτό φαίνεται να είναι συνέπεια των γενετικών και επιγενετικών αλλαγών που περιγράφησαν προηγουμένως. Είναι ευρέως γνωστό ότι η δράση του VEGF ασκείται με παρακρινικό τρόπο από τα καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, τα καρκινικά κύτταρα παράγουν τον VEGF αλλά δεν ανταποκρίνονται απευθείας σε αυτόν καθώς δεν διαθέτουν συνήθως στην επιφάνεια τους υποδοχείς. Σε αντίθεση, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν τους υποδοχείς του VEGF αλλά εκκρίνουν ελάχιστα έως καθόλου μόρια του VEGF. Επιπλέον, ποσότητες ικανές να προκαλέσουν αγγειογένεση προέρχονται από άλλα κύτταρα υποδοχής όπως τα αιμοπετάλια, τα μυϊκά κύτταρα και κύτταρα του στρώματος (121, 122). Τα δεδομένα αυτά, εξηγούν εν μέρει γιατί τα αυξημένα επίπεδα του VEGF είτε στο αίμα είτε στον καρκινικό όγκο δεν μπορούν να προβλέψουν το όφελος από τα φάρμακα που στοχεύουν στο συγκεκριμένο μονοπάτι (123). Οι παρατηρήσεις ότι πολλοί καρκινικοί όγκοι, συμπεριλαμβανομένων και των αιματολογικών κακοηθειών εκφράζουν τους VEGFR και παράγουν VEGF υποδηλώνει πως ο VEGF πολλές φορές δρα άμεσα, ως αυτοκρινής αυξητικός παράγοντας (124). Επιπλέον, σε κάποιες περιπτώσεις οι VEGFRs δεν εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια αλλά στο εσωτερικό του κυττάρου και προάγουν την κυτταρική επιβίωση με ενδοκρινικό τρόπο (125).

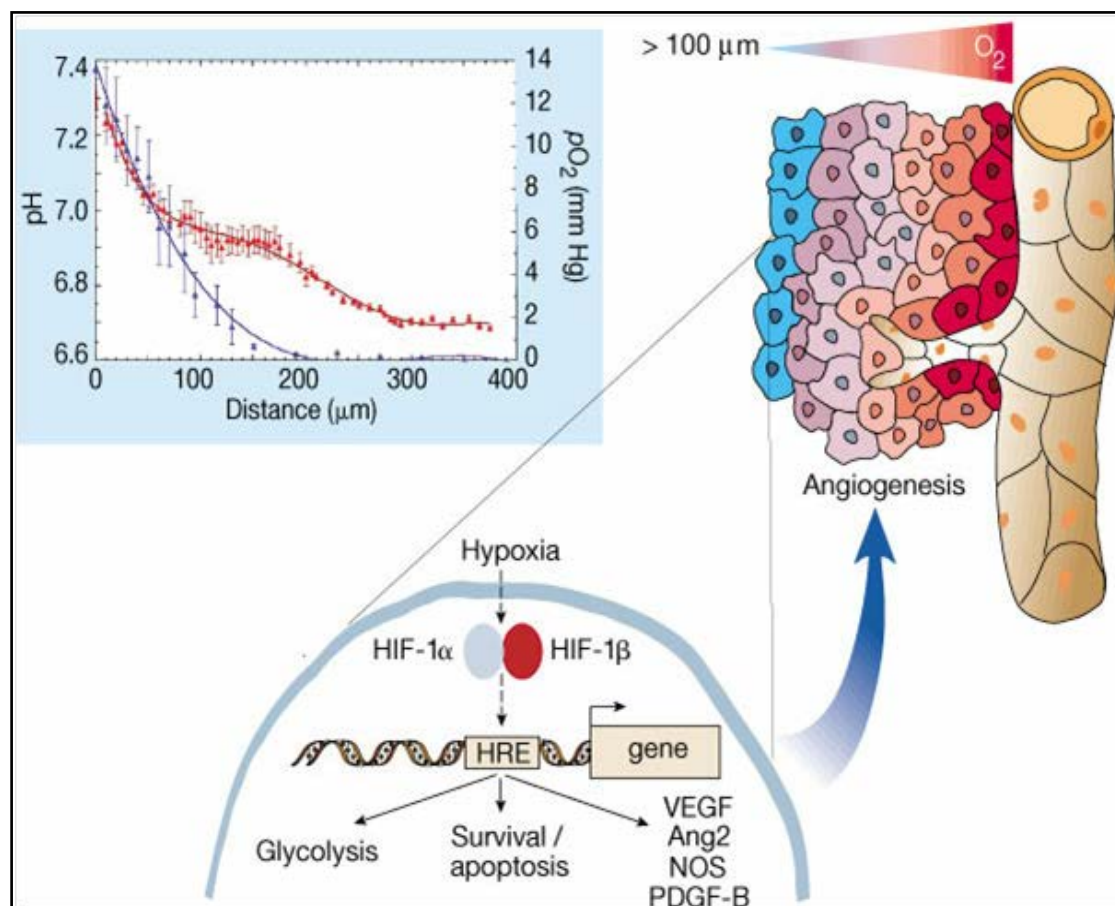
Ο κυκλοφορούν VEGF και ο διαλυτός VEGFR2 έχουν χρησιμοποιηθεί ως αντιπροσωπευτικοί δείκτες της αντιαγγειογενετικής θεραπείας και οι μετρήσεις των μορίων αυτών στο αίμα των ασθενών έχουν χρησιμοποιηθεί προκειμένου να καθοριστεί η βέλτιστη δόση των φαρμάκων που στοχεύουν στον VEGFR2 (126).

#### **4.5.1.3) Επαγωγίμος από την υποξία παράγων, HIF.**

Η υποξία αποτελεί την κυριότερη παθοφυσιολογική κατάσταση που ρυθμίζει την αγγειογένεση. Η αύξηση της αγγειογένεσης ως αποτέλεσμα της υποξίας αποτελεί προσαρμοστική απόκριση των όγκων προκειμένου να προμηθεύονται θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο (127). Στα θηλαστικά, η μεταγραφική απόκριση στην υποξία ρυθμίζεται από τον επαγωγίμο από την υποξία παράγοντα-HIF. Ο HIF είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας με μορφή έλικα-βρόγχου-έλικα (helix-loop-helix transcription factor), αποτελούμενος από 2 υποομάδες την HIF-β που εκφράζεται συστηματικά και την HIF-α που υπερεκφράζεται σε συνθήκες υποξίας (128). Μέχρι τώρα, τρεις υπότυποι του HIF-α έχουν αναγνωριστεί αλλά μόνο ο HIF-1α και ο HIF-2α φαίνεται να ρυθμίζουν τη μεταγραφή που προκαλείται λόγω υποξίας. Ο HIF-1α εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα ενώ ο HIF-2α αναγνωρίστηκε αρχικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε κάποιους αγγειοβριθείς ιστούς και γι' αυτό ονομάστηκε EPAS-1 (endothelial PAS domain protein-1) (129). Μεταγενέστερες μελέτες απέδειξαν πως ο HIF-2α εκφράζεται και σε άλλους κυτταρικούς τύπους και ιστούς (130).

Σε συνθήκες φυσιολογικού οξυγόνου οι HIF-1α και ο HIF-2α αποικοδομούνται μέσω υδροξυλίωσης της 2-προπυλο υποομάδας, προσθήκη ουμπικουιτίνης (ubiquitylation) και διάσπαση του πρωτεασώματος μέσω του μονοπατιού VHL (Von Hippel- Lindau) (131). Σε συνθήκες υποξίας, οι υποομάδες του HIF-1α μετατοπίζονται στον πυρήνα και ετεροδιμεριζόμενες με τον συμπαράγοντα, τη βασική helix-loop-helix/ Pas πρωτεΐνη ARNT, προσδένονται στον επαγωγέα και ρυθμίζουν την αγγειογένεση και την γλυκόλυση (132). Τα επίπεδα του HIF-1α επηρεάζονται επίσης από γενετικές μεταβολές που περιλαμβάνουν μεταλλάξεις του *VHL* γονιδίου και γονιδίων αυξητικών παραγόντων (133). Οι μεταβολές αυτές προκαλούν αύξηση της HIF-1α πρωτεΐνης μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR και MAPK κινάσης (134). Ο HIF-1α ενεργοποιεί άλλα γονίδια που ρυθμίζουν την έκφραση της αγγειοποιητίνης, του VEGFR, της ενδοθελίνης και του διαμεμβρανικού διακομιστή της γλυκόζης (GLUT-1) (135). Πρόσφατα υποστηρίχθηκε πως η αύξηση του HIF-1α επάγει την αγγειογένεση στα HUVEC in vitro, μέσω εξαρτώμενου από τον FGF αυτοκρινικό μηχανισμό (136). Επιπλέον, μελέτες απέδειξαν πως το μικροπεριβάλλον

του όγκου είναι υποξικό, πως η υποξία αποτελεί κακό προγνωστικό στοιχείο και πως είναι υπεύθυνη για την αντίσταση στην ακτινοβολία (137). Επίσης, τα επίπεδα του HIF σχετίζονται με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου, την αγγειογένεση και σε κάποιες περιπτώσεις την επιβίωση (138). Τα αποτελέσματα αυτά, υποδεικνύουν πως ο HIF-1α μπορεί να ελέγχει την έκφραση πολλών αγγειογενετικών παραγόντων και πως θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο των αντιαγγειογενετικών θεραπειών.



**Εικόνα 13:** HIF και μεταγραφή. Η υποξία επάγει την έκφραση του HIF, ο οποίος μέσω αλληλεπιδράσεων με τις περιοχές ανταπόκρισης στην υποξία (Hypoxia responses elements–HREs) ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, στην επιβίωση, στην απόπτωση και στη γλυκόλυση (136).

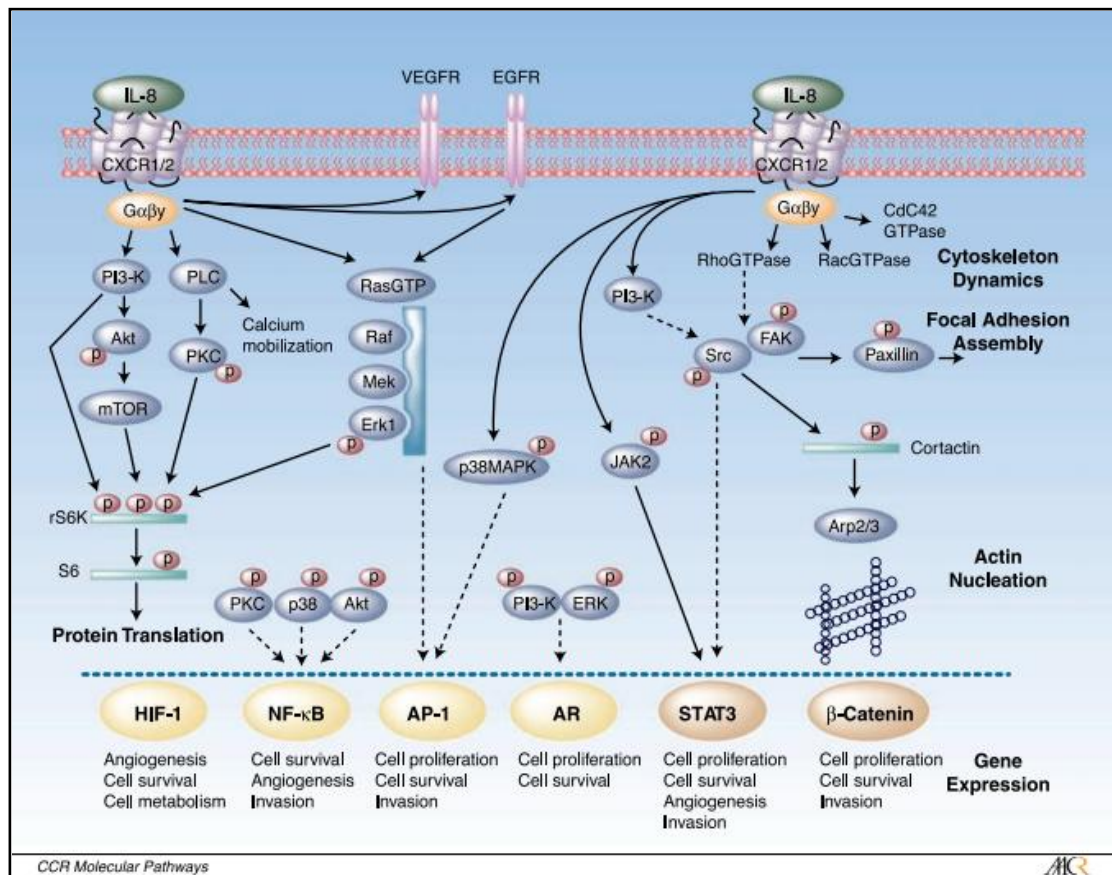
#### **4.5.1.4) Ιντερλευκίνη 8, IL-8.**

Η IL-8 είναι μέλος της άλφα υπο-οικογένειας των κυτταροκινών και αρχικά ανακαλύφθηκε ως ενεργοποιητικός και χημειοτακτικός παράγων των ουδετερόφιλων. Εκφράζεται σε πολλών ειδών κύτταρα όπως τα αιμοποιητικά, τους ινοβλάστες, τα ηπατοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα (139) αλλά και σε πολλά καρκινικά κύτταρα (140). Η έκφρασή της ρυθμίζεται από πλήθος διαφορετικών ερεθισμάτων, όπως φλεγμονώδη σήματα (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), χημικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες (χημειοθεραπευτικά φάρμακα, υποξία) και στεροειδικές ορμόνες (ανδρογόνα, οιστρογόνα, δεξαμεθαζόνη) (141). Ο εκκινητής της IL-8 περιέχει περιοχές πρόσδεσης για πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο πυρηνικός μεταγραφικός παράγων NF- $\kappa$ B, η ενεργοποιητική πρωτεΐνη-AP-1 και ο HIF-1 $\alpha$  (142).

Η IL-8 αλληλοεπιδρά με δύο διαμεμβρανικές, G- συζευγμένες πρωτεΐνες- υποδοχείς, τους CXCR1 και CXCR2 (143). Οι υποδοχείς μοιράζονται παρόμοιες δομικές ιδιότητες, γεγονός που υποδηλώνει πως προέκυψαν από διπλασιασμό γονιδίου. Τα σήματα μεταδίδονται διαμέσου της μεμβράνης, μετά από πολλές δομικές αλλαγές. Οι δυο υποδοχείς διαθέτουν διαφορετική ενεργοποιητική σχέση μορίου-συνδέτη. Συγκεκριμένα, ο CXCR1 ενεργοποιείται από την IL-8 και την χημειοτακτική πρωτεΐνη των κοκκιοκυττάρων (granulocyte chemotactic protein-2), ενώ ο CXCR2 ενεργοποιείται από πολλές CXC-κυτταροκίνες, περιλαμβανομένων των ογκογονιδίων, του ενεργοποιητικού πεπτιδίου των ουδετερόφιλων και της χημειοτακτικής πρωτεΐνης των κοκκιοκυττάρων (141).

Η επαγωγή του σηματοδοτικού μονοπατιού της IL-8 ενεργοποιεί πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια (**εικόνα 14**) τα οποία:

1. Επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων μέσω ρύθμισης των μεταγραφικών παραγόντων.
2. Ρυθμίζουν το κυτταρικό πρωτέωμα στο επίπεδο της μετάφρασης.
3. Επιδρούν στην οργάνωση του κυτταροσκελετού μέσω της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης των ρυθμιστικών πρωτεϊνών.



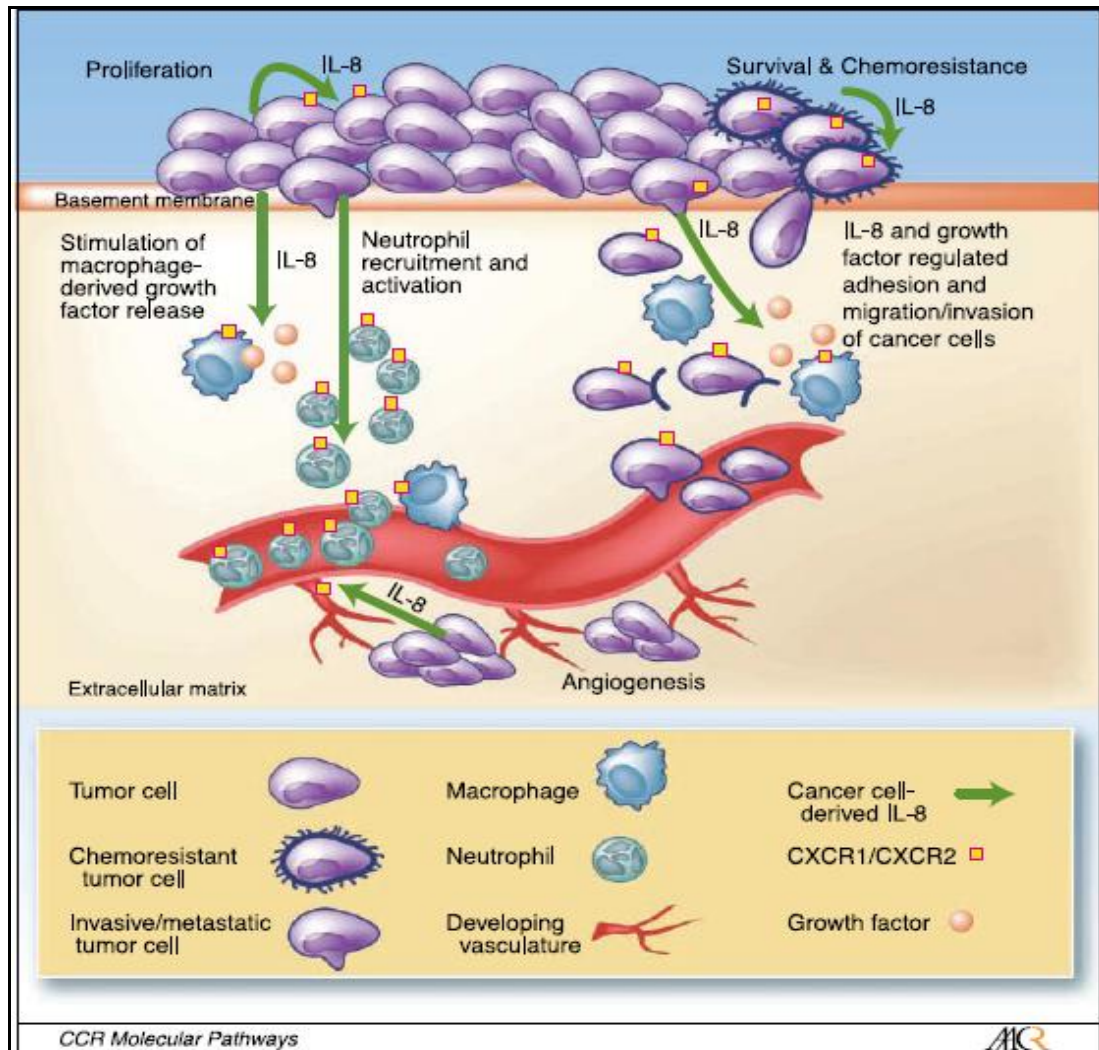
**Εικόνα 14:** Το σηματοδοτικό μονοπάτι της IL-8. Μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων CXCR1 & CXCR2, παρατηρείται είτε ενεργοποίηση της PI3K είτε της PLC, επάγοντας με τη σειρά τους την ενεργοποίηση της Akt, της PCK, την κινητοποίηση του ασβεστίου και τον καταρράκτη της MAPK. Τα μονοπάτια αυτά επάγουν τη μετάφραση των πρωτεϊνών (αριστερά) και τη ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων (βάση) (144).

Συγκεκριμένα, ένας από τους βασικούς στόχους της IL-8 είναι οι κινάσες, όπως η PI3K κινάση, η οποία είναι υπεύθυνη για τη χημειοταξία των ουδετεροφίλων και την αύξηση της φωσφορυλίωσης της Akt. Η αύξηση της έκφρασης της Akt έχει διαπιστωθεί σε πολλών ειδών καρκίνους, ρυθμίζοντας τη κυτταρική επιβίωση, την αγγειογένεση και τη μετανάστευση (145). Η IL-8, επιπλέον, ενεργοποιεί το μονοπάτι της MAPK κινάσης, το οποίο αποτελείται από κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Η ενεργοποίηση του συγκεκριμένου μονοπατιού γίνεται μέσω της φωσφορυλίωσης της Erk1/2 που παρατηρείται στα ουδετερόφιλα αλλά και στα καρκινικά κύτταρα (146).

Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης της MAPK προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση στα ουδετερόφιλα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα (147) και σε καρκινικές σειρές (148). Επίσης, η σύζευξη του υποδοχέα με τις Gai-πρωτεΐνες (**εικόνα 14**), οδηγεί σε ενεργοποίηση της PLC και κατά συνέχεια της PKC, με αποτέλεσμα τη χημειοταξία και τη ρύθμιση του κυτταροσκελετού, όπως παρατηρήθηκε σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (149). Εκτός από τις κινάσες σερίνης/θρεονίνης, η IL-8 φαίνεται να επάγει τη δράση και των κινασών τυροσίνης. Σε ενδοθηλιακά κύτταρα και σε καρκινικά κύτταρα ωοθήκης ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF) ενεργοποιείται και ρυθμίζει τον υπόλοιπο καταράκτη σηματοδότησης μέσω MAPK (150). Πρόσφατα, παρατηρήθηκε πως η IL-8 επάγει τη φωσφορυλίωση και του VEGFR2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλιακού φραγμού (151). Ταυτόχρονα με την επαγωγή των κινασών, το σηματοδοτικό μονοπάτι της IL-8 εμπλέκεται και στη ρύθμιση του πολυμερισμού της ακτίνης στον κυτταροσκελετό μέσω της ενεργοποίησης των Rho-GTPases, επηρεάζοντας τη κυτταρική κινητικότητα (152). Η ενεργοποίηση όλων αυτών των μονοπατιών οδηγεί στην επαγωγή της δράσης πολλών μεταγραφικών παραγόντων. Συγκεκριμένα η IL-8 αυξάνει την μεταγραφική ικανότητα του NF-κB στο μελάνωμα (153) και σε καρκινικές σειρές του προστάτου (154), μέσω της ενεργοποίησης της p38-PKC/MAPK, φωσφορυλίωσης της Akt ή μέσω αύξησης της PKC. Πρόσφατα, μελέτες απέδειξαν πως η IL-8 αυξάνει τη μεταγραφική ικανότητα των ανδρογονικών υποδοχέων σε καρκινικές σειρές προστάτου, υποδηλώνοντας πως η IL-8 είναι υπεύθυνη για την μετάβαση από τη εξαρτώμενη στην ανεξάρτητη από ανδρογόνα κατάσταση στον καρκίνο του προστάτου (155). Εκτός από τους ανδρογονικούς υποδοχείς, η IL-8 φαίνεται να επηρεάζει τη μετατόπιση στο πυρήνα και τη μεταγραφική ικανότητα και του HIF-1α σε καρκινικές σειρές προστάτου (156). Συνέπεια της ενεργοποίησης όλων αυτών των μεταγραφικών παραγόντων, που σχετίζονται με τη πρόοδο του καρκίνου, είναι η μεταγραφή πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στη μετανάστευση και στη διαφυγή της απόπτωσης (**εικόνα 14**).

Αρχικά λοιπόν, η IL-8 εθεωρείτο μόνο χημειοτακτικός παράγοντας των λευκοκυττάρων (157). Αργότερα όμως αποδείχτηκε πως διαθέτει μιτογόνες και

αγγειογενετικές ιδιότητες (158). Η έκφραση των υποδοχέων της IL-8 στα καρκινικά και ενδοθηλιακά κύτταρα, στα ουδετερόφιλα και στα μακροφάγα υποδηλώνει την επίδραση στο μικροπεριβάλλον του όγκου **(εικόνα 15)**. Συνέπεια λοιπόν, της ενεργοποίησης των υποδοχέων στα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελεί η επαγωγή του πολλαπλασιασμού, της επιβίωσης και της μετανάστευσης των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (147). Επιπλέον, η έκφραση των υποδοχέων στα καρκινικά κύτταρα υποδηλώνει πως το σηματοδοτικό μονοπάτι της IL-8 δρα τόσο με αυτοκρινικό όσο και με παρακρινικό τρόπο, προκειμένου να επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (159) και τη μετανάστευση (160). In vivo, τα αυξημένα επίπεδα της IL-8 συσχετίστηκαν με την αγγειογένεση, την υποτροπή και τη μετάσταση σε μοντέλα ποντικών με μελάνωμα, παγκρεατικό, ωοθηκικό καρκίνο και καρκίνο του προστάτου (161). Η υπερέκφραση της IL-8 σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο του όγκου, με την πρόοδο της νόσου και την υποτροπή σε καρκίνους όπως το μελάνωμα, ο καρκίνος μαστού, ο γαστρικός και ο ωοθηκικός καρκίνος και ο καρκίνος του προστάτου (162). Συμπεραίνουμε λοιπόν, πως η IL-8 αποτελεί σημαντικό στόχο των θεραπευτικών χειρισμών καθώς το σηματοδοτικό μονοπάτι της εμπλέκεται σε πολλούς μηχανισμούς της αγγειογένεσης του καρκίνου.

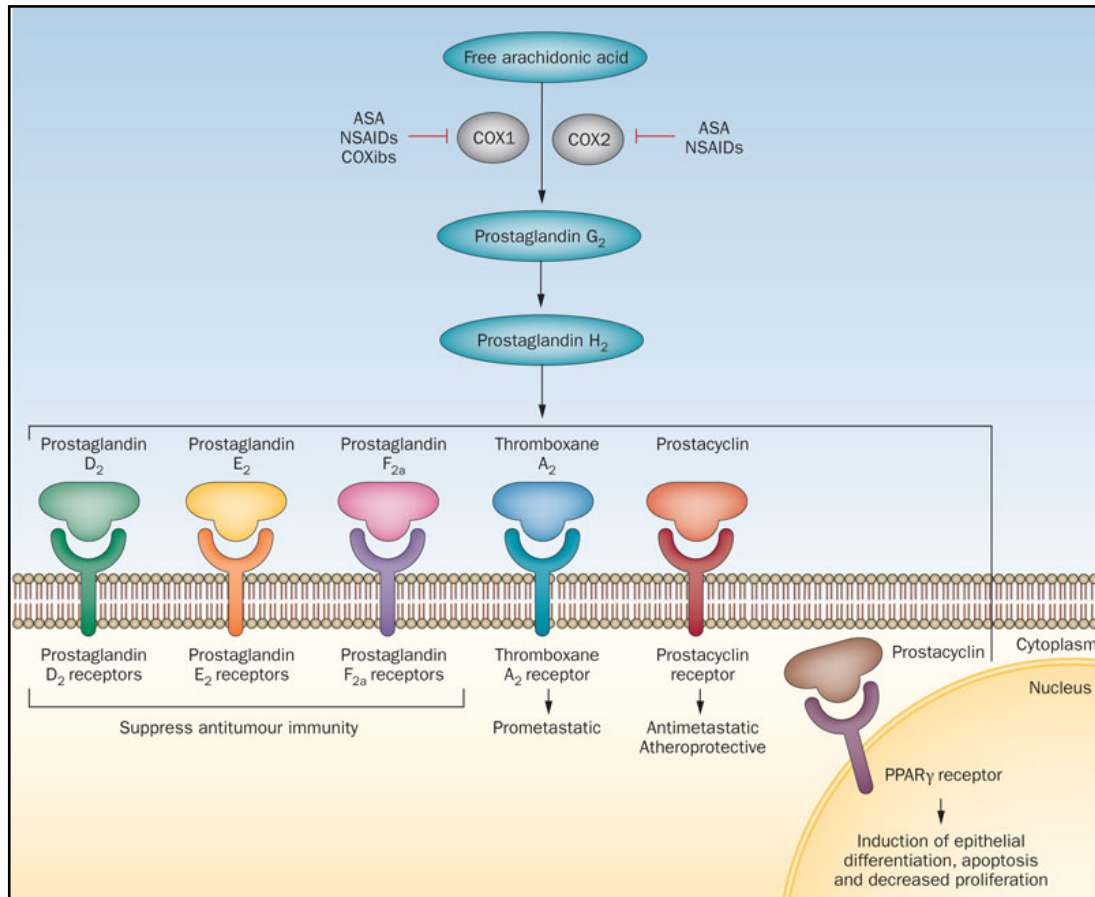


**Εικόνα 15:** Ο ρόλος της IL-8 στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Η έκκριση της IL-8 από τα καρκινικά κύτταρα επάγει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση με αυτοκρινικό τρόπο. Η IL-8 θα ενεργοποιήσει τα ενδοθηλιακά κύτταρα για την έναρξη της αγγειογένεσης και θα επάγει τη χημειοταξία των ουδετερόφιλων. Επίσης, τα μακροφάγα θα παράγουν επιπλέον αυξητικούς παράγοντες για την ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (144).

#### **4.5.1.5) Κυκλοοξυγενάση 2, COX-2.**

Η κυκλοοξυγενάση-2 ή COX-2, μέλος της οικογένειας των κυκλοοξυγενασών, αποτελεί σημαντικό ένζυμο που συμμετέχει στον καταρράκτη μετατροπής του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλανδίνες (163). Αρχικά παράγεται η προσταγλανδίνη PGG<sub>2</sub> και η PGH<sub>2</sub>, η οποία στη πορεία μετατρέπεται σε διάφορα εικοσανοειδή που περιλαμβάνουν τις προσταγλανδίνες PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2a</sub>, PGI<sub>2</sub> και τις θρομβοξάνες TXA<sub>2</sub> (**εικόνα 16**). Οι προσταγλανδίνες δεν πρωταγωνιστούν μόνο στη διαδικασία της φλεγμονής αλλά συμμετέχουν και σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού όπως είναι η πήξη του αίματος, η ωορρηξία, ο οστικός μεταβολισμός, η ανάπτυξη των νευρώνων, το τραύμα, η νεφρική λειτουργία, ο αγγειακός τόνος αλλά και η ανοσολογική απόκριση. Συντίθενται σε πολλούς ιστούς και δρουν ως μεσολαβητές είτε αυτοκρινώς είτε παρακρινικά προκειμένου να σηματοδοτήσουν τις κατάλληλες αλλαγές (164).

Υπάρχουν δυο ισομορφές κυκλοοξυγενάσης, η COX-1 και η COX-2. Διαθέτουν τις ίδιες καταλυτικές, ενζυμικές αντιδράσεις, έχουν παρόμοια πρωτεϊνική δομή, αλλά διαφορετικές ιδιότητες (165). Η COX-2 συμμετέχει κατεξοχήν στη φλεγμονή ενώ η COX-1 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιοστασίας. Οι διαφορετικοί ρόλοι των δυο ισομορφών σχετίζονται με τους ιστούς στους οποίους εκφράζονται. Η COX-1 εκφράζεται συνεχώς σε όλα τα κύτταρα και τους ιστούς, ενώ η COX-2 σε φυσιολογικές συνθήκες δεν ανιχνεύεται. Η έκφρασή της ενισχύεται μετά από οξέα φλεγμονώδη σήματα προκειμένου να παραχθούν προσταγλανδίνες (166). Μια ακόμα διαφορά ανάμεσα στις δυο ισομορφές είναι η διαφορετική χρήση του αραχιδονικού οξέος και τα διαφορετικά υποστρώματα που χρησιμοποιούν. Επίσης, τα δυο ισοένζυμα διαφέρουν ως προς τη σταθερότητα του mRNA, το mRNA μάλιστα και τη μεταγραφική ικανότητα. Τέλος, μικρή ομοιότητα έχουν και οι περιοχές ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης των δυο μορφών (167).



**Εικόνα 16:** Σχηματικό διάγραμμα της μετατροπής του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλανδίνες και άλλα εικοσανοειδή από τις κυκλοοξυγενάσες.

Η COX-2, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, δεν ανιχνεύεται σε κανένα κύτταρο σε φυσιολογικές συνθήκες. Η έκφρασή της επάγεται από διάφορους παράγοντες όπως αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, ορμόνες, φλεγμονή και υποξία. Η υποξία αυξάνει την έκφραση της COX-2 στα μονοκύτταρα, στα κύτταρα των αρθρώσεων, στα HUVEC, σε άλλες επιθηλιακές σειρές αλλά και σε καρκινικές σειρές όπως του πνεύμονα και του παγκρέατος (168). Ο μηχανισμός της επαγωγής της COX-2 διαφέρει ανάλογα των κυτταρικό τύπο. Στα HUVEC, οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB και Sp1 παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της υποξίας (169) ενώ στη καρκινική σειρά του πνεύμονα (A549), ο HIF-1α είναι ο καθοριστικός παράγοντας με μικρή μόνο συμμετοχή του NF-κB (170).

Η υπερέκφραση της COX-2 έχει παρατηρηθεί σε προκαρκινικές και καρκινικές περιοχές που έχουν αφαιρεθεί από διάφορα όργανα όπως ο πνεύμονας, ο μαστός, ο προστάτης, η ουροδόχος κύστη και το πεπτικό σύστημα (171). Η διαγραφή της COX-2 σε ποντίκια επιρρεπή στη δημιουργία καρκίνων είχε σαν αποτέλεσμα τη καταστολή της ογκογένεσης (172), ενώ οι εκλεκτικοί αναστολείς της COX-2 παρέχουν χημειοπροφύλαξη σε ανθρώπινα αλλά και ζωικά μοντέλα καρκινογένεσης (173). Οι παρατηρήσεις αυτές συνηγορούν στην εμπλοκή της υπερέκφρασης COX-2 στα πρώτα στάδια της δημιουργίας όγκων και στη μετατροπή από την προκαρκινωματώδη στη καρκινωματώδη κατάσταση. Τα καρκινικά κύτταρα, περιλαμβανομένων του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, εκφράζουν υψηλά επίπεδα της COX-2 και υπερέκφραση αυτή έχει συσχετιστεί με φτωχή πρόγνωση (174). Αυξημένα επίπεδα της COX-2 παρατηρήθηκαν και σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, όπου συσχετίστηκαν με την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στην απόπτωση (175). Επιπλέον, η COX-2 πυροδοτεί την αγγειογένεση καθώς αυξάνει την έκφραση του VEGF στον όγκο και στα στρωματικά κύτταρα (176). Επίσης, οι όγκοι που εκφράζουν αυξημένα επίπεδα της COX-2 εκφράζουν ταυτόχρονα αυξημένα επίπεδα άλλων αγγειογενετικών παραγόντων με αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων αγγείων στα HUVEC (177). Τέλος, τις αντιαγγειογενετικές δράσεις της COX-2 επιβεβαίωσαν μελέτες με ειδικούς αναστολείς του ενζύμου σε διάφορους τύπου καρκίνου, όπου παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης του όγκου και της δημιουργίας μεταστάσεων (178), με αποτέλεσμα η COX-2 να θεωρείται ένας ακόμα θεραπευτικός στόχος για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

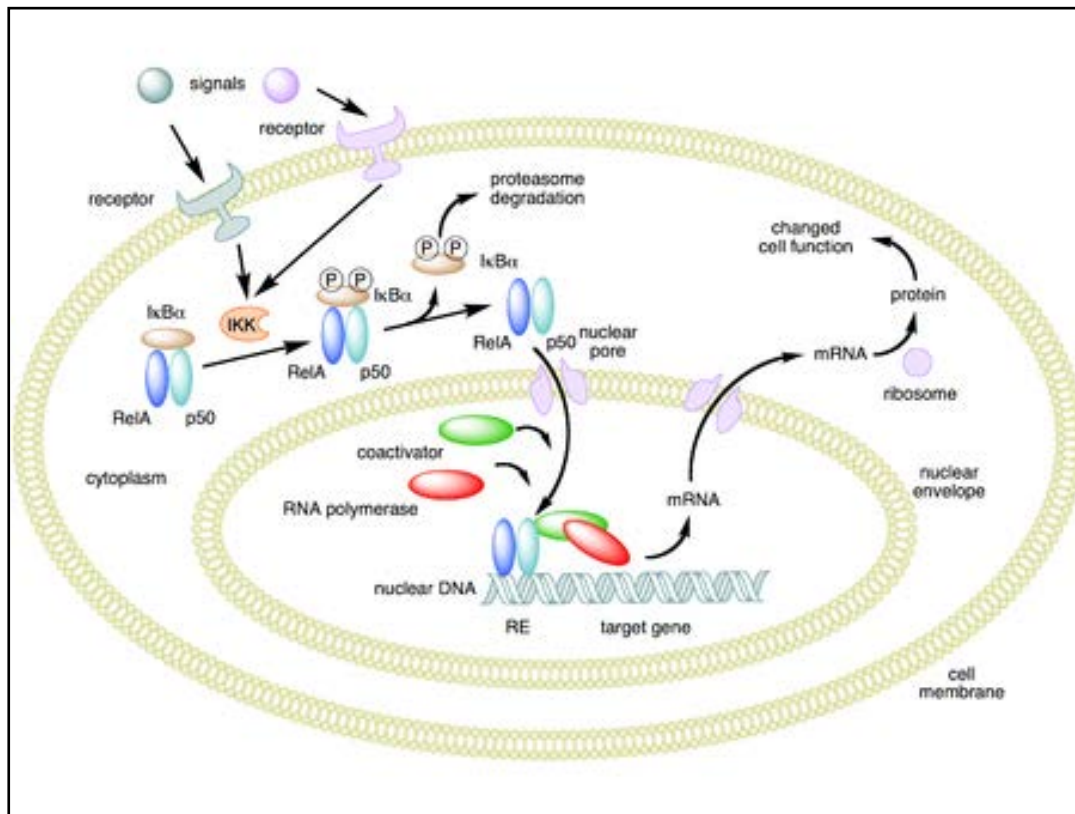
#### ***4.5.1.6) Πυρηνικός παράγοντας των κάππα ελαφρών αλύσεων των ενεργοποιημένων B κυττάρων, NF-κB.***

Ο NF-κB αποτελεί ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που ελέγχει τη μεταγραφή του DNA. Βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα και εμπλέκεται στις περισσότερες κυτταρικές αποκρίσεις μετά από επίδραση ερεθισμάτων όπως το στρες, οι κυτταροκίνες, η ακτινοβολία και τα βακτηριακά αντιγόνα (179). Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της ανοσολογικής απάντησης, ενώ λανθασμένος

έλεγχος στη δράση του συσχετίζεται με τον καρκίνο, τη φλεγμονή, αυτοάνοσες νόσους, σηπτικό σοκ και άλλες παθολογικές καταστάσεις (180).

Οι πρωτεΐνες NF-κB σχετίζονται με μια καλά δομημένη περιοχή πρόσδεσης-διμερισμού DNA που ονομάζεται Rel ομόλογη περιοχή. Όμως, η υποκατηγοριοποίηση της οικογένειας του NF-κB γίνεται με βάση τις αλληλουχίες στο C-τελικό άκρο της RH περιοχής. Τα μέλη της πρώτης κατηγορίας (οι NF-κB πρωτεΐνες p105, p100 και *drosophila relish*) έχουν μακριές C-τελικές περιοχές που περιέχουν πολλά αντίγραφα-επαναλήψεις της ανκυρίνης, που δρουν ανασταλτικά. Επιπλέον, για να γίνουν ενεργά, μειώνουν τη περιοχή πρόσδεσης DNA (p105 σε p50 και από p100 σε p52) καθώς αποδομούν τη C-τελική περιοχή μέσω του μονοπατιού ουμπικιτίνης/πρωτεασώματος (181). Επομένως, δεν ενεργοποιούν τη μεταγραφή παρά μόνο όταν σχηματίζουν διμερή με μέλη της δεύτερης κατηγορίας (182). Τη δεύτερη ομάδα αποτελούν οι Rel πρωτεΐνες και σε αυτή συμπεριλαμβάνονται οι c-Rel, RelB, RelA (p65), και η *Drosophila Dorsal*. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει πρωτεΐνες με C-τελικές περιοχές ενεργοποίησης μεταγραφής που δεν διατηρούν όμως τις ίδιες αλληλουχίες. Ο όρος NF-κB στη βιβλιογραφία αναφέρεται στο p50-RelA ετεροδιμερές, το οποίο σχηματίζεται πιο συχνά και αποτελεί το κυριότερο σύμπλεγμα στα κύτταρα.

Η ενεργοποίηση του NF-κB (**εικόνα 17**) απαιτεί την ενεργοποίηση του σηματοσώματος (signosome), του τριμερούς πρωτεϊνικού συμπλέγματος που περιέχει 2 ένζυμα την IκB κινάση -α και -β και τα οποία όταν ενεργοποιούνται από άλλες κινάσες, προάγουν την μετατόπιση και ενεργοποιούν τη μεταγραφική ικανότητα του NF-κB (183). Η IκB κινάση-β παίζει καθοριστικό ρόλο, καθώς μετά τη φωσφορυλίωση ο παράγοντας IκB που συγκρατεί τον NFκB στο κυτταρόπλασμα, αποσυνδέεται από τον NF-κB και έτσι ο ελεύθερος NF-κB μετατοπίζεται στον πυρήνα και ξεκινά η μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (184).



**Εικόνα 17:** Μηχανισμός ενεργοποίησης του NF-κB. Σε αδρανή κατάσταση, ο NF-κB βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, σε σύμπλεγμα με την ανασταλτική πρωτεΐνη IκB-α. Μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων εξωκυττάρια σήματα ενεργοποιούν το ένζυμο IκB κινάση (IKK). Αυτή με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την IκB-α κινάση, με αποτέλεσμα την ουμπικιουτίνωση (ubiquitination), το διαχωρισμό του κB-α από τον NF-κB και τη διάσπαση του IκB-α από το πρωτεόσωμα. Ο ενεργοποιημένος NF-κB μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου προσδένεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες που ονομάζονται *response elements* (RE). Το σύμπλεγμα DNA/NF-κB προσελκύει άλλες πρωτεΐνες όπως συνεργοποιητές και την RNA πολυμεράση με αποτέλεσμα τη μεταγραφή και την αλλαγή της λειτουργίας του κυττάρου (179).

Σε ένα μεγάλο ποσοστό προχωρημένων καρκινωμάτων η δραστηριότητα του NF-κB είναι αυξημένη (185). Αυτό οφείλεται στην αυξημένη έκφραση των Rel/NF-κ υποομάδων, στις μεταλλάξεις που καταργούν την έκφραση και τη δραστηριότητα των IκBs και στη θετική ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούν τον NF-κB μέσω του σηματοσώματος (186). Η ενεργοποίηση του NF-κB οδηγεί στη

μεταγραφή διαφόρων πρωτεϊνών, οι οποίες διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό (κυκλίνη D1, c-myc), επάγουν αγγειογένεση (VEGF, IL-8) και παρακινούν τη μετανάστευση και τη διασπορά των καρκινικών κυττάρων (MM-9, COX-2, ICAM-1) (187). Επιπλέον, ο NF-κΒ φαίνεται να ασκεί ισχυρή δράση στην απόπτωση. Η ενεργοποίησή του καταστέλλει τόσο το ενδογενές όσο και το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης (188). Επομένως, η θετική ρύθμιση του NF-κΒ πιθανολογείται ότι είναι υπεύθυνη για την αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά καθώς τα περισσότερα δρουν μέσω της απόπτωσης (189). Τέλος, η απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων φαίνεται να είναι ο στόχος του NF-κΒ στη μετρονομική χημειοθεραπεία (190) είτε με απευθείας δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα είτε έμμεσα μέσω ρύθμισης VEGF (191).

#### **4.5.2) ANΤΙΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.**

##### **4.5.2.1) Θρομβοσπονδίνη 1, TSP-1.**

Ο όρος θρομβοσπονδίνη επινοήθηκε από τον Jack Lawler και τους συνεργάτες του για να προσδιορίσουν μια πρωτεΐνη που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (192) και παίζει ρόλο στη συσσώρευση, στην αγγειογένεση και στην ογκογένεση. Η TSP-1 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 450 kD και αποτελεί το πιο καλά μελετημένο μέλος της οικογένειας θρομβοσπονδινών, που αποτελείται από 5 εξωκυττάρια πρωτεΐνες: TSP-1, TSP-2, TSP-3, TSP-4, and TSP-5. Οι TSP-1 και TSP-2 είναι παρόμοιες δομικά και εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες. Πολλά φυσιολογικά κύτταρα όπως τα ενδοθηλιακά, οι ινοβλάστες, τα λιποκύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα αλλά και κακοήγη κύτταρα όπως τα κύτταρα του γλοιώματος (54) εκκρίνουν TSP-1.

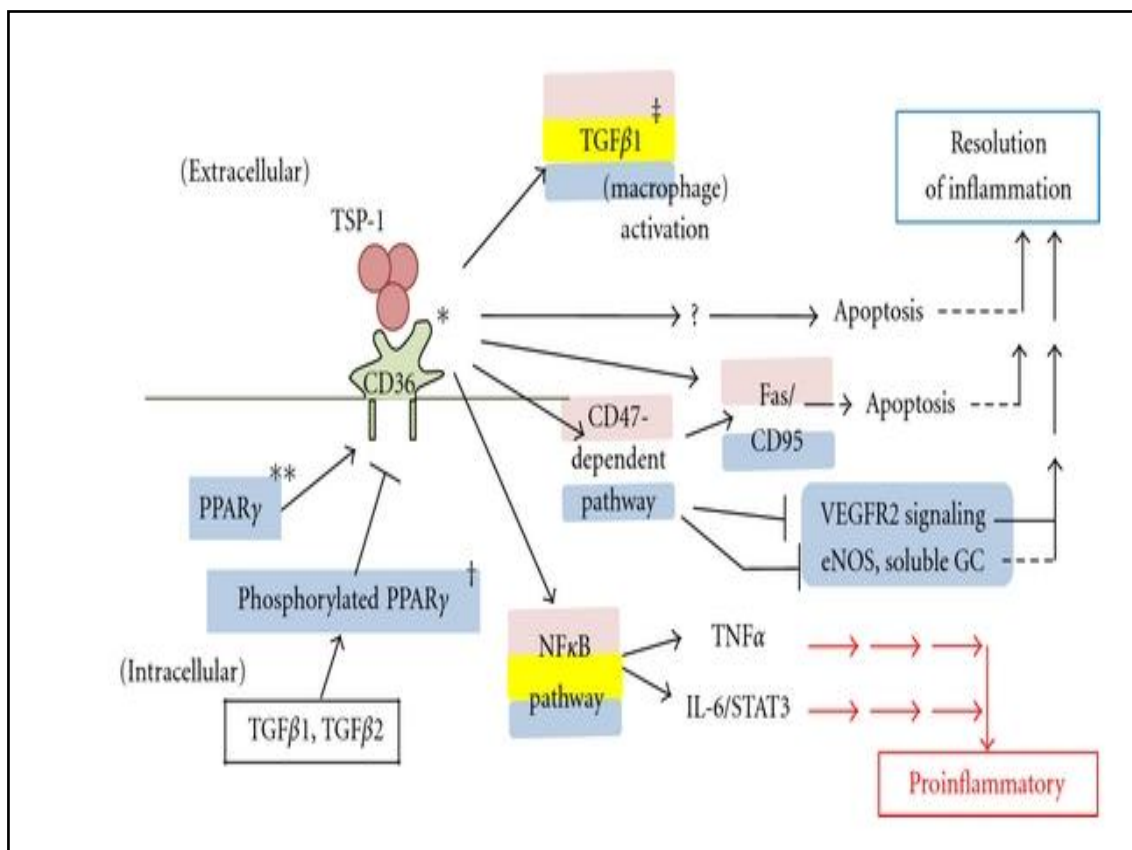
Η TSP-1 περιέχει μια NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή που δεσμεύει την ηπαρίνη, τις τύπου I, II και III επαναλήψεις και την καρβοξυ-τελική περιοχή (**εικόνα 18**). Η NH<sub>2</sub>-τελική

περιοχή αλληλοεπιδρά με τον υποδοχέα χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (low-density lipoprotein receptor-related protein, LRP1) ο οποίος απελευθερώνει τις ήδη προσδεδεμένες μεταλλοπρωτεάσες, διαμορφώνοντας τη δραστηριότητά της (193). Επιπλέον, στην ίδια περιοχή δεσμεύονται πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης και ιντεγκρίνες που παίζουν ρόλο στην αγγειογένεση, στη προσκόλληση και στη κυτταρική κινητικότητα (194). Τις επαναλήψεις τύπου II και III διαθέτουν και τα 5 μέλη της οικογένειας ενώ μόνο οι TSP-1 και TSP-2 περιέχουν τις επαναλήψεις τύπου I (195). Η τύπου I περιοχή ονομάζεται ομόλογη δομική περιοχή επαναλήψεων θρομβοσπονδίνης (thrombospondin structural homology repeats, TSRs) και είναι υπεύθυνη για την αναστολή της αγγειογένεσης μέσω ενεργοποίησης του CD36 και της επαγωγής απόπτωσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα (196). Οι τύπου III επαναλήψεις είναι περιοχές δέσμευσης ασβεστίου. Περιέχουν αλληλουχίες αμινοξέων που αλληλοεπιδρούν με την ελαστάση των ουδετερόφιλων και μέσω πρόσδεσης ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα (197). Επίσης, αναστέλλουν τη πρόσδεση του FGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα μειώνοντας την αγγειογένεση (198). Το καρβοξυλικό τελικό άκρο της TSP-1 προσδένεται με το CD47, γνωστό ως σχετιζόμενη με ιντεγκρίνες πρωτεΐνη (199). Αυτή η περιοχή αλληλοεπιδρά με ιντεγκρίνες όπως η β1 και η βν6 και με πρωτεογλυκάνες, ενεργοποιώντας τη κυτταρική προσκόλληση και την εξάπλωση (194). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις επηρεάζουν σημαντικά την αγγειογένεση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανοσολογική απάντηση.



λιποπρωτεΐνες, τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια και τα μακράς αλυσίδων λιπαρά οξέα (202). Ο CD36 είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας που συμμετέχει σε πολλές βιολογικές λειτουργίες όπως τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, την αναστολή της αγγειογένεσης, τη πρόσληψη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών και λιπαρών οξέων και τη κυτταρική προσκόλληση (203). Είναι απαραίτητος για την *in vitro* αναστολή της μετανάστευσης και του σχηματισμού νέων αγγείων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά την επίδραση της TSP-1 (204). Τέλος, στα ενδοθηλιακά κύτταρα ο CD36 σχετίζεται με τη οικογένεια των Src κινασών της τυροσίνης Fyn, Yes και Lyn (205) που συμμετέχουν στην CD36- εξαρτώμενη αναστολή της αγγειογένεσης από τη TSP-1 (196).

Το **CD47 (Cluster of Differentiation 47)** είναι γνωστό ως η πρωτεΐνη που σχετίζεται με ιντεγκρίνη (integrin associated protein - IAP) και αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο CD47. Ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών CD47 και προσδένεται με ιντεγκρίνες της μεμβράνης, τη TSP-1 και τη ρυθμιστική πρωτεΐνη σήματος (signal-regulatory protein alpha - SIRPα). Το CD47 είναι ένας μεμβρανικός υποδοχέας 50 kD, που διαθέτει εξωκυττάρια N-τελική περιοχή, IgV περιοχή, πέντε διαμεμβρανικές περιοχές και μια ενδοκυττάρια C-τελική περιοχή. Υπάρχουν 4 διαφορετικές ισομορφές που διαφέρουν μόνο στο μήκος του κυτταροπλασματικού (206). Εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα και υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα (207). Το CD47 εμπλέκεται σε πολλές βιολογικές διαδικασίες όπως η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός, η προσκόλληση και η μετανάστευση. Επιπλέον, παίζει ρόλο στην ανοσολογική και την αγγειογενετική απάντηση. Συγκεκριμένα, η πρόσδεση της TSP-1 στο CD47 ρυθμίζει την απελευθέρωση του μονοξειδίου του αζώτου (NO), επηρεάζοντας την αγγειοδιαστολή και τη χημειοταξία (208). Επιπλέον, ο υποδοχέας CD47 είναι σημαντικός στη μετανάστευση των λευκοκυττάρων διαμέσου του ενδοθηλιακού φραγμού (209). Επίσης, η ενεργοποίησή του προάγει την έκφραση της TSP-1 στα λευκοκύτταρα με αποτέλεσμα την απόπτωση των λευκοκυττάρων είτε με το μιτοχονδριακό μονοπάτι είτε μέσω ενεργοποίησης Fas/CD95 μονοπατιού (210). Τέλος, η πρόσφατη αποκάλυψη πως η σύνδεση της TSP-1 με τον CD47 αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του VEGFR2 οδήγησε στο συμπέρασμα της αντιαγγειογενετικής δράσης του CD47 (211).



**Εικόνα 19:** Ο ρόλος του CD36 και η αλληλεπίδρασή του με τη TSP-1 στη φλεγμονή. Η έκφρασή του αυξάνεται από τον PPARγ ενώ ο TGF επιδρά αρνητικά. Η αλληλεπίδραση του CD36/TSP-1 περιλαμβάνει διαμορφωτικές αλλαγές στη TSP-1. Αυτές οι αλλαγές οδηγούν σε αποπτωτικά φαινόμενα μέσω του CD47. Επίσης, η σύνδεση αυτή ενεργοποιεί τον TGFβ και το μονοπάτι NF-κB. Οι μπλε ετικέτες αντιστοιχούν στα ενδοθηλιακά κύτταρα, οι ροζ στα μακροφάγα και οι κίτρινες στα επιθηλιακά κύτταρα (212).

Ένας από τους πιο σημαντικούς ρόλους της TSP-1 είναι ότι αποτελεί ισχυρό ανασταλτικό παράγοντα της αγγειογένεσης (213). Στη βιβλιογραφία, έχουν αναφερθεί διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους η TSP-1 ασκεί την αντιαγγειογενετική δράση. Οι πιο σημαντικοί είναι:

- Ο ανταγωνισμός της TSP-1 και του VEGF στο μικροπεριβάλλον του όγκου είτε άμεσα είτε έμμεσα (**εικόνα 20**). Συγκεκριμένα, ο Rodriguez-Manzaneque το 2001 παρατήρησε πως παρουσία της TSP-1, υπήρχε μειωμένη πρόσδεση του VEGF στον υποδοχέα του. Συμπέραναν λοιπόν, πως η TSP-1 αναστέλλει

την απελευθέρωση του VEGF από την εξωκυττάρια ουσία μέσω της καταστολής της MMP δραστηριότητας (214). Επίσης η TSP-1 προσδένεται κατευθείαν στον VEGF, και η αλληλεπίδραση αυτή ρυθμίζει τη πρόσληψη αλλά και τη κάθαρση του VEGF από την εξωκυττάρια ουσία (215). Τέλος, η TSP-1 μπορεί να αναστείλει τη φωσφορυλίωση του VEGFR2 μέσω των TSRs περιοχών (216).

- Επαγωγή της απόπτωσης. Το 2000 ο Jimenez απέδειξε πως η TSP-1 επάγει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων είτε με εξαρτώμενους από το μιτοχονδριακό μονοπάτι μηχανισμούς είτε με ανεξάρτητους. Για την απόπτωση, σημαντικό βήμα αποτελεί η σύνδεση της TSP-1 με τον υποδοχέα CD36 (204) και κατά συνέχεια η ενεργοποίηση της Jun αμινο-τελική κινάση-JNK (217) ή η ενεργοποίηση του Fas/FasL υποδοχέα (218).
- Μείωση του αριθμού των CEPs. Αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο ο σημαντικός ρόλος των CEPs στην αγγειογένεση. Μελέτες του Shaked et al, απέδειξαν στη συνέχεια πως ανάλογα της TSP-1, μείωναν το αριθμό των CEP, και κατ' επέκταση επηρέαζαν την επιβίωσή τους (219).
- Αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, η TSP-1 αναστέλλει τη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου είτε μέσω πρόσδεσης στον υποδοχέα VLDLR (Very-low density lipoprotein receptor) και ενεργοποίησης του μονοπατιού Akt/MAPK (220) είτε μέσω του p21 και του p53 (221).

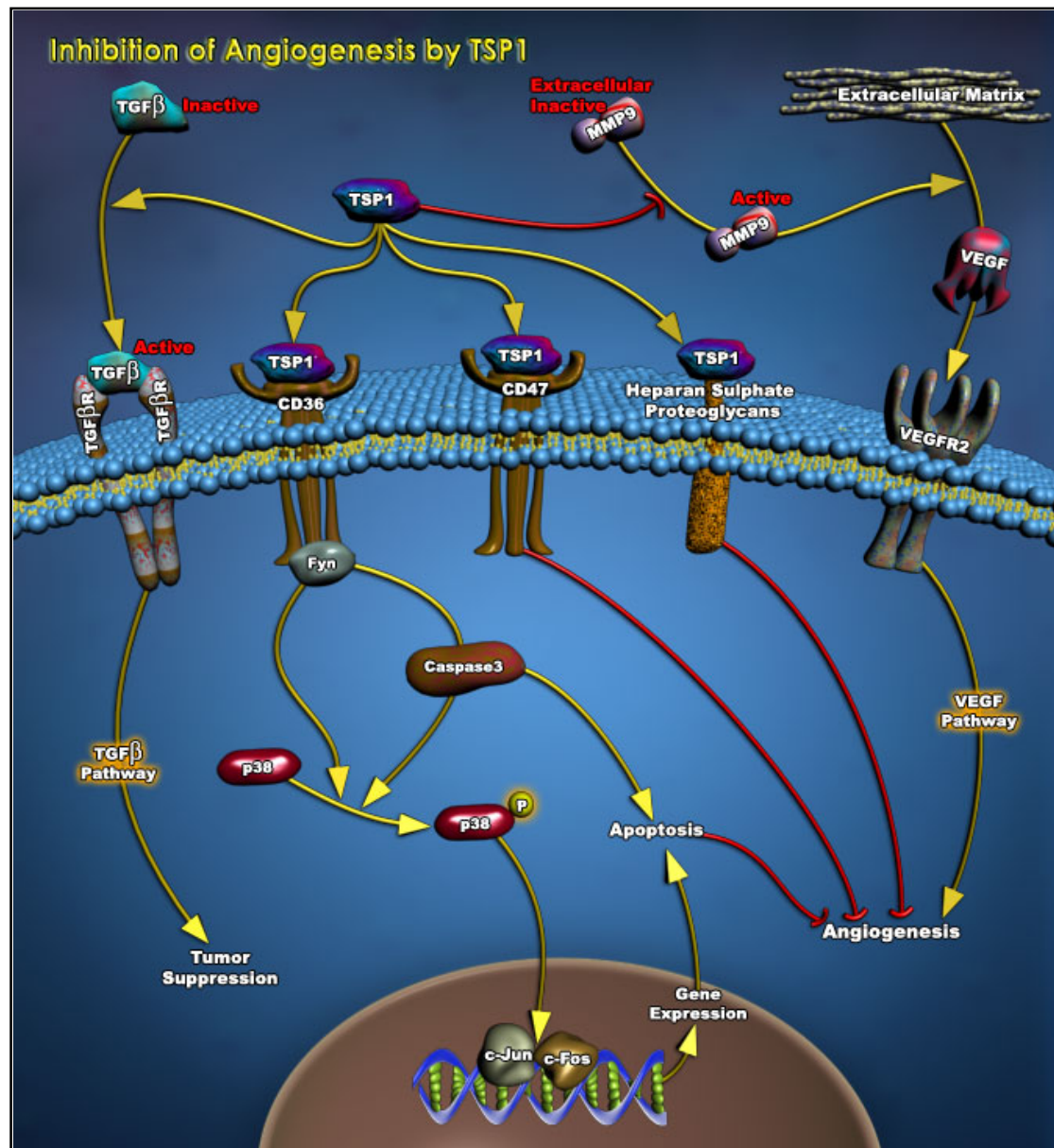


Επίσης, η TSP-1 είναι σημαντικός ενεργοποιητής του παράγοντα μετασχηματισμού TGFβ1 (227). Ο TGFβ1 ρυθμίζει την επούλωση του τραύματος (wound healing), τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το σχηματισμό της εξωκυττάριας ουσίας και την ανοσολογική απάντηση (**Εικόνα 21**). Εκκρίνεται στην εξωκύτταρια ουσία σε ανενεργή μορφή και η ενεργοποίηση γίνεται από τη περιοχή TSR της θρομβοσπονδίνης (228).

Επιπλέον, η TSP-1 παίζει ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονής ξεκινώντας τη δράση της από τα αρχικά στάδια (212). Η έκφρασή της στα ουδετερόφιλα βοηθά στην επαγωγή της χημειοτακτικής απάντησης στον τραυματισμένο ιστό (229). Η φλεγμονώδης διαδικασία διεγείρει την έκφραση της TSP-1 προκειμένου να οδηγήσει τα κατεστραμμένα κύτταρα σε φαγοκύττωση (230). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσω της πρόσδεσης στο CD36, που εκφράζεται στα μακροφάγα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, και της απόπτωσης. Επίσης, με την ενεργοποίηση του CD36 η TSP-1 ρυθμίζει τη ροή του αίματος και τη διήθηση των λευκοκυττάρων που προκαλούνται από το NO (225). Επομένως, η TSP-1 αναστέλλει τη φλεγμονή καθώς μπλοκάρει την προσκόλληση και την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, μειώνοντας την αγγειογένεση (208). Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της φλεγμονής η TSP-1 αλληλοεπιδρά με τον PPARγ που αποτελεί έναν πυρηνικό υποδοχέα μεταγραφικών παραγόντων. Έχει παρατηρηθεί λοιπόν, πως η απουσία του από τα λευκοκύτταρα, οδηγεί σε αύξηση της TSP-1 (231). Αντίθετα, η παρουσία του PPARγ αλλά και η ενεργοποίησή του, επάγει την αποπτωτική δράση του πεπτιδίου AB510 (ανάλογο της TSP-1) μέσω της αλληλεπίδρασης με το CD36 (232). Τέλος, πρόσφατα παρατηρήθηκε σύνδεση της TSP-1 και NF-κB. Συγκεκριμένα, το μπλοκάρισμα στο μονοπάτι του NF-κB έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της TSP-1 στους κοκκιώδεις ιστούς κατά την επούλωση του τραύματος (233). Τέλος, η TSP-1 αναστέλλει τη σύνδεση του NF-κB με το DNA, αναστέλλοντας έτσι την αγγειογένεση (234).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η TSP-1, σε προκλινικό επίπεδο είναι υπεύθυνη για την αντιαγγειογενετική δράση της μετρονομικής χημειοθεραπείας (53). Αλλά και σε μελέτες φάσης I, χορηγώντας μετρονομική ιρινοτεκάνη, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της TSP-1 (235). Επιπλέον, σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, μετά από μετρονομική χημειοθεραπεία, παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα TSP-1

σε αυτούς με σταθερή νόσο και χαμηλότερα σε αυτούς με υποτροπή (236). Τέλος, η έκφραση της TSP-1 σε καρκινικούς όγκους συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με την υποτροπή και σε πολλές περιπτώσεις θεωρήθηκε και ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας (237).



**Εικόνα 21:** Αναστολή της αγγειογένεσης από την TSP-1.

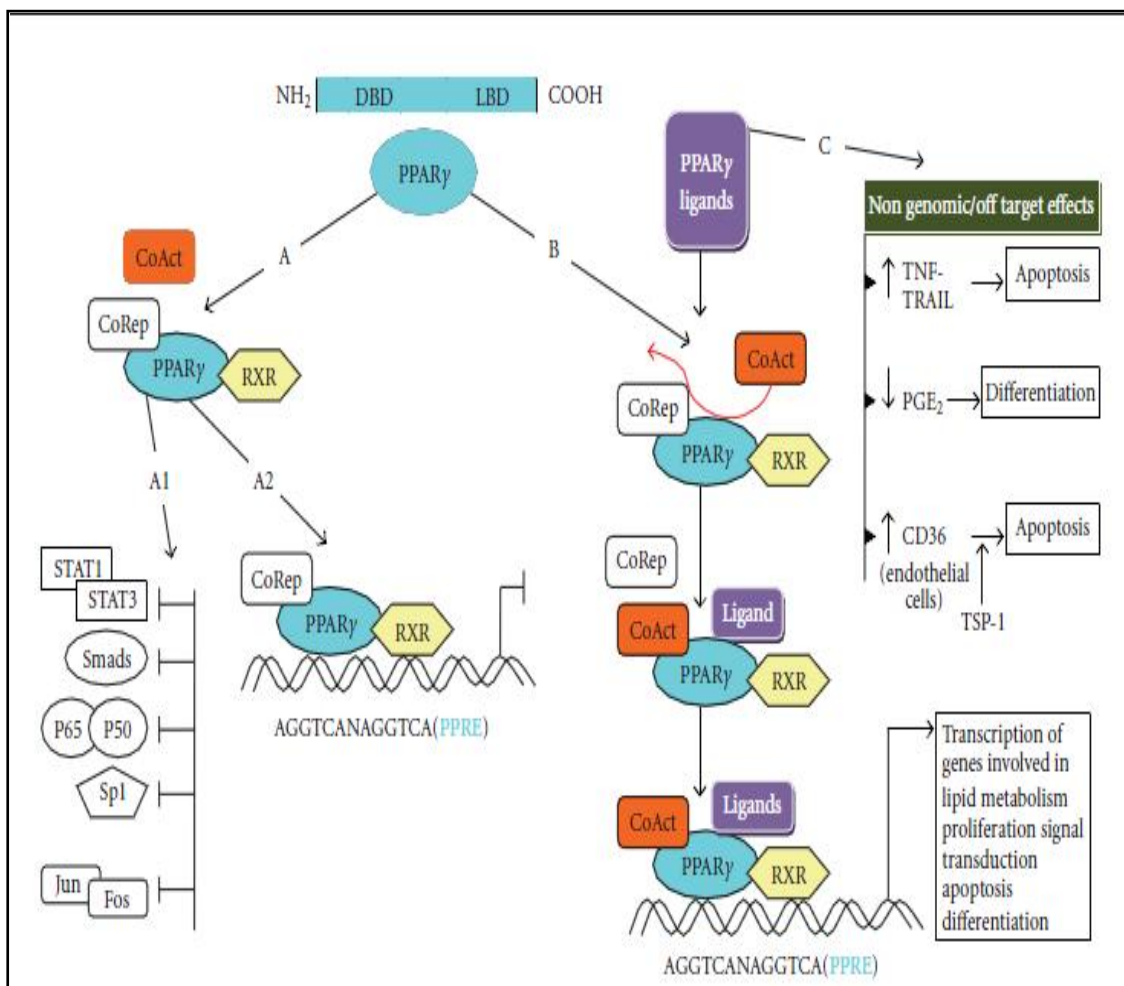
#### **4.5.2.2) Ενεργοποιημένος υποδοχέας γάμμα του πολλαπλασιασμού του περοξυσώματος, PPAR $\gamma$ .**

Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς του πολλαπλασιασμού του περοξυσώματος (PPARs) αποτελούν πυρηνικούς υποδοχείς που λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζοντας την έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται σε πληθώρα βιολογικών λειτουργιών όπως η σύνθεση των λιπιδίων, ο μεταβολισμός της γλυκόζης, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η επιβίωση (238). Με το πέρασμα των χρόνων, οι PPARs αποδείχθηκε πως συμμετέχουν στη φλεγμονή, στην αγγειογένεση και στη καρκινογένεση (239). Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί 3 μέλη της οικογένειας: ο PPAR $\alpha$ , ο PPAR $\beta/\delta$  και ο PPAR $\gamma$  που έχει ερευνηθεί περισσότερο (240).

Ο PPAR $\gamma$  βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς, στο ήπαρ, στους μύες, στον προστάτη, στο νεφρό, στο μαστό, στο έντερο και στο λιπώδη ιστό. Η πρωτεΐνη του αποτελείται από 3 λειτουργικές περιοχές: την αμινο-τελική περιοχή, τη περιοχή πρόσδεσης στο DNA και το καρβοξυ-τελικό άκρο. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα PPAR $\gamma$  γίνεται από πληθώρα προσδετών όπως τα λιπαρά οξέα, τις θειαζολινεδιόνες, τα εικοσανοειδή και τις προσταγλαδίνες (241). Μετά τη σύνδεση του υποδοχέα με τον συνδέτη, ακολουθείται ετεροδιμερισμός του PPAR $\gamma$  με τον υποδοχέα των ρετινοειδών X (RXR) προκειμένου η πρωτεΐνη να είναι λειτουργική (242). Το σύμπλεγμα PPAR $\gamma$ /RXR μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου προσδένεται στη περιοχή απόκρισης του περοξυσώματος των γονιδίων στόχων (peroxisome proliferator response element, PPRE) (243). Προκειμένου όμως να ρυθμιστεί η μεταγραφή, στο σύμπλεγμα χρειάζεται να προστεθούν και βοηθητικές πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές είτε επάγουν (coactivators) είτε καταστέλλουν (corepressors) τη μεταγραφή των γονιδίων (**εικόνα 22**).

Η μεταγραφική ικανότητα του PPAR $\gamma$  ρυθμίζεται αρνητικά μέσω φωσφορυλίωσης από τη MAPK κινάση (244) ενώ η φωσφορυλίωση της Ser-84/112 από την ERK κινάση φαίνεται να είναι ικανή να τερματίσει το σηματοδοτικό μονοπάτι του PPAR $\gamma$ . Άλλοι δύο μηχανισμοί - η διάσπαση του πρωτεασώματος (245) και η αποβολή από

τον πυρήνα μετά τη επίδραση των MEK κινασών (246) έχουν περιγραφεί ότι εμπλέκονται στην καταστολή και στον τερματισμό της σηματοδότησης.



**Εικόνα 22:** Το μονοπάτι του PPAR $\gamma$ . Η πρωτεΐνη PPAR $\gamma$  αποτελείται από 3 λειτουργικές περιοχές: την N-τελική, τη περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD) και τη καρβοξυλική τελική περιοχή. Ο PPAR $\gamma$  σχηματίζει ετεροδιμερή με έναν άλλο πυρηνικό υποδοχέα, της οικογένειας των ρετινοειδών (RXR). Ο PPAR $\gamma$  με τη παρουσία προσδετών καταστέλλει τη μεταγραφή (μονοπάτι A) είτε αλληλοεπιδρώνοντας με μεταγραφικούς παράγοντες (μονοπάτι A1) είτε μέσω της πρόσληψης των πρωτεϊνών corepressors (CoRep) στη περιοχή PPRE (μονοπάτι A2). Η πρόσδεση των προσδετών στον PPAR $\gamma$  (μονοπάτι B) επάγει διαμορφωτικές αλλαγές που οδηγούν στη διάσπαση των corepressors (CoRep) και στη μετέπειτα ένωση με τους coactivators (CoAct). Το σύμπλεγμα στη πορεία προσδένεται στο PPREs και επάγεται η μεταγραφή (μονοπάτι B). Οι προσδέτες των PPARs μπορούν να ασκήσουν τη δράση του και με ανεξάρτητο από τον PPAR $\gamma$  μηχανισμό (μονοπάτι C)(241).

Ανάμεσα στις πολλές λειτουργίες του PPAR $\gamma$ , η κυτταρική διαφοροποίηση, η απόπτωση και η αγγειογένεση θεωρούνται σημαντικά σημεία-μονοπάτια του καρκίνου (247). Επιπλέον, κάποιοι από τους προσδέτες του PPAR $\gamma$  διαθέτουν αντικαρκινικές δράσεις σε διαφόρων ειδών όγκους. Τα στοιχεία αυτά κατατάσσουν τον PPAR $\gamma$  ανάμεσα στους σημαντικούς ρυθμιστές της καρκινογένεσης (248). Η απόπτωση είναι ο κυριότερος μοριακός μηχανισμός με τον οποίο οι ενεργοποιητές του PPAR $\gamma$  ασκούν τη δράση τους στα κύτταρα που υπόκεινται κακοήγη εξαλλαγή (249). Εκτός όμως από την αποπτωτική δράση τους, ο PPAR $\gamma$  διαθέτει και αντι-αγγειογενετική δράση (250). Αυτή μπορεί να επιτευχθεί είτε αναστέλλοντας τη παραγωγή των αγγειογενετικών κυτταροκινών (251) είτε επάγοντας την έκφραση του υποδόχέα CD36 της TSP-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα (252). Επιπλέον, πιο πρόσφατα δεδομένα αποδεικνύουν πως οι ενεργοποιητές του PPAR $\gamma$  μπορούν να αναστείλουν το σηματοδοτικό μονοπάτι WNT στα επιθηλιακά κύτταρα του κόλου. Το γεγονός αυτό τροφοδοτεί ελπίδες σε πιθανή αναστολή της καρκινικής ανάπτυξης στο επίπεδο stem cells (253).

Ο PPAR $\gamma$  εκφράζεται σε καρκινικούς όγκους όπως του παχέος εντέρου, του μαστού, του προστάτου, του παγκρέατος και του πνεύμονα (254). Η έκφρασή του συσχετίστηκε με το στάδιο του όγκου, τη διαφοροποίηση αλλά και τη πρόγνωση με τις μελέτες να παρουσιάζουν διαφορετικά στοιχεία ανάλογα με το τύπο του καρκίνου. Έτσι, στον καρκίνο του πνεύμονα η μειωμένη έκφραση σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση (255) και στον καρκίνο του παγκρέατος σχετίζεται επίσης με φτωχή πρόγνωση αλλά και με προχωρημένο στάδιο (256).

Εκτός όμως από την αγγειογένεση, ο PPAR $\gamma$  εμπλέκεται και στη φλεγμονή. Ο πολύπλοκος ρόλος του καθιστά εύλογη την αλληλεπίδρασή του με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως αυτό της COX-2. Οι προσδέτες του PPAR $\gamma$  καταστέλλουν την έκφραση της COX-2 στα μακροφάγα και στα επιθηλιακά κύτταρα (257). Επίσης, οι μεταβολίτες της COX-2 αποτελούν ενδογενείς προσδέτες του PPAR $\gamma$  (258) και κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης, η αύξησή τους προκαλεί μείωση της COX-2 με αρνητικό ανατροφοδοτικό μηχανισμό που περιλαμβάνει τον PPAR $\gamma$  και τον NF- $\kappa$ B (259). Επιπλέον, οι προσδέτες του PPAR $\gamma$ -

ενδογενείς και συνθετικοί- μειώνουν την αυξημένη έκφραση της COX-2 σε διάφορες κακοήθειες όπως το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (260) και ο καρκίνος του πνεύμονα (261). Αντίθετα, υπάρχουν και μελέτες, όπου οι ενεργοποιητές του PPAR $\gamma$  προκαλούν αύξηση της COX-2 (262). Συμπεραίνουμε λοιπόν, πως η επίδραση των προσδετών του PPAR $\gamma$  στην έκφραση της COX-2 ποικίλλει ανάλογα τον κυτταρικό τύπο, το μόριο-προσδέτη και τους επιπρόσθετους διαμεσολαβητές.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ.**

Στις αρχές του 1990, παρουσιάστηκαν οι πρώτες σημαντικές μελέτες που ανέφεραν πως χαμηλές συγκεντρώσεις χημειοθεραπευτικών φαρμάκων που δίδονται συνεχόμενα και χωρίς διακοπές οδηγούν σε απόπτωση τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού δικτύου του όγκου με αποτέλεσμα να οδηγούν σε υποστροφή του όγκου (32). Από τότε δημιουργήθηκε ένα καινούργιο πεδίο έρευνας, χρησιμοποιώντας τα υπάρχοντα φάρμακα σε νέα δοσολογικά σχήματα που θα προσομοίαζαν στη Μετρονομική χημειοθεραπεία (29).

Μέχρι σήμερα, οι μεγαλύτερες κλινικές μελέτες με μετρονομικά σχήματα αφορούσαν το προχωρημένο καρκίνο του μαστού (34). Σε 8 από αυτές τις μελέτες, με συνολικά 500 ασθενείς, η μετρονομική χημειοθεραπεία μόνη (263) ή σε συνδυασμό με λετροζόλη (264) ή trastuzumab (265) ή bevacizumab (266) έδειξε πως αποτελεί μια ασφαλή και θεραπευτική αποτελεσματική προσέγγιση, με λιγότερες παρενέργειες. Ο μέσος ρυθμός αντικειμενικής ανταπόκρισης [πλήρης ανταπόκριση (complete response, CR) και μερική ανταπόκριση (partial response, PR)] και το ολικό κλινικό όφελος (overall clinical benefit) της μετρονομικής χημειοθεραπείας ήταν 39% και 57% αντίστοιχα. Ενδιαφέρον προκαλεί η μελέτη που χρησιμοποιεί μετρονομικά το συνδυασμό κυκλοφωσφαμίδης, μεθοτρεξάτης και trastuzumab, όπου παρατηρήθηκε κλινικό όφελος 46% στο σύνολο των ασθενών, και 27% για την ομάδα αντίστασης στη trastuzumab (265). Τα αποτελέσματα αυτά, συσχετίστηκαν με ανάλογα δεδομένα από προκλινικές έρευνες (267) και κατέληξαν στο συμπέρασμα πως ο συνδυασμός αυτός θα μπορούσε να αναστείλει τη υποτροπή ή να παρακάμψει την αντίσταση στο trastuzumab. Τέλος, μια μεγάλη τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III σύγκρινε το συνδυασμό της καθημερινής από του στόματος χορήγηση ουρακίλης και τεγκαφούρης με τη κλασική χημειοθεραπεία, και παρατήρησε πως η μετρονομική χημειοθεραπεία αποτελούσε μια υποσχόμενη μετεγχειρητική, συμπληρωματική πρακτική για ασθενείς υψηλού κινδύνου (268).

Εκτός από το μαστό, μελέτες με μετρονομικά σχήματα πραγματοποιήθηκαν και για τον καρκίνο των ωοθηκών (269), τον ορμονοάντοχο καρκίνο του προστάτου (270), το πολλαπλό μυέλωμα (271), τα γλοιοβλαστώματα (272, 273) και για άλλους καρκίνους **(πίνακας 1)**. Σε αυτές τις μελέτες, συμπεριελήφθησαν περισσότερο από 500 ασθενείς και τα αποτελέσματα έδειξαν 33% συνολικό ρυθμό ανταπόκρισης (από 13-69%) και συνολικό κλινικό όφελος 61% (από 30-93%). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η μέση διάρκεια ανταπόκρισης άγγιζε πολλούς μήνες ενώ η ολική επιβίωση (OS) και το διάστημα ελεύθερο νόσου (PFS) ήταν αυξημένα. Εάν λάβουμε υπόψιν το γεγονός ότι ο πληθυσμός των ασθενών σε αυτές τις μελέτες είχε κακή πρόγνωση και τις περισσότερες φορές αποτελούνταν από πολυθεραπευμένους αρρώστους, τα αποτελέσματα είναι αρκετά υποσχόμενα.

Είναι σημαντικό να τονιστεί πως, όταν ο πληθυσμός της μελέτης είναι ετερογενής η ανταπόκριση στη θεραπεία εξαρτάται από τον τύπο του καρκίνου. Αυτό αποδείχτηκε σε μια μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν 4 φάρμακα σε μετρονομικό μοντέλο (κυκλοφωσφαμίδη, βινβλαστίνη, ροφεκοξίμπη και μινοκυκλίνη) σε 47 ασθενείς με προχωρημένους καρκίνους (274) με απογοητευτικά αποτελέσματα. Στη συνέχεια, αρκετές μελέτες με μετρονομικά σχήματα παρουσίασαν τα δικά τους απογοητευτικά δεδομένα με αποτέλεσμα ο αρχικός ενθουσιασμός να κοπάσει. Οι μελέτες αυτές, συμπεριλαμβάναν ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο νεφρού (275), υποτροπιάζοντα γλοιοβλαστώματα (276) ή γλοιώματα (277) και μεταστατικά μελανώματα (278). Όμως, οι μελέτες αυτές, περιλάμβαναν αρκετά προχωρημένους καρκίνους, με πολύ κακή πρόγνωση και με φτωχή ανταπόκριση στη προηγούμενη κλασική χημειοθεραπεία. Καταλήγουμε λοιπόν στο συμπέρασμα, πως η ετερογένεια του πληθυσμού της μελέτης, το είδος της πρωταρχικής εστίας, ο τύπος και η κατάσταση των ασθενών είναι πολύ σημαντικά στοιχεία και καθορίζουν την ανταπόκριση στη μετρονομική χημειοθεραπεία.

| <b>Table 1   Pure metronomic chemotherapy studies in adults</b>                                                                                                                                         |                  |    |                                                                                                                           |                    |                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|------------------------------------|
| Patient population/<br>disease setting                                                                                                                                                                  | Type of<br>study | n  | Treatment regimen                                                                                                         | Efficacy           | Best<br>response                   |
| Recurrent metastatic breast/<br>lung/prostate cancer <sup>88</sup>                                                                                                                                      | Phase I          | 73 | Navelbine (oral, 3x/week)                                                                                                 | RR: 5%<br>CB: 20%  | PR: 4/73                           |
| Advanced refractory NSCLC <sup>89</sup>                                                                                                                                                                 | Phase II         | 46 | Navelbine (oral, 3x/week)                                                                                                 | RR: 11%<br>CB: 30% | PR: 5/46                           |
| Advanced refractory cancer <sup>90</sup>                                                                                                                                                                | Phase I          | 19 | Navelbine (oral, 3x/week)                                                                                                 | RR: 5%<br>CB: 10%  | PR: 1/19                           |
| Metastatic breast cancer in<br>elderly patients <sup>91</sup>                                                                                                                                           | Phase II         | 34 | Navelbine (oral, 3x/week)                                                                                                 | RR: 38%<br>CB: 68% | CR: 2/34–<br>PR: 11/34             |
| Metastatic breast cancer <sup>92</sup>                                                                                                                                                                  | Phase I          | 36 | Navelbine (oral, every 2 days) capecitabine<br>(oral, daily, 2 weeks on/1 week off)                                       | RR: 33%<br>CB: 63% | CR: 2/36–<br>PR: 10/36             |
| Advanced refractory gastric<br>cancer in elderly patients <sup>93</sup>                                                                                                                                 | Phase II         | 45 | Capecitabine (oral, daily, 4 weeks on/1 week<br>off)                                                                      | RR: 21%<br>CB: 51% | PR: 9/43                           |
| Refractory/relapsing<br>metastatic breast cancer <sup>94</sup>                                                                                                                                          | Phase II         | 60 | Capecitabine (oral daily)                                                                                                 | RR: 24%<br>CB: 86% | CR: 3/58–<br>PR: 11/58             |
| HER2-negative metastatic<br>breast cancer <sup>95</sup>                                                                                                                                                 | Phase II         | 51 | Cyclophosphamide (oral, twice daily, 2 weeks<br>on/1 week off) capecitabine (oral, twice daily,<br>2 weeks on/1 week off) | RR: 44%<br>CB: 58% | CR: 4/45–<br>PR: 16/45             |
| Refractory/relapsing<br>metastatic breast cancer <sup>96</sup>                                                                                                                                          | Phase II         | 68 | Cyclophosphamide (oral, daily, 2 weeks<br>on/1 week off) capecitabine (oral, daily,<br>2 weeks on/1 week off)             | RR: 30%<br>CB: 53% | CR: 1/66–<br>PR: 19/66             |
| Glioblastoma and recurrent<br>grade III glioma <sup>97</sup>                                                                                                                                            | Phase II         | 47 | Temozolomide (oral, daily)                                                                                                | RR: 11%<br>CB: 39% | PR: 4/38                           |
| Recurrent glioblastoma <sup>98</sup>                                                                                                                                                                    | Retrospective    | 27 | Temozolomide (oral, daily, 1 week on/1 week<br>off)                                                                       | RR: 11%<br>CB: 30% | PR: 3/20                           |
| Advanced solid tumours <sup>99</sup>                                                                                                                                                                    | Phase II         | 24 | Cyclophosphamide (oral, daily)                                                                                            | NA                 | NA                                 |
| Metastatic breast cancer <sup>100</sup>                                                                                                                                                                 | Phase II         | 60 | Cyclophosphamide (oral, daily) capecitabine<br>(oral, twice daily)                                                        | RR: 22%<br>CB: 57% | CR: 1/60–<br>PR: 12/60             |
| Metastatic castration-<br>resistant prostate cancer <sup>101</sup>                                                                                                                                      | Phase II         | 58 | cyclophosphamide (oral, daily) methotrexate<br>(oral, 2x/week)                                                            | RR: 18%<br>CB: 41% | PR: 3/17<br>PSA response:<br>15/58 |
| Metastatic hormonal-<br>resistant breast cancer <sup>102</sup>                                                                                                                                          | Retrospective    | 61 | cyclophosphamide (oral, daily) ± methotrexate<br>(oral, twice weekly)                                                     | RR: 18%<br>CB: 52% | PR: 11/61                          |
| Recurrent metastatic breast<br>cancer <sup>103</sup>                                                                                                                                                    | Phase II         | 40 | Irinotecan (IV weekly, 3 weeks on/1 week off),<br>tegafur–gimeracil–oteracil (oral, 5x/week,<br>3 weeks on/1 week off)    | RR: 47%<br>CB: 97% | CR: 1/34–<br>PR: 15/34             |
| Recurrent/metastatic<br>colorectal cancer <sup>104</sup>                                                                                                                                                | Phase II         | 45 | Irinotecan (IV weekly, 3 weeks on/1 week off),<br>fluoropyrimidine S-1 (oral, 5x/week, 3 weeks<br>on/1 week off)          | RR: 49%<br>CB: 84% | CR: 1/45–<br>PR: 21/45             |
| Abbreviations: CB, clinical benefit; CR, complete response; NA, not available; NSCLC, non-small-cell lung cancer; PD, progressive disease; PR, partial response; RR, response rate; SD, stable disease. |                  |    |                                                                                                                           |                    |                                    |

**πίνακας 1:** μετρονομική χημειοθεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο (279).

\*για περισσότερο από 6 μήνες. Συνντήσεις: CB: κλινικό όφελος, CR: πλήρης ανταπόκριση, iv: ενδοφλέβια χορήγηση, PR: μερική ανταπόκριση, RR: ποσοστό ανταπόκρισης, sc: υποδόρια, SD: σταθερή νόσος.

Παρόλα αυτά στη βιβλιογραφία, υπάρχουν και αρκετές μελέτες με ενθαρρυντικά αποτελέσματα που αφορούν στη μετρονομική χημειοθεραπεία, σε επίπεδο παρηγορητικής θεραπείας ή σε πολυθεραπευμένους αρρώστους με προχωρημένο κολοορθικό καρκίνο (280), γαστρικό καρκίνο, μεταστατικό μελάνωμα (281) και άλλους (282). Συγκεκριμένα, μια αναδρομική ανάλυση 9 πολυκεντρικών μελετών φάσης II, ανέδειξε το κλινικό όφελος της μετρονομικής χημειοθεραπείας σε συνδυασμό με αναστολείς της COX-2 και άλλους ρυθμιστές της μεταγραφής (283). Επιπλέον, σε μεγάλη τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III, ασθενείς με χειρουργηθέν αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν ουρακίλη και τεγκαφούρη για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πλεονέκτημα επιβίωσης χωρίς ουσιώδη τοξικότητα (284). Τέλος, τη θεωρητική βάση και τη κλινική αξία της μετρονομικής χημειοθεραπείας αποδεικνύουν τα σχήματα εβδομαδιαίας χορήγησης ταξανών (285, 286), η παρατεταμένη χορήγηση από του στόματος ετοποσίδης σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα (287) και τα σχήματα μακροχρόνιας συντήρησης με αλκαλοειδή της vinca σε παιδιατρικούς όγκους (83).

### 5.1) ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗ

Στα προηγούμενα κεφάλαια αναλύθηκε η αντιαγγειογενετική δράση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, η οποία πιστοποιήθηκε με πολλές προκλινικές μελέτες (14). Όμως, το γεγονός πως τα περισσότερα αντιμιτωτικά φάρμακα χρησιμοποιούνται ενδοφλέβια, αποτελούσε τροχοπέδη στη διεξαγωγή κλινικών δοκιμών με μετρονομικά σχήματα. Έτσι, μέχρι τις αρχές του 2000 οι περισσότερες μελέτες με μετρονομική χημειοθεραπεία αφορούσαν στη κυκλοφωσφαμίδη. Η πρόσφατη κυκλοφορία της VRL σε φαρμακοτεχνική μορφή καψιδίου έδωσε τη δυνατότητα στην επιστημονική κοινότητα να πραγματοποιήσει μελέτες με μετρονομική VRL. Το 2006, ξεκίνησε η κλινική μελέτη φάσης I μετρονομικής VRL σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο, μελέτη που καταχωρήθηκε στο [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) με κωδικό NCT00278070 (288). Η από του στόματος χορήγηση VRL έδειξε βιοδιαθεσιμότητα στο 40%, χωρίς να επηρεάζεται από τη λήψη τροφής ή την ηλικία, με μέτρια μεταβλητότητα και γραμμική φαρμακοκινητική (289;290) ενώ από τους μεταβολίτες της μόνο ο 4-O- αποακετυλοβινορελμπίνη (4-O-deacetylvinorelbine) είναι ενεργός (291). Βασικό σκοπό της μελέτης αποτελούσε η ανεύρεση των ασφαλών δόσεων της μετρονομικής χημειοθεραπείας ενώ στα δευτερεύοντα σημεία περιλαμβάνονταν η ασφάλεια, η ανεκτικότητα, η φαρμακοκινητική αλλά και η ανάλυση βιοδεικτών. Στη παραπάνω μελέτη έλαβαν μέρος 62 ασθενείς, οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν από 20mg μέχρι 70mg από του στόματος βινορελμπίνη 3 φορές την εβδομάδα. Η διάμεση διάρκεια θεραπείας ήταν 12,25 εβδομάδες. Στη διάρκεια αυτή, μόνο σε 3 ασθενείς που έλαβαν τις 2 μεγαλύτερες δόσεις (60 & 70 mg) παρατηρήθηκαν μη αποδεκτές τοξικότητες. Η ανώτερη αποδεκτή μετρονομική δόση ήταν τα 50mg. Σε 8 ασθενείς παρατηρήθηκε αντικειμενική ανταπόκριση ενώ το 32 % είχε σταθερότητα νόσου για πάνω από 6 μήνες. Οι 3 ασθενείς που ανταποκρίθηκαν έλαβαν αγωγή για πάνω από 3 χρόνια χωρίς τοξικότητα. Από την ανάλυση των βιοδεικτών βρέθηκε πως τα χαμηλά επίπεδα της IL-8, VEGF και του FGF-2 πριν τη θεραπεία αποτελούν προβλεπτικούς δείκτες αποτελεσματικότητας. Τέλος, από τη φαρμακοκινητική μελέτη προέκυψε πως τα trough steady-state (Χαμηλότερα αποτελεσματικά σταθερά επίπεδα) του φαρμάκου

και του μεταβολίτη κυμαίνονται από 0.5 to 1.5 ng/mL. Κατέληξαν λοιπόν στο συμπέρασμα πώς η μετρονομική χορήγηση 50 mg VRL 3 φορές την εβδομάδα είναι εφικτή, προκαλώντας αντιαγγειογενετικές δράσεις, χωρίς ουσιαστική κλινική τοξικότητα. Με αφορμή λοιπόν τα θετικά αποτελέσματα, οι ερευνητές προχώρησαν ένα βήμα παραπάνω, σε μελέτη φάσης II της μετρονομικής VRL, προσπαθώντας να προσδιορίσουν τη βέλτιστη μετρονομική δόση.

Στη μελέτη MOVIN (Metronomic Oral VINorelbine) συμμετείχαν 73 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, προστάτου και μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (NSCLC), οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 30, 40 ή 50 mg VRL 3 φορές την εβδομάδα μέχρι να εμφανίσουν πρόοδο νόσου. Πρωτεύον καταληκτικό σημείο αποτελούσε ο χρόνος μέχρι αποτυχίας της θεραπείας (TTF) ενώ στα δευτερεύοντα ανήκαν το ελεύθερο πρόοδο νόσου διάστημα (PFS), η φαρμακοκινητική, η τοξικότητα και οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις των βιοδεικτών. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν ανέδειξε διαφορά στο 4-μηνών διάστημα TTF ανάμεσα στα 3 σκέλη. Αντικειμενική ανταπόκριση παρατηρήθηκε σε 2 ασθενείς με NSCLC (δόσεις 30 και 50mg), σε έναν με καρκίνο μαστού (δόση 40mg) και σε έναν με καρκίνο προστάτου (δόση 50 mg) που διήρκεσε από 4 μέχρι 100 εβδομάδες. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες ήταν ήπιες και δεν διέφεραν στα 3 δοσολογικά σχήματα. Όσον αφορά στη φαρμακοκινητική, σταθερά χαμηλά επίπεδα VRL επιτεύχθηκαν από την δεύτερη εβδομάδα χωρίς συσσώρευση στην συνέχεια και η μέση τιμή για κάθε ομάδα ήταν 1.8 ng/ml (30mg), 2.2 ng/ml (40mg) and 2.6 ng/ml (50mg). Επίσης, επαληθεύτηκαν τα αποτελέσματα της μελέτης φάσης I, που αφορούσαν στην ανάλυση των βιοδεικτών, με τα χαμηλά επίπεδα του FGF-2 και της IL-8 να προβλέπουν καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία. Λαμβάνοντας υπόψιν, την κατασταλτική δράση στον όγκο, τη διάρκεια ανταπόκρισης, την αμνηλεέα τοξικότητα ακόμα και στην υψηλότερη δόση, αλλά και το γεγονός πως δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση του φαρμάκου στη διάρκεια του χρόνου, η μετρονομική χημειοθεραπεία με βέλτιστη δόση 50 mg VRL θα μπορούσε να αποτελέσει εναλλακτική θεραπευτική στην αντιμετώπιση του προχωρημένου καρκίνου (292). Έκτοτε, πραγματοποιήθηκαν και άλλες μελέτες της μετρονομικής VRL είτε σε συνδυασμό με πλατίνα σε ασθενείς με NSCLC (293), είτε σε συνδυασμό με bevacizumab σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (294) με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΓΧΟΡΗΓΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΩΝ ΤΟΥ PPAR $\gamma$ (ΡΟΣΙΓΛΙΤΑΖΟΝΗ) ΜΕ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗ.**

Εκτεταμένες επιστημονικές έρευνες των τελευταίων ετών έφεραν στο φως πολύτιμα δεδομένα που αφορούν σε μοριακούς μηχανισμούς και σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη αγγειογένεση. Η μετρονομική χημειοθεραπεία, όπως αναπτύχθηκε ενδελεχώς παραπάνω, φέρεται να έχει αντιαγγειογενετικές δράσεις καθώς αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ έμμεσα επιφέρει αντιαγγειογενετικό αποτέλεσμα μέσω επαγωγής της TSP-1 (54). Επιπρόσθετα, ερευνητές υποστηρίζουν πως η μετρονομική χημειοθεραπεία επιφέρει το μέγιστο θεραπευτικό όφελος όταν χορηγηθεί σε συνδυασμό με συμβατικές χημειοθεραπείες ή στοχευμένα φάρμακα (29). Στους υποψήφιους θεραπευτικούς συνδυασμούς περιλαμβάνονται οι αναστολείς της COX-2 (295) και οι αντι-VEGF/VEGFR παράγοντες (296). Παρατηρούμε λοιπόν, πως τα τελευταία χρόνια στη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου, στοχεύουμε σε περισσότερα από ένα σηματοδοτικά μονοπάτια- μοριακούς στόχους για να πετύχουμε το βέλτιστο αποτέλεσμα.

Προκαταρκτικά αποτελέσματα με μετρονομική βινορελμπίνη έδειξαν πως επηρεάζεται θετικά η έκφραση του PPAR $\gamma$  (297). Ο PPAR $\gamma$  είναι μέλος της οικογένειας των πυρηνικών μεταγραφικών υποδοχέων. Συμμετέχει σε πολλές βιολογικές διαδικασίες όπως η λιπογένεση, ο μεταβολισμός της γλυκόζης, η φλεγμονή, η αθηροσκλήρυνση και η απόπτωση (298, 299). Στα HUVEC, η ενεργοποίηση του PPAR $\gamma$  από μόρια προσδότες όπως η ροσιγλιταζόνη βρέθηκε ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους και οδηγεί σε απόπτωση. Επιπλέον, αναστέλλει την δημιουργία αγγειακών δομών σε *in vitro* συστήματα και μειώνει τα mRNA επίπεδα των υποδοχέων του VEGF, VEGFR1 και VEGFR2 (300). Ένα άλλο στοιχείο που συνηγορεί υπέρ της αγγειοκατασταλτικής δράσης του PPAR $\gamma$ , είναι ότι η ενεργοποίηση από τον προσδότη ροσιγλιταζόνη αυξάνει την έκφραση του κυτταρικού υποδοχέα επιφανείας CD36, κύριου υποδοχέα της TSP-1, μέσω του οποίου η TSP-1 εκφράζει την

αγγειοκατασταλτική της δράση (196). Τέλος, βρέθηκε ότι βελτιώνει την ανταπόκριση των κυττάρων στην TSP-1 (232). Συμπεραίνουμε λοιπόν, πως μέσω ενεργοποίησης του PPAR $\gamma$ , η ροσιγλιταζόνη διαθέτει έμμεσες και σημαντικές αντιαγγειογενετικές δράσεις. Το γεγονός αυτό, θα μπορούσε να την κατατάξει ανάμεσα στα υποψήφια φάρμακα συνδυασμού με μετρονομική χημειοθεραπεία. Όμως, από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, προέκυψε πως ελάχιστες είναι οι μελέτες που συνδύασαν τις θειαζολινεδιόνες με μετρονομικού τύπου θεραπεία (282, 301).

Επομένως, στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, μελετήθηκε ο συνδυασμός της μετρονομικής VRL με τη ροσιγλιταζόνη έτσι ώστε να διαπιστωθεί τυχόν συνεργική δράση των δυο φαρμάκων στην αναστολή της αγγειογένεσης.

## ΣΚΟΠΟΣ

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου έχει επικρατήσει να βασίζεται στη περιοδική χορήγηση κυτταροτοξικών φαρμάκων στη μέγιστη ανεκτή δόση. Ένας συμβατικός τρόπος που στοχεύει στη πρόκληση της μέγιστης αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων με απώτερο σκοπό το μέγιστο θεραπευτικό όφελος. Όμως, τα τελευταία χρόνια έδαφος κερδίζει η μετρονομική χημειοθεραπεία. Μια εναλλακτική στρατηγική, ένα διαφορετικό μοντέλο θεραπευτικής αντιμετώπισης που εκμεταλλεύεται τις αντιαγγειογενετικές ιδιότητες συμβατικών κυτταροστατικών φαρμάκων, τα οποία χορηγούμενα σε μικρές, υποτοξικές δόσεις, σε αδιάλειπτη χορήγηση για μακρό χρονικό διάστημα, αναστέλλουν την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση. Έναυσμα για τη πραγματοποίηση της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η διενέργεια της κλινικής δοκιμής MOVIN από την ομάδα του κ. Μπριασούλη (μελέτη φάσης I-II χορήγησης βινορεμπίνης σε μετρονομικό μοντέλο). Παράλληλα με τη κλινική δοκιμή, μελετήσαμε τις μοριακές δράσεις της βινορελπίνης σε ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro* μοντέλου προσομοίωσης της κλασικής και της μετρονομικής χημειοθεραπείας. Πρωταρχικό βήμα για τη πραγματοποίηση της παραπάνω μελέτης αποτέλεσε ο σχεδιασμός ενός μοντέλου μετρονομικής χημειοθεραπείας *in vitro* που να προσομοιάζει όσον το δυνατό περισσότερο με αυτό της κλινικής πρακτικής, τόσο στο χρόνο όσο και στον τρόπο χορήγησης του φαρμάκου.

Σκοπό της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε ο έλεγχος μοριακών και κυτταρικών μεταβολών που συμβαίνουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα από την επίδραση της VRL όταν αυτή χορηγείται με μετρονομικό τρόπο. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν :

- Η επίδραση των VRL και DVRL στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC είτε σε σχήματα που προσομοιάζαν τη κλασική χημειοθεραπεία είτε σε μετρονομικό μοντέλο.
- Η φαρμακοκινητική των VRL και DVRL στα HUVECs.
- Η επίδραση των VRL και DVRL στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση.

- Οι αλλαγές στην έκφραση παραγόντων αγγειογένεσης, είτε σε επίπεδο γονιδίου είτε σε επίπεδο πρωτεΐνης, οι μηχανισμοί και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται σε αυτήν.
- Οι μεταβολές στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση και στην αγγειογένεση από τη συγχρόνηση της μετρονομικής VRL με τον ενεργοποιητή του PPAR $\gamma$  ροσιγλιταζόνη.

Όσον αφορά στη μεταφραστική έρευνα, η μελέτη αυτή έχει σκοπό να διερευνήσει τους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στη θεραπεία με μετρονομική βινορελμίνη και να αναδείξει προβλεπτικούς και προγνωστικούς δείκτες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη καθημερινή κλινική πρακτική.

Συνοπτικά, η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε σαν στόχο να συνεισφέρει βασικές πληροφορίες σχετικά με τις κυτταρικές και μοριακές μεταβολές που συμβαίνουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα από τη μετρονομική βινορελμίνη και να αναδείξει σημαντικούς παράγοντες που εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια και οι οποίοι θα μπορούσαν δυνητικά να αποτελέσουν θεραπευτικούς στόχους.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Μετρονομικό σχήμα χορήγησης VRL σε ασθενείς με ανθεκτικούς όγκους : κλινική μελέτη μεταφραστικής έρευνας καθορισμού δόσης.**

Σκοπός της παραπάνω κλινικής δοκιμής ήταν η διερεύνηση της βέλτιστης μετρονομικής δόσης της VRL όταν αυτή χορηγείται από του στόματος, ως μονοθεραπεία σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο πνεύμονα, μαστού και προστάτου. Στα πρωταρχικά τελικά σημεία ανήκαν ο χρόνος μέχρι την αποτυχία της θεραπείας (TTF) και το διάστημα ελεύθερο εξέλιξης νόσου (PFS). Επιπλέον, μελετήθηκε η τοξικότητα, η φαρμακοκινητική και τα επίπεδα βιοδεικτών αγγειογένεσης στο αίμα των ασθενών.

### **8.1) ΥΛΙΚΟ.**

Στη πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή φάσης Ib συμμετείχαν συνολικά 73 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, πνεύμονα και προστάτου από 6 κέντρα της Ελλάδος. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 30, 40 ή 50 mg VRL 3 φορές την εβδομάδα. Η θεραπεία μπορούσε να συνεχισθεί για 24 μήνες. Στις αιτίες διακοπής της θεραπείας ανήκαν η πρόοδος της νόσου, η ανεπιθύμητη τοξικότητα σοβαρού βαθμού και η προσωπική επιθυμία του ασθενούς. Οι ασθενείς παρακολουθούνταν κάθε 2 εβδομάδες για τους πρώτους 2 μήνες και έπειτα κάθε μήνα. Στις επισκέψεις αυτές, εκτός από τη κλινική εκτίμηση, πραγματοποιήθηκε και συλλογή βιολογικού υλικού για τη φαρμακοκινητική και την ανάλυση των βιοδεικτών κατόπιν συγκατάθεσης των ασθενών.

Συγκεκριμένα, ολικό αίμα και πλάσμα από όλους τους ασθενείς που συμμετείχαν στην δοκιμή, συλλέχθηκαν στα χρονικά σημεία: πριν τη θεραπεία, κάθε 2 εβδομάδες για τους 2 πρώτους μήνες και μετά κάθε μήνα και αποθηκεύτηκε στους -80°C προκειμένου να αναλυθούν δείκτες αγγειογένεσης σε επίπεδο γονιδίου και πρωτεΐνης. Συνολικά αναλύθηκαν 86 δείγματα, από τα οποία 17 δείγματα ανήκαν στην ομάδα

προ θεραπείας, 10 δείγματα αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου (control) και πάρθηκαν από υγιείς εθελοντές, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα προήλθαν από 14 ασθενείς και αντιστοιχούσαν στα χρονικά σημεία εβδομάδα 0 μέχρι εβδομάδα 8.

## **8.2) ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.**

Τα επίπεδα των FGF-2, VEGF, IL-8 και TSP-1 στο πλάσμα καθορίστηκαν με ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική μέθοδο (Enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA). Αρχικά ολικό αίμα συλλέχθηκε από τους ασθενείς στα προκαθορισμένα χρονικά σημεία. Έπειτα φυγοκεντρήθηκε στις 3000 rpm για 15 λεπτά. Με πιπέτα αναρροφήθηκε το υπερκείμενο, το οποίο στη συνέχεια αποθηκεύτηκε άμεσα στους -80°C.

Χρησιμοποιήθηκαν Quantikine kits (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) για τη μέτρηση του FGF-2, VEGF, VEGFR2 και της IL-8 ενώ το Chemikine Human TSP-1 EIA Kit για τη μέτρηση της TSP-1 (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA). Η πειραματική διαδικασία έγινε βάσει των οδηγιών της κατασκευαστικής εταιρίας.

Τα κατώτερα όρια ανίχνευσης για τον FGF-2, VEGF, VEGFR2, IL-8 και της TSP-1 ήταν αντίστοιχα 10, 31.2, 78.1, 31.2 και 9.8 pg/Ml. Οι οπτικές πυκνότητες μετρήθηκαν φωτομετρικά (DAS-A3, Roma, Italy) με φίλτρο στα 450nm (VEGF, VEGFR2, IL-8 ) και 490nm (FGF-2 και TSP-1). Όλες οι αναλύσεις έγιναν εις διπλούν.

## **8.3) ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.**

Η συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα των βιοδεικτών στην έναρξη της θεραπείας με την ανταπόκριση/δραστικότητα (ασθενείς χωρίς αντικειμενική ανταπόκριση και/η πρόοδος νόσου μέσα σε 4 μήνες vs ασθενείς με αντικειμενική ανταπόκριση ή PFS> 4μήνες VS υγιείς-ομάδα ελέγχου) πραγματοποιήθηκε με το Kruskal-Wallis τεστ. Οι συσχετισμοί

ανάμεσα στους βιοδείκτες έγιναν με το Pearson's correlation τεστ. Η στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε στο επίπεδο του 5%.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Μελέτη κυτταρικής και μοριακής δράσης της VRL και του ενεργού μεταβολίτη της DVRL σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, εφαρμόζοντας ένα μοντέλο προσομοίωσης της μετρονομικής θεραπείας.**

### **9.A) ΥΛΙΚΑ**

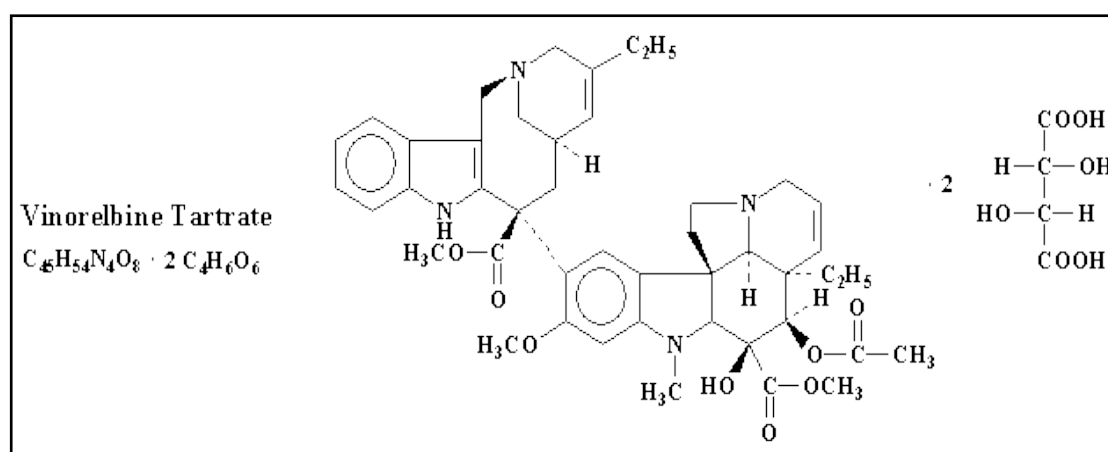
#### **9.A1) Κυτταρική σειρά.**

Τα κύτταρα HUVEC αποτελούν την πιο απλή και διαδεδομένη κυτταρική σειρά ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων που βρίσκεται στη διάθεση των ερευνητών για τη μελέτη της φυσιολογίας αλλά και των παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με το ενδοθήλιο όπως είναι η αθηροσκλήρωση, η φλεγμονή και η μετάσταση. Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα τους είναι ο μεγάλος αριθμός κυττάρων που μπορούν να δημιουργηθούν σε μια κυτταροκαλλιέργεια.

Η απομόνωση τους από την ομφαλική φλέβα γίνεται με μια απλή διαδικασία-πρωτόκολλο στο εργαστήριο χωρίς να απαιτούνται εξειδικευμένα υλικά σύμφωνα με τη τεχνική - μέθοδο του Jaffe (302). Η πρωτογενής καλλιέργεια είναι έτοιμη περίπου σε 8 ημέρες ενώ χρειάζεται αναμονή άλλων 2 ημερών για να γίνει η χορήγησή της ερευνητικής ουσίας. Η πρωτογενής καλλιέργεια προτιμάται σε σχέση με μεγαλύτερες γενιές κυττάρων καθώς όσο μεγαλώνουν οι γενιές φαίνεται ότι χάνεται η έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών από τα κύτταρα μέσω μηχανισμού γήρανσης ή απόπτωσης. Πολλά μορφολογικά και ανοσολογικά κριτήρια χρησιμοποιούνται στη καθημερινή πράξη για την ταυτοποίηση των HUVEC αλλά και χρήσιμοι δείκτες ανοσοφθορισμού όπως CD143, vWF, CD31, CD34, CD54, CD 106, E-selectin, VCAM και άλλοι πολλοί (303).

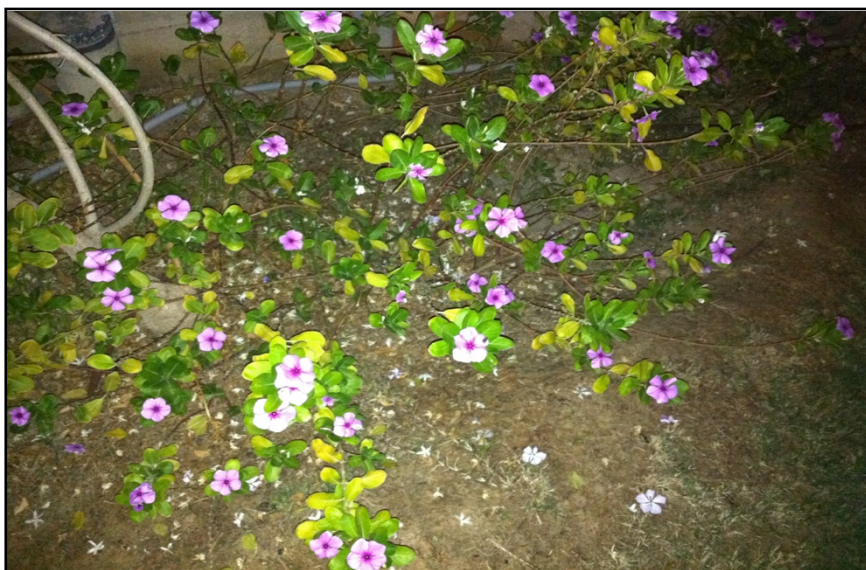
### 9.A2) Φαρμακευτική ουσία.

Η βινορελμπίνη (VRL) είναι αντινεοπλασματικός κυτταροστατικός παράγοντας που ανήκει στην οικογένεια των αλκαλοειδών της vinca. Η VRL, ημισυνθετικό παράγωγο, αναστέλλει τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης και παρεμποδίζει τη μίτωση στη φάση G2-M, προκαλώντας το θάνατο του κυττάρου στη μετάφαση ή κατά τη διάρκεια της επόμενης μίτωσης. Προέρχεται από τα φύλλα του φυτού *Catharanthus roseus* (**εικόνα 24**). Το φυτό αυτό, με παλαιότερη ονομασία *Vinca rosea*, ήταν γνωστό για τις υποτιθέμενες υπογλυκαιμικές του ιδιότητες, ωστόσο η φαρμακολογική έρευνα αποκάλυψε το 1959 ότι κάποια από τα συστατικά του εμφανίζουν έντονη κυτταροτοξική δράση (304). Χορηγείται παρεντερικά αλλά και από του στόματος. Υψηλές συγκεντρώσεις των φαρμάκων επιτυγχάνονται αμέσως μετά την ενδοφλέβια χορήγησή τους, αλλά μειώνονται γρήγορα εξαιτίας της σύνδεσης με την τουμπουλίνη. Η απομάκρυνση από το πλάσμα είναι τριφασική με μεγάλο τελικό χρόνο ημίσειας ζωής (18-49 ώρες) (305). Η VRL δεσμεύεται στις πρωτεΐνες του ορού και στα αιμοπετάλια. Είναι λιπόφιλο μόριο και εμφανίζει υψηλή συγκέντρωση στους διάφορους ιστούς εκτός από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Μεταβολίζεται στο ήπαρ μέσω ισοενζύμου CYP3A του συστήματος P450. Απεκκρίνεται κυρίως με τη χολή, ενώ από τους νεφρούς απομακρύνεται το 16-25%.



**Εικόνα 23:** Χημική δομή της VRL.

Για τη παρούσα εργασία, η φαρμακευτική εταιρία Pierre Fabre μας προσέφερε καθαρό άλας VRL (vinorelbine, VRL) αλλά και άλας ενεργού μεταβολίτη 4-O-deacetylvinorebine, DVRL). Στην έναρξη κάθε πειραματικής διαδικασίας χορήγησης φαρμάκου δημιουργούσαμε φρέσκα διαλύματα αρχικής συγκέντρωσης VRL/ DVRL 1mM με θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια με αραίωση τις επιθυμητές συγκεντρώσεις των φαρμάκων.



**Εικόνα 24:** Το φυτό vinca rosea από όπου προέρχεται η VRL.

## 9.B) ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### 9.B1) Απομόνωση και καλλιέργεια των HUVEC.

Ανθρώπινα Ενδοθηλιακά κύτταρα -HUVEC απομονώθηκαν από τη ομφαλική φλέβα νεογνών με την διαδικασία της κολλαγενάσης και καλλιεργήθηκαν στις κατάλληλες συνθήκες σύμφωνα με το πρωτόκολλο Jaffe et al. (302). Η συλλογή των ομφάλιων λώρων πραγματοποιήθηκε στη γυναικολογική-μαιευτική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κατόπιν συγκατάθεσης.

Η διαδικασία απομόνωσης HUVEC σύμφωνα με το ερευνητικό πρωτόκολλο του Jaffe et al είναι η εξής:

- Γεμίζουμε αποστειρωμένα βάζα με PBS και τα τοποθετούμε σε υδατόλουτρο στους 37° C.
- Καθαρίζουμε και ξεπλένουμε το φρέσκο ομφάλιο λώρο με PBS πάνω σε καθαρή υάλινη επιφάνεια μέσα στο hood.
- Βρίσκουμε την ομφαλική φλέβα και φράσσουμε τα δυο στόμια της με 3way καθετήρες. Δένουμε με χειρουργικό νήμα.
- Ξεπλένουμε με PBS.
- Αφού κλείσω το ένα στόμιο του λώρου, με σύριγγα βάζω περίπου 20ml κολλαγεννάσης (μέχρι να φουσκώσει ο λώρος).
- Βάζουμε το λώρο μέσα στο βάζο που βρισκόταν στο υδατόλουτρο, σκεπάζουμε αεροστεγώς και επωάζουμε για 12 λεπτά σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37° C.
- Μόλις τελειώσει ο χρόνος της επώασης βγάζουμε το λώρο από το υδατόλουτρο. Στο ένα άκρο του τοποθετούμε μια κενή σύριγγα των 50ml ενώ στο άλλο άκρο προσαρμόζουμε μια σύριγγα με θρεπτικό υλικό-medium.

Ανοίγουμε τα 3way στην κατάλληλη γραμμή ροής και σιγά σιγά αδειάζουμε το περιεχόμενο της σύριγγας με το medium μέσα στο λώρο ενώ ταυτόχρονα αναρροφούμε το περιεχόμενο με τη κενή σύριγγα. Η διαδικασία αυτή γίνεται 3 φορές.

- Ξεπλένουμε με αέρα η PBS.
- Αδειάζουμε το περιεχόμενο σε αποστειρωμένο farcon των 50ml.
- Φυγοκεντρούμε στις 1200rpm για 6 λεπτά στους 22° C.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο ενώ στο pellet των κυττάρων ρίχνουμε 10ml medium και αναδεύουμε προσεκτικά.
- Επιστρώνουμε το διάλυμα με τα κύτταρα σε τρυβλίο επιστρωμένο με κολλαγόνο.

Τα κύτταρα που απομονώνονται με τη παραπάνω διαδικασία καλλιεργούνται σε τρυβλία Petri με κατάλληλο θρεπτικό υλικό (M199) που περιέχει 20% FBS, 30μg/ml συμπληρώματα ανάπτυξης ενδοθηλιακών κυττάρων (ECGS), ηπαρίνη (10 μονάδες/ml), L-γλουταμίνη και στρεπτομυκίνη-πενικιλίνη, σε περιβάλλον 37°C, 5% CO<sub>2</sub> και 95% υγρασίας. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται μεταξύ δεύτερης και έβδομης γενιάς.

Σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο, τα κύτταρα εκτίθενται στα υπό μελέτη φάρμακα σε διάρκεια 4, 24 ή 96 ωρών. Το χρονικό σημείο των 4 ωρών έκθεσης σε φάρμακο που ακολουθείται από 92 ώρες παραμονή των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό, όπως επίσης και το χρονικό σημείο των 24 ωρών θεωρούμε ότι αντιστοιχεί στην κλασική μορφή χημειοθεραπείας όπου χρησιμοποιούμε την Μέγιστη Ανεκτή Δόση χημειοθεραπευτικού για σύντομο διάστημα. Αντίθετα, το χρονικό διάστημα των 96 ωρών με ανά 24 ώρες προσθήκη νέου διαλύματος φαρμάκου στα κύτταρα προσομοιάζει με την μετρονομική χημειοθεραπεία. Η ομάδα ελέγχου αποτελείται από κύτταρα τα οποία επωάζονται μόνο με θρεπτικό υλικό, καθόλη τη διάρκεια του εκάστοτε πειραματικού πρωτοκόλλου. Μετά το πέρας του εκάστοτε χρονικού διαστήματος έκθεσης των κυττάρων, τα κύτταρα από κάθε ομάδα συγκεντρώνονται και ξεκινά η διαδικασία της απομόνωσης γενετικού υλικού-RNA και πρωτεϊνών με

την χρήση του Nucleospin kit (Macherey-Nagel, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Επίσης, συγκεντρώνεται το θρεπτικό υλικό (medium supernatant) το οποίο φυγοκεντρείται στις 1500rpm/min και καταψύχεται στους -80°C για περαιτέρω ανάλυση.

### **9.B2) Πρωτόκολλο Απομόνωσης RNA από κύτταρα HUVEC.**

Για να καθορίσουμε τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των δεικτών αγγειογένεσης TSP-1, CD36, CD47, VEGF, VEGFR2, IL-8, FGF-2, PPAR $\gamma$  και COX-2 με τη μέθοδο της PCR, αρχικά απομονώσαμε γενετικό υλικό- RNA από τα κύτταρα. Για τη συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin RNA/Protein KIT (Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις παρακάτω οδηγίες:

Τα κύτταρα καλλιεργούνται με τις συνθήκες που προαναφέρθηκαν. Ανάλογα με το ερευνητικό πρωτόκολλο, τους χορηγήθηκε βινορελμπίνη/μεταβολίτης σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις και για ορισμένο χρονικό διάστημα. Στο τέλος του χρονικού διαστήματος, συλλέγονται τα κύτταρα με την εξής διαδικασία:

- Στο hood, αναρροφούμε το θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο.
- Ξεπλένουμε 2 φορές με PBS και αναρροφούμε ξανά.
- Προσθέτουμε 2ml θρυψίνης και περιμένουμε για 2-3 λεπτά μέχρι να ξεκολλήσουν τα κύτταρα.
- Προσθέτουμε 8ml medium και αναρροφούμε όλη τη ποσότητα από το τρυβλίο και τη τοποθετούμε σε αποστειρωμένο farcon.
- Φυγοκεντρούμε στις 1500rpm για 6min στους 22° C.
- Αναρροφούμε το υπερκείμενο.
- Στο ίζημα από τα κύτταρα, προσθέτουμε 350μl buffer RP1(έτοιμο δ/μα του Kit) και αναδεύουμε με τη πιπέττα για να σπάσει το ίζημα.

- Προσθέτουμε 3,5μl β-μερκαπτοαιθανόλης και αναδεύουμε στο Vortex. Βάζουμε ένα Nucleospin filter unit (μωβ) μέσα σε ένα collecting tube. Προσθέτουμε το δείγμα μας σε αυτόν ακριβώς πάνω στη στήλη.
- Φυγοκεντρούμε για 1min στις 11.000g σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαιρούμε τη μωβ στήλη και στο δείγμα προσθέτουμε 350μl αιθανόλης (70%). Αναδεύουμε με τη πιπέττα 5 φορές.
- Σε ένα 2ml collective tube τοποθετούμε ένα Nucleospin RNA/PROTEIN column (μπλε). Φορτώνουμε το δείγμα στο κέντρο της στήλης.
- Φυγοκεντρούμε για 30sec στις 11.000g σε θερμοκρασία δωματίου. Το υγρό που συλλέγεται στο collective tube αποτελεί το υπόστρωμα για την απομόνωση των πρωτεϊνών. Το αποθηκεύουμε προσωρινά στους 4-8° C, για να το επεξεργαστούμε στη συνέχεια.
- Το γενετικό υλικό των κυττάρων είναι προσδεδεμένο στη στήλη, την οποία τοποθετούμε σε νέο αποστειρωμένο collective tube.
- Στη στήλη προσθέτουμε 350μl MDB (Membrane Desalting Buffer) και φυγοκεντρούμε στις 11.000g για 1min, για να στεγνώσει η μεμβράνη. Απομακρύνουμε το ίζημα.
- Ετοιμάζουμε το rDNase reaction mixture σε αποστειρωμένο tube. Για κάθε δείγμα υπολογίζω 10μl rDNase I και 90μl Reaction Buffer for rDNase.
- Προσθέτουμε 95μl rDNase reaction mixture κατευθείαν στη μεμβράνη.
- Επωάζουμε για 15min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθέτουμε 200μl buffer RA2 (έτοιμο) στη στήλη. Φυγοκεντρούμε για 30sec στις 11.000g σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τοποθετούμε τη στήλη σε νέο tube. Προσθέτουμε 600μl buffer RA3 (έτοιμο) στη στήλη.
- Φυγοκεντρούμε για 30sec στις 11.000g σε θερμοκρασία δωματίου.

- Τοποθετούμε τη στήλη στο tube. Προσθέτουμε 250μl buffer RA3 (έτοιμο) στη στήλη.
- Φυγοκεντρούμε για 2min στις 11.000g σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τοποθετούμε τη στήλη σε αποστειρωμένο nuclease-free 1,5ml microcentrifuge tube.
- Προσθέτουμε 50μl H<sub>2</sub>O RNase-free και φυγοκεντρούμε για 1min στις 11.000g σε θερμοκρασία δωματίου. Το υγρό που προκύπτει είναι το RNA.
- Αποθηκεύουμε στους -70° C.

### **9.B3) Πρωτόκολλο Απομόνωσης πρωτεϊνών από κύτταρα HUVEC.**

Για να μπορέσουμε να καθορίσουμε τα επίπεδα των πρωτεϊνών στα κύτταρα HUVEC αλλά και το πώς αυτά επηρεάζονται από τη μετρονομική βινορελμπίνη ήταν απαραίτητο να γίνει απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών από τα κύτταρα. Ακολουθούμε τις οδηγίες του NucleoSpin RNA/Protein KIT (Macherey-Nagel) όπως ακριβώς περιγράφησαν παραπάνω μέχρι το σημείο όπου έχουμε απομονώσει διάλυμα στο οποίο περιέχονται οι ολικές πρωτεΐνες και το οποίο χρειάζεται επιπλέον επεξεργασία:

- Τοποθετούμε περίπου 700μl από το υγρό που απομονώθηκε προηγουμένως σε ένα microcentrifuge tube.
- Προσθέτουμε ίση ποσότητα διαλύματος PP(Protein Precipitator) και αναδεύουμε στο vortex. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15 min.
- Φυγοκεντρούμε για 5min στις 11.000g σε θερμοκρασία δωματίου.

- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο με τη πιπέττα προσεκτικά και προσθέτουμε 500μl 50% αιθανόλης στο ίζημα. Ανακατεύουμε.
- Φυγοκεντρούμε για 1min στις 11.000g σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο με τη πιπέττα προσεκτικά.
- Αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει για 2 ώρες.
- Προσθέτουμε 100μl PLB-TCEP (Protein Loading Buffer containing agent). Επωάζουμε για 5min στους 95-98° C.
- Αφήνουμε το δείγμα να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκεντρούμε για 1min στις 11.000g σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο-ολικές πρωτεΐνες τοποθετούνται σε ένα tube και αποθηκεύονται στους -20° C.

#### **9.B4) Πρωτόκολλο Απομόνωσης κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών από κύτταρα HUVEC.**

Η απομόνωση των κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών από τα HUVEC έγινε σύμφωνα με τη τεχνική του Sfikas (306). Τα κύτταρα καλλιεργούνται με τις κατάλληλες συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω, τους χορηγούνται συγκεκριμένες συγκεντρώσεις VRL για ορισμένο χρονικό διάστημα και στο τέλος του χρονικού διαστήματος, συλλέγονται με την εξής διαδικασία:

- Στο hood, αναρροφούμε το θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο.
- Ξεπλένουμε 1 φορά με PBS και αναρροφούμε ξανά.
- Με scraper σηκώνουμε τα κύτταρα και τα συλλέγουμε σε 1ml κρύο PBS.
- Φυγοκεντρούμε για 5min στις 1500rpm στους 22° C.

- Επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 1,5ml κρύο υποτονικό διάλυμα [10mM HEPES-KOH (pH 7.9), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM KCl].
- Φυγοκεντρούμε για 5min στις 1500rpm στους 22° C.
- Αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 100μl υποτονικού διαλύματος το οποίο περιέχει και 0.1% NP-40.
- Επωάζουμε το διάλυμα για 10 min μέσα σε πάγο.
- Αναδεύουμε σε vortex για 20sec.
- Φυγοκεντρούμε για 10min στις 13000rpm στους 4° C.
- Το υπερκείμενο δ/μα που προκύπτει αποτελεί τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και αποθηκεύεται στους -70° C.
- Επαναιωρούμε τα κύτταρα-pellet σε 1ml κρύο υποτονικό διάλυμα [10mM HEPES-KOH (pH 7.9), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM KCl].
- Φυγοκεντρούμε για 10min στις 13000rpm στους 4° C.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το pellet σε 50μl κρυο high salt extraction buffer[20mM HEPES-KOH (pH 7.9), 25%glycerol, 450mM KCl, 1mM EDTA, 1Mm PMSF, 1mM Na<sub>3</sub>V0<sub>4</sub>, 1mM DTT, 1μg/ml Pepstatin and 1μg/ml Leupeptin).
- Επωάζουμε στον πάγο για 30min. (κάθε 5min αναδεύουμε το δείγμα στο Vortex).
- Φυγοκεντρούμε για 30min στις 13000rpm στους 4° C.
- Το υπερκείμενο δ/μα που προκύπτει αποτελεί τις πυρηνικές πρωτεΐνες και αποθηκεύεται στους -70° C για περαιτέρω ανάλυση.

### 9.B5) Μελέτη Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού.

Για την διερεύνηση της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού τα ενδοθηλιακά κύτταρα καλλιεργούνται σε 96-well plates επιστρωμένα με κολλαγόνο. Τα κύτταρα στρώνονται σε συγκέντρωση 1000 κύτταρα/πηγάδι με τη παρακάτω διαδικασία.

#### Στρώσιμο κυττάρων σε 96-well plates:

- Σε ένα 96-well plate βάζουμε 40μl κολλαγόνου και επωάζουμε για 1 ώρα στο hood.
- Από ένα τρυβλίο petri με κύτταρα HUVEC αναρροφούμε το medium.
- Ξεπλένουμε 2 φορές με PBS και αναρροφούμε.
- Βάζουμε 2ml θρυψίνης και περιμένουμε 2-3 min τα κύτταρα να ξεκολλήσουν από το στρώμα.
- Ανασηκώνουμε τα κύτταρα με 8ml medium και τοποθετούμε το εναιώρημα σε ένα 15ml farcon αποστειρωμένο.
- Φυγοκεντρούμε στις 1500rpm για 6min στους 22° C.
- Αναρροφούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα με 10ml medium (ανάλογα με το πειραματικό πρωτόκολλο, μπορεί να χρειαστούν περισσότερα από 1 τρυβλίο petri. Σε αυτή τη περίπτωση, μπορούμε να δημιουργήσουμε εναιώρημα από όλα τα πιάτα σε συγκεκριμένη ποσότητα medium).
- Σε πλάκα Neubauer και με τη βοήθεια του μικροσκοπίου μετράμε τον αριθμό των κυττάρων. Παίρνουμε 10μl από το εναιώρημα και το τοποθετούμε στη κατάλληλη θέση πάνω στη πλάκα, μετράμε τα κύτταρα ένα προς ένα και έπειτα κάνουμε τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων με βάση των τύπο:  $\chi \cdot 10^6 / 100$  κύτταρα/ml. Υπολογίζουμε στη πορεία το συνολικό αριθμό των κυττάρων που βρίσκεται στο εναιώρημα και στο τέλος βρίσκουμε την αραιώση που χρειάζεται να γίνει για να έχουμε 1000 κύτταρα σε κάθε πηγάδι.

- Με μια πολυκάναλη πιπέτα, στρώνουμε τα κύτταρα στο plate με το κολλαγόνο και επωάζουμε στις κατάλληλες συνθήκες.

Τα κύτταρα 24 ώρες αργότερα εκτείθονται σε διάφορες συγκεντρώσεις των υπό μελέτη φαρμάκων - βινορελμπίνη/ μεταβολίτης και επωάζονται στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> και υγρασία για τα χρονικά διαστήματα των 4, 24 & 96 ωρών. Για να διατηρήσουμε σταθερή τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο θρεπτικό υλικό για το πείραμα των 96 ωρών, γίνεται αλλαγή και προσθήκη φρέσκου διαλύματος κάθε 24 ώρες.

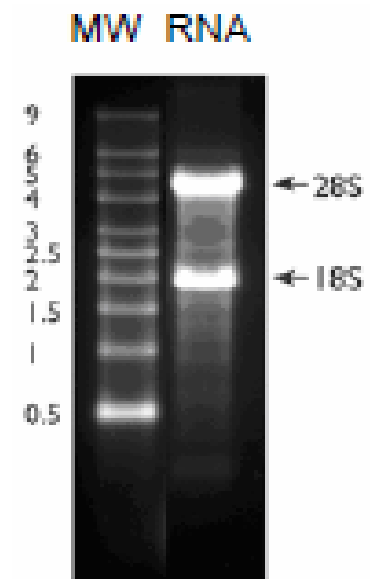
Ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων προσδιορίζεται με την δοκιμασία MTS (Cell Titter 96, Promega). Στο τέλος του χρονικού διαστήματος έκθεσης, 20μl του MTS διαλύματος προστίθεται σε κάθε πηγάδι και μετριέται η απορρόφηση με ELISA 2 ώρες αργότερα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό επί τις εκατό της ομάδας ελέγχου (control) και υπολογίζεται η μεσομέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC<sub>50</sub>).

#### **9.B6) Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης qRT-PCR.**

Για να καθορίσουμε τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των δεικτών αγγειογένεσης TSP-1, CD36, CD47, VEGF, VEGFR2, IL-8, FGF-2, PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  και COX-2 θα χρησιμοποιήσουμε την μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (qRT-PCR) σε μηχανήμα “Rotor-gene 3000” real time cycler (Corbett Research, Australia), με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιεί Taqman Universal PCR master mix (Applied Biosystems) αλλά και το μηχανήμα CFX96 Real –Time System (C1000 Thermal Cycler, BIORAD, USA) με IQ Supermix (BIORAD, USA) και συγκεκριμένα μόρια εκκινητές.

### 9.B6.1) Έλεγχος της ποιότητας των δειγμάτων RNA.

Ακολούθησε έλεγχος της ποιότητας-ακεραιότητας του RNA με ηλεκτροφόρηση 10μl RNA και 5μl διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) σε 1.2% πηκτή (gel) αгарόζης και με μάρτυρα RNA (RNA ladder 0,5-10Kb, Invitrogen). Κατά την ηλεκτροφόρηση διακρίνονται όλα τα είδη RNA. Αν το RNA είναι καλής ποιότητας διακρίνονται έντονα οι ζώνες των 5S, 18S και 28S ριβοσωμικού RNA. Για να χρησιμοποιηθεί το RNA για περαιτέρω ανάλυση (qPCR) πρέπει να διακρίνονται τουλάχιστον οι ζώνες των 18 και 28S.



#### Ηλεκτροφόρηση RNA:

- Ανοίγουμε το speedvac και το αφήνουμε για 1 ώρα περίπου.
- Τοποθετούμε τα δείγματα RNA σε πάγο. Χρησιμοποιώ 10μl δείγματος τα οποία 'στεγνώνουν' στο speedvac.
- Ετοιμάζουμε τη πηκτή αгарόζης: σε κωνική φιάλη βάζουμε 10ml MOPS 10X, 84ml DEPC-H<sub>2</sub>O και 1,2gr αгарόζης. Θερμαίνω το δ/μα σε φούρνο μικροκυμάτων για 1,5 min αναδεύοντας προσεκτικά κάθε 30sec. Προσθέτουμε 6ml φορμαλδευδης. Αναδεύουμε. Προσθέτουμε 6μl Bromide Ethidium.
- Ετοιμάζουμε τη φόρμα ηλεκτροφόρησης. Προσθέτουμε προσεκτικά το δ/μα.
- Σε κάθε δείγμα προσθέτουμε 5μl DEPC-H<sub>2</sub>O και το αφήνουμε στο πάγο.
- Ετοιμάζουμε το denaturing buffer με την εξής αναλογία: 10μl formamide/δείγμα, 2μl MOPS 10X/δείγμα, 1,7μl formaldehyde/δείγμα.
- Επωάζουμε το δείγματα στους 65° C για 20 min και στη συνέχεια για 5min στο πάγο.

- Ετοιμάζουμε το running buffer (75ml MOPS 10X, 550ml DEPC-H<sub>2</sub>O, 125ml Formaldehyde).
- Σε κάθε δείγμα προσθέτουμε 4μl loading buffer (120μl Bromophenol Blue, 80μl DEPC-H<sub>2</sub>O, 10μl Ethidium Bromide).
- Όταν η πηκτή είναι έτοιμη, τοποθετείται στη συσκευή, ρίχνουμε το running buffer και φορτώνουμε τα δείγματα.
- Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 75 volt.

### **9.B6.2) Ποσοτικοποίηση των δειγμάτων RNA.**

Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων RNA και η εκτίμηση της καθαρότητας πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της φασματοφωτομέτρησης. Στο κάθε δείγμα (5μl RNA + 995μl T.E buffer pH:8.0) μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση-πυκνότητα (OD) σε μήκη κύματος 260nm (A<sub>260</sub>), 280nm (A<sub>280</sub>). Στα 260nm ελέγχεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε RNA και στα 280nm ελέγχεται η πιθανή πρόσμιξη πρωτεϊνών. Υψηλής καθαρότητας RNA, που είναι και το ζητούμενο, έχουμε όταν οι λόγοι OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> είναι >1,7. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων RNA υπολογίστηκαν από την οπτική πυκνότητα στα 260 nm, σύμφωνα με τον τύπο: 1OD=40 μg/ml ολικού (total) RNA.

### **9.B6.3) Σύνθεση cDNA.**

Στη συνέχεια, με αρχική ποσότητα 1μg ολικού RNA, έγινε η σύνθεση του συμπληρωματικού cDNA με τη μέθοδο PCR της Ανάστροφης Μεταγραφάσης (RT-PCR). Χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο M-MuLV Reverse Transcriptase, της εταιρείας Fermentas, με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- Για το κάθε δείγμα, απαιτείται παρασκευή, ενός μίγματος RT-PCR συνολικού όγκου 18μl, με την ανάμειξη των παρακάτω συστατικών (η όλη διαδικασία στον πάγο):

- ολικό RNA: x μl, ώστε να έχουμε 1 μg ολικού RNA
  - 10mM dNTPs: 2μl
  - 50mM dNTPs τυχαία εξαμερή (Random hexamers): 3μl
- Επώαση στους 70°C για 3 min (αποδιάταξη του RNA και σύνδεση των εκκινητών)
- Μεταφορά στον πάγο για 5min.
- Ετοιμάζουμε το μίγμα σύνθεσης cDNA, με την παρακάτω σύσταση:
- M-MuVL (20 U/μl): 1,5μl
  - RNase Inhibitor (40 U/μl): 0,5μl
- Προσθέτουμε 2μl από το παραπάνω δ/μα.
- Ήπια ανάδευση και επώαση στους 37°C για 60 min.
- Επώαση στους 70°C για 10min (τερματισμός της αντίδρασης σύνθεσης).
- Μεταφορά στον πάγο για 5min.
- Φύλαξη στους -80°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

Χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές για TSP-1, CD36, CD47 VEGF, VEGFR2, IL-8, FGF-2, PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  και COX-2 (primers/probe sets).

| γονίδιο       | κωδικός       |
|---------------|---------------|
| TSP-1         | Hs00170236_m1 |
| VEGF          | Hs00900054_m1 |
| VEGFR2        | Hs00176676_m1 |
| CD36          | Hs00354519_m1 |
| CD47          | Hs00179953_m1 |
| IL-8          | Hs00174103_m1 |
| FGF-2         | Hs00266645_m1 |
| PPAR $\gamma$ | Hs01115513_m1 |
| COX-2         | Hs01573471_m1 |

**Πίνακας 2:** primer/probes που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο PCR. (Taqman Gene Expression Assays, Applied Biosystems, USA).

Για το κάθε δείγμα παρασκευάστηκε ένα μίγμα PCR τελικού όγκου 15μl σύμφωνα με την αναλογία:

- 7,5μl Taqman Universal PCR Master Mix(1x)
- 0,75μl primer/Taqman probe set
- 1,75μl nuclease-free water
- 5μl cDNA

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στο qRT-PCR περιλάμβανε τα ακόλουθα στάδια: 50°C για 2min και 95 °C για 10min για την ενεργοποίηση του AmpliTaq, και τέλος έπειτα 40 κύκλοι με 15sec αποδιάταξη στους 95 °C, 15sec αναδιάταξη στους 60 °C, 1min επέκταση στους 60 °C και τήξη.

Όλες οι PCR αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η απόδοση (efficiency) της PCR αντίδρασης για το κάθε γονίδιο υπολογίστηκε με την χρήση πρότυπης καμπύλης, κάνοντας διαδοχικές αραιώσεις της τάξεως του 10 (10-fold serial dilutions). Ο κύκλος-κατώφλι (threshold cycle, Ct ή Cq) προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος του μηχανήματος. Το γονίδιο της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση πιθανών διαφορών στην ποσότητα ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε στο κάθε δείγμα.

### **9.B7) Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική μέτρηση (Enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA).**

Η ELISA, είναι μια τεχνική που χρησιμοποιεί την αντίδραση ενός ενζύμου με ένα άχρωμο υπόστρωμα με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός έγχρωμου προϊόντος, που συνδέεται ομοιοπολικά με ένα ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει ένα αντιγόνο-στόχο. Αν υπάρχει αντιγόνο τότε το σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου θα δεσμευθεί σε αυτό και το ένζυμο θα καταλύσει την αντίδραση παράγοντας το χρωμοφόρο προϊόν. Η ELISA μπορεί να χρησιμοποιηθεί με πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα, όμως η χρήση των μονοκλωνικών παρέχει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Υπάρχουν διάφοροι τύποι της μεθόδου, με σημαντικότερους τον έμμεσο που επιτρέπει την ανίχνευση της ύπαρξης αντιγόνου και η διπλή (sandwich) ELISA που επιτρέπει την ανίχνευση αλλά και τη ποσοτικοποίηση του αντιγόνου. Στη δεύτερη τεχνική,

αντισώματα για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο προσκολλώνται στο πυθμένα του πλακιδίου. Στη συνέχεια, το αντιγόνο (δείγμα) προστίθεται στο πλακίδιο και το αντιγόνο δεσμεύεται στο αντίσωμα. Τελικά, ένα δεύτερο, διαφορετικό αντίσωμα για το ίδιο αντιγόνο προστίθεται στο πλακίδιο. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με ένζυμο που καταλύει την αντίδραση και παράγεται χρωμοφόρο προϊόν. Η αντίδραση που πραγματοποιείται δίνει αποτελέσματα ανάλογα της ποσότητας του αντιγόνου.

Συγκεκριμένα, το θρεπτικό υλικό που συγκεντρώνεται από τις καλλιέργειες των HUVEC ύστερα από 96 ώρες έκθεση στα υπό μελέτη φάρμακα, φυγοκεντρήθηκε στις 1500 rpm/min και στο υπερκείμενο με ELISA μετρήθηκαν τα επίπεδα των πρωτεϊνών TSP-1, VEGF, VEGFR2 και IL-8 χρησιμοποιώντας συγκεκριμένες οδηγίες από την κατασκευάστρια εταιρία (R&D Systems).

### **9.B8) Κυτταρομετρία Ροής.**

Για την διερεύνηση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης τα ενδοθηλιακά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία επιστρωμένα με κολλαγόνο, σε διάφορες συγκεντρώσεις VRL στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> και υγρασία για τα χρονικά διαστήματα των 4, 24 & 96 ωρών. Η μελέτη της απόπτωσης έγινε χρησιμοποιώντας τις χρωστικές propidium iodine και annexin σύμφωνα με τις οδηγίες κατασκευάστριας εταιρίας ενώ για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου χρησιμοποιήθηκε η χρωστική CyStain-DAPI.

#### **9.B8.1) Απόπτωση.**

Από τα τρυβλία με τα κύτταρα που είχαν εκτεθεί στο υπό μελέτη φάρμακο, δημιούργησα εναιώρημα ενδοθηλιακών κυττάρων σε PBS, το οποίο φυγοκεντρήθηκε στις 1500 rpm για 6min στους 22° C. Η τεχνική που ακολούθησε είναι η εξής: Από το

σωληνάριο αφαιρούμε το υπερκείμενο προσεκτικά και στο ίζημα προσθέτουμε 400μl binding buffer έτσι ώστε να δημιουργήσουμε το δ/μα που θα χρησιμοποιήσουμε για τη μελέτη της απόπτωσης:

- Στο ειδικό tube του κυτταρομέτρου, τοποθετούμε 96μl από το εναιώρημα κυττάρων. Τοποθετούμε στον πάγο.
- Προσθέτουμε 2,5μl propidium iodine και 1μl annexin. Η διαδικασία γίνεται στο πάγο. Επωάζουμε για 10min στο σκοτάδι.
- Στο τέλος του χρόνου, προσθέτουμε 250μl binding buffer.
- Λίγο πριν τη μέτρηση, προσθέτουμε 750μl PBS. Μετρούμε τα κύτταρα στο συγκεκριμένο template του οργάνου.

### **9.B8.2) Κυτταρικός κύκλος.**

Από τα τρυβλία με τα κύτταρα που είχαν εκτεθεί στο υπό μελέτη φάρμακο, δημιούργησα εναιώρημα ενδοθηλιακών κυττάρων σε PBS, το οποίο φυγοκεντρήθηκε στις 1500 rpm για 6min στους 22° C. Η τεχνική που ακολούθησε είναι η εξής: Από το σωληνάριο αφαιρούμε το υπερκείμενο προσεκτικά και στο ίζημα προσθέτουμε 1ml παγωμένη αιθανόλη (Et-OH) 70% σιγά σιγά ενώ ταυτόχρονα στο δ/μα γίνεται ανάδευση στο vortex.

- Στη συνέχεια, το εναιώρημα φυλάσσεται στους 4° C για τουλάχιστον 12 ώρες.
- Έπειτα, φυγοκεντρούμε στις 1500rpm για 5min στους 22° C.
- Αναρροφούμε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, ρίχνουμε 1ml PBS.
- Φυγοκεντρούμε στις 1500rpm για 5min στους 22° C.
- Αναρροφούμε το υπερκείμενο. Στο pellet προσθέτουμε 2ml DAPI.
- Επωάζουμε για 5min στο σκοτάδι και μετράμε στο κυτταρόμετρο.

## **9.B9) Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western Blotting.**

### **9.B9.1) Προετοιμασία δειγμάτων –ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών.**

Η ποσότητα της περιεχόμενης συνολικής πρωτεΐνης στα δείγματα προσδιορίστηκε φωτομετρικά, σύμφωνα με τις οδηγίες του kit απομόνωσης NucleoSpin RNA/Protein (Macherey-Nagel) και τη μέθοδο που περιέγραψε ο Karlsson (307). Συγκεκριμένα:

1. Ετοιμάστηκε δ/μα 40mg/ml BSA σε H<sub>2</sub>O και στη συνέχεια μια σειρά από συγκεντρώσεις για να δημιουργηθεί η πρότυπη καμπύλη.
2. Σε 96well plate τοποθετούμε 20μl από τα δείγματα με τις γνωστές συγκεντρώσεις BSA και 20μl από τα άγνωστα δείγματα.
3. Προσθέτουμε 40μl PLB-TCEP (125mM Bis-Tris, 10%SDS, 50mM TCEP, 20% glycerol, 0,02% bromophenol blue pH 6.8).
4. Έπειτα προσθέτουμε 40μl TCA 60% (Trichloroacetic acid, Sigma Aldrich). Αναδεύουμε ήπια μέχρι να αλλάξει το χρώμα του δ/τος.
5. Επωάζουμε για 30min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Μετράμε τα δείγματα στα 570nm.
7. Προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης κάθε δείγματος μετά από υπολογισμούς με βάση τη πρότυπη καμπύλη.

Για την επιλογή της βέλτιστης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης, που έπρεπε να φορτωθεί, έγινε πιλοτική ανάλυση διαφόρων ποσοτήτων πρωτεΐνης (linearization). Έτσι, 5μg-15μg πρωτεΐνης αναλύθηκαν πιλοτικά και η ποσότητα πρωτεΐνης, που έδωσε το καλύτερο σήμα επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση. Για την αραίωση των δειγμάτων πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα PLB-TCEP.

### **9.B9.2) Ηλεκτροφόρηση.**

Τα δείγματα φορτώθηκαν και διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση γέλης (SDS-PAGE) σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 7.5 - 10 % (ανάλογα με την πρωτεΐνη). Η

περιεκτικότητα της πηκτής σε ακρυλαμίδιο είναι ανάλογη με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που θέλω να ανιχνεύσω. Έτσι για πρωτεΐνες με μοριακό βάρος 12-60 kD χρησιμοποιήθηκε πηκτή 12%, για πρωτεΐνες 20-80 kD πηκτή 10%, και για πρωτεΐνες 80-150kD πηκτή 7,5%.

Το πήκτωμα (gel) αποτελούνταν από δύο μέρη:

α) **πήκτωμα διαχωρισμού** (separating gel), το οποίο έχει την εξής σύνθεση (ποσότητα για δύο gel):

- d.d. H<sub>2</sub>O
- Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)
- SDS 10 % w/v (Sigma-Aldrich)
- Acrylamide 30% (BioRad)
- APS 10% (Sigma-Aldrich)
- TEMED (Sigma)

Σε ένα Falcon, αναμειγνύω τα παραπάνω υλικά σε συγκεκριμένες ποσότητες που προκύπτουν από τον παρακάτω **πίνακα 3**:

| <b>οι όγκοι είναι σε mL</b> | <b>12,00%</b> | <b>10,00%</b> | <b>7,50%</b> |
|-----------------------------|---------------|---------------|--------------|
| H <sub>2</sub> O            | 4,9           | 5,9           | 7,15         |
| 30% acrylamide mix          | 6             | 5             | 3,75         |
| 1,5M Tris-HCl pH 8,8        | 3,8           | 3,8           | 3,8          |
| 10% SDS                     | 0,15          | 0,15          | 0,15         |
| 10% APS                     | 0,15          | 0,15          | 0,15         |
| TEMED                       | 0,006         | 0,006         | 0,009        |
| <b>TOTAL VOLUME</b>         | <b>15</b>     | <b>15</b>     | <b>15</b>    |

**Πίνακας 3:** αναλογία συστατικών για το separating gel.

β) **πήκτωμα επιστοιβαξης** (stacking gel), το οποίο έχει την εξής σύνθεση (ποσότητα για δύο gel):

- 3.4 ml d.d. H<sub>2</sub>O
- 630  $\mu$ l Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)
- 50  $\mu$ l SDS 10 % w/v
- 830  $\mu$ l Acrylamide 30%
- 50  $\mu$ l 10% APS
- 5  $\mu$ l TEMED

Πειραματική διαδικασία:

- Καθαρίζουμε καλά και συναρμολογούμε τη συσκευή με την οποία θα δημιουργήσουμε τα gel.
- Ετοιμάζουμε το διάλυμα 10%APS και το μεταφέρουμε στον πάγο. Βγάζουμε τα διαλύματα από το ψυγείο, πάνω στο πάγο και το SDS 10% από τον κλίβανο.
- Ετοιμάζουμε το seperating gel. Από τη στιγμή που θα προσθέσουμε το APS και το TEMED, οι κινήσεις μας είναι όσο το δυνατό πιο γρήγορες.
- Ανακινώ ήπια 2-3 φορές το Falcon. Με τη πιπέτα των 1000μL, προσθέτω με το tip στην άκρη από τα τζαμάκια το μείγμα, μέχρι το (κόκκινο) σημάδι που έχω βάλει.
- προσθέτω 0,1% SDS μέχρι να ξεχειλίζει ελάχιστα από τα τζαμάκια. Προσέχω να μην έχουν δημιουργηθεί φυσαλίδες ανάμεσα από τα τζαμάκια.
- Ετοιμάζουμε το stacking gel.
- Στο χρονικό διάστημα που απαιτείται να πήξουν τα gel, ετοιμάζουμε τα δείγματα που θα τρέξουν.
- Ετοιμάζω το electrophoresis buffer. Διαλύουμε 100mL 10x electrophoresis buffer ( 25 mM Tris-base, 250 mM Glycine, 0.1 % SDS) σε 900mL αποσταγμένο νερό, σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο των 1000mL. Κλείνουμε τον κύλινδρο με parafilm και ανακινούμε καλά 2-3 φορές.
- Ρίχνουμε το electrophoresis buffer 1x δεξαμενή.
- Φορτώνουμε τα δείγματά μας.

Η ηλεκτροφόρηση έγινε με συσκευή Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, California, USA) στα 60 Volt για περίπου 10 λεπτά, 120 Volt για περίπου 20 λεπτά και 200 Volt για περίπου 20 λεπτά μέσα σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

**9.B9.3) Μεταφορά των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών από τη πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.**

Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από την γέλη σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την ίδια συσκευή BioRad.

Πειραματική πορεία:

1. Παρασκευάζουμε το transfer buffer (25 mM Tris base, 192 mM Glycine, 20% methanol). Συγκεκριμένα, σε ογκομετρικό σωλήνα ρίχνουμε 3,03 gr Trizma, 14,4 gr glycine και 700ml d.H<sub>2</sub>O. Έπειτα προσθέτω 200ml μεθανόλης και συμπληρώνω με d.H<sub>2</sub>O μέχρι τα 1000ml.
2. Ετοιμάζουμε τις 2 μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Trans Protran nitrocellulose Transfer Membrane, πάχους 0.2  $\mu$ m, Schleischer & Schuell, Germany), 8 χαρτάκια Whatman, με διαστάσεις 5.5cm x 8.5cm.
3. Ετοιμάζω 5 πλαστικά δοχεία που το καθένα περιέχει:
  - Δοχείο 1 με transfer buffer: τοποθετούμε τα 4 λευκά σφουγγαράκια.
  - Δοχείο 2 με transfer buffer: τοποθετούμε τα 8 χαρτιά Whatman
  - Δοχείο 3 με αποσταγμένο νερό: τοποθετούμε τις 2 μεμβράνες για 1min
  - Δοχείο 4 με transfer buffer: τοποθετούμε τις μεμβράνες (μετά το πέρας του 1min στο νερό).
  - Δοχείο 5 με transfer buffer: τοποθετούμε τα 2 gel
4. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, αφαιρούμε τα gel από τη συσκευή με πολύ προσεκτικές κινήσεις.
5. Απομακρύνουμε το stacking gel.
6. Τοποθετούμε τα gel στο δοχείο με το transfer buffer. Από τη στιγμή που θα βάλουμε και τα 2 gel στα δοχεία με το transfer buffer, μετράμε 20min (soaking). Παρατηρούμε ότι μετά το soaking, η μπλε χρώση των δειγμάτων του gel στο κάτω μέρος εξαφανίστηκε.
7. Φτιάχνουμε το “sandwich” με την ακόλουθη σειρά: μαύρη πλάκα, σφουγγαράκι, 2 χαρτάκια Whatman, gel, μεμβράνη, 2 χαρτάκια Whatman, σφουγγαράκι, λευκή πλάκα. Κάθε φορά που προσθέτουμε κάτι, ρίχνουμε λίγη ποσότητα transfer buffer. Ρολάρουμε ένα δοκιμαστικό σωλήνα από πάνω

(εκτός από το gel και τη μεμβράνη) για να φύγουν οι όποιες φυσαλίδες μπορεί να δημιουργηθούν. Κλείνουμε με την λευκή ασφάλεια και τοποθετούμε τα sandwich στη κασέτα. Η μαύρη πλευρά του sandwich προς τη μαύρη πλευρά της κασέτας.

8. Τοποθετούμε τη κασέτα στη δεξαμενή. Στη δεξαμενή επίσης βάζω ένα μικρό μαγνητάκι και το δοχείο με τον πάγο (προς την πίσω πλευρά).
9. Γεμίζουμε τη δεξαμενή με transfer buffer, ενώ την έχουμε τοποθετήσει πάνω στο μαγνητικό αναδευτήρα. Εφαρμόζουμε ένταση 400mAmp για το κατάλληλο χρονικό διάστημα:

| <b>% σύσταση του gel</b> | <b>Χρόνος (σε min) ηλεκτροφόρησης με ένταση 400mAmp</b> |
|--------------------------|---------------------------------------------------------|
| 7,5                      | 210                                                     |
| 10                       | 180                                                     |
| 12                       | 180                                                     |

Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς φόρτωσης και μεταφοράς των πρωτεϊνών στις μεμβράνες, χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα Ponceau (Sigma, USA). Μετά το πέρας της μεταφοράς των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών από τη πηκτή πολυακρυλαμίδιου στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ακολουθούν δύο πλύσεις των 20 δευτερολέπτων με απιονισμένο νερό και μια πλύση με Ponceau για πέντε λεπτά (για να χρωματιστούν οι μπάντες). Συνεχίζουμε με τρεις πλύσεις των 30 δευτερολέπτων με απιονισμένο νερό για να φύγει η περιττή χρωστική. Στεγνώνουμε ήπια τις μεμβράνες σε διηθητικό χαρτί και σημειώνουμε τα δείγματα και το size marker.

#### **9.B9.4) Ανίχνευση πρωτεϊνών.**

Πριν την έναρξη της διαδικασίας ετοιμάζουμε τα εξής διαλύματα:

- α) Διάλυμα TBS (10mM Tris-HCl και 0.154M NaCl, pH 7.5)
- β) Διάλυμα TTBS (διάλυμα TBS, 0.25% Tween 20 [Sigma, USA]).

- Οι μεμβράνες επωάζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα (blocking solution), αποτελούμενο από διάλυμα TTBS και 5% άπαχο γάλα σε σκόνη, από 2 ώρες μέχρι όλη τη νύχτα (overnight) στους 4°C, προκειμένου να δεσμευτούν οι μη-ειδικές (κενές) θέσεις δέσμευσης του αντισώματος. Στο τέλος του χρόνου, οι μεμβράνες πλένονται τρεις φορές με διάλυμα TTBS επί 10 λεπτά.
- Ακολούθως, οι μεμβράνες επωάζονται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου - υπό συνεχή ανακίνηση - με τα μονοκλωνικά πρωτογενή αντισώματα (CD36, PPAR $\gamma$ , COX-2, NF- $\kappa$ B,  $\beta$ -actin) σε διάλυμα TTBS που περιείχε 5% άπαχο γάλα. Λεπτομέρειες για τον χρόνο επώασης, τις αραιώσεις και τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, παρατίθενται στον **(πίνακα 4)**.
- Εν συνεχεία, οι μεμβράνες πλένονται 3 φορές με TTBS, επί 10 λεπτά και ακολουθεί επώαση - υπό ανακίνηση - με το δευτερογενές αντίσωμα (ο χρόνος επώασης και η θερμοκρασία εξαρτάται από το κάθε αντίσωμα). Στο τέλος του χρόνου, οι μεμβράνες πλένονται 3 φορές με διάλυμα TTBS (5 λεπτά ανά πλύση).
- Έπειτα, μεταφερόμαστε στο σκοτεινό θάλαμο.
- Εκεί, οι μεμβράνες επωάζονται σε μείγμα 1:1 των reagents A και B του συστήματος χημειοφωταύγειας ECL (Amersham, GE Healthcare, UK). Γίνεται ανάμειξη 3ml reagent A και 3ml reagent B, και στη συνέχεια το μείγμα τοποθετήθηκε στην επιφάνεια της μεμβράνης για 2-5 λεπτά.
- Ακολούθως, οι μεμβράνες τοποθετούνται σε ειδική κασετίνα και στον σκοτεινό θάλαμο το φωτεινό σήμα αποτυπώθηκε σε φωτοευαίσθητο φιλμ (Fuji Film, Fuji Medical X-Ray Film, Japan). Ο χρόνος για την αποτύπωση στο φιλμ διαφέρει ανάλογα με το αντίσωμα προς εξέταση (από 1 μέχρι 30 λεπτά).
- Τέλος, το φιλμ εμβαπτίζεται πρώτα σε διάλυμα εμφάνισης (developer solution, Kodak, Japan) για 3.5 λεπτά και έπειτα σε διάλυμα σταθεροποίησης (fixer solution, Kodak) για 7 λεπτά.

| 1°<br>ΑΝΤΙΣΩΜΑ                 | ΚΩΔΙΚΟΣ                     | ΕΙΔΟΣ/ΠΗΓΗ            | ΧΡΟΝΟΣ<br>ΕΠΩΑΣΗΣ | ΑΡΑΙΩΣΗ        | 2° ΑΝΤΙΣΩΜΑ                     | ΑΡΑΙΩΣΗ | ΧΡΟΝΟΣ    |
|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------------|----------------|---------------------------------|---------|-----------|
| <b>CD36</b>                    | Sc7309                      | Mouse<br>μονοκλωνικό  | 12h<br>4°C        | 1:250<br>1:500 | Goat anti-mouse IgM<br>(sc2064) | 1:2000  | 2h<br>4°C |
| <b>PPAR<math>\gamma</math></b> | Sc7273                      | Mouse<br>μονοκλωνικό  | 12h<br>4°C        | 1:500          | Goat anti-mouse IgG<br>(sc2005) | 1:2000  | 2h<br>4°C |
| <b>COX-2</b>                   | 07-693                      | Goat<br>πολυκλωνικό   | 12h<br>4°C        | 1:400          | Donkey anti-goat IgG            | 1:2000  | 2h<br>4°C |
| <b>NF-kB</b>                   | Sc-372                      | Rabbit<br>πολυκλωνικό | 12h<br>4°C        | 1:500          | Goat anti-mouse IgG<br>(sc2005) | 1:2000  | 2h<br>4°C |
| <b>HIF 1a</b>                  | 610958                      | mouse                 | 12h<br>4°C        | 1:300<br>1:500 | Goat anti-mouse IgG<br>(sc2005) | 1:2000  | 2h<br>4°C |
| <b>ACTIN b</b>                 | SIGMA<br>CloneAC15<br>A5441 | Mouse<br>μονοκλωνικό  | 12h<br>4°C        | 1:10000        | Goat anti-mouse IgG<br>(sc2005) | 1:2000  | 2h<br>4°C |

**Πίνακας 4:** Χαρακτηριστικά των πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοαποτύπωση κατά *Western Blot*.

#### 9.B9.5) Stripping.

Μετά την αποτύπωση σε φιλμ, ακολουθεί stripping των μεμβρανών για 15 λεπτά μέσα σε υδατόλουτρο (θερμοκρασία 50°C), ώστε να καταστεί δυνατή η επώαση της ίδιας μεμβράνης σε πρωτογενές αντίσωμα ακτίνης. Το διάλυμα stripping είχε την εξής σύνθεση:

- 6.25 ml Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)
- 10 ml SDS 10% w/v (Sigma-Aldrich)
- 537μl 2- μερκαπτοαιθανόλη (Sigma-Aldrich)
- d.d. H<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 50ml

Η διάλυση της μερκαπτοαιθανόλης έγινε μέσα σε hood λόγω της τοξικότητας. Μετά το stripping, οι μεμβράνες πλένονται 3 φορές σε διάλυμα TTBS (10 λεπτά η κάθε μια). Ακολούθησε επώαση σε blocking solution overnight στους 4°C. Έπειτα 3 πλύσεις των 5 λεπτών και στη συνέχεια η επώαση των μεμβρανών σε πρωτογενές αντίσωμα ενός house-keeping αντισώματος ώστε να εκτιμηθεί η ποσότητα της πρωτεΐνης που φορτώθηκε.

#### **9.B9.6) Ποσοτικοποίηση.**

Επιλέγουμε τα φιλμ με το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Γίνεται σάρωση (scanning) με σαρωτή και το πρόγραμμα Precisionscan Programme 3.1 (Hewlett Packard). Τα αρχεία σώζονται σε ψηφιακή μορφή (.tiff). Γίνεται επεξεργασία τους στο πρόγραμμα Photoshop CS3 (Adobe Labs) για τον "καθαρισμό" του σήματος και ακολούθησε η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας κάθε ζώνης πρωτεΐνης με το πρόγραμμα Scion Image (Scion Corp.). Για την ομαλοποίηση (normalization) της ποσότητας πρωτεΐνης στα δείγματα που μετρήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν οι ποσότητες ακτίνης και η οπτική πυκνότητα της κάθε ζώνης πρωτεΐνης αξιολογήθηκε σε σχέση με την αντίστοιχη οπτική πυκνότητα της ζώνης της ακτίνης.

#### **9.B10) Ανοσοαποτύπωση πυρηνικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών κατά Western Blot.**

Πυρηνικές και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από κύτταρα HUVEC με τη μέθοδο που περιγράφηκε στη παράγραφο B4. Η ποσότητα της περιεχόμενης συνολικής πρωτεΐνης στα δείγματα προσδιορίστηκε φωτομετρικά, σύμφωνα με την

μέθοδο Brandford και τη βοήθεια του Bio-Rad Assay (BioRad Laboratories, Hercules, CA). Συγκεκριμένα:

- Σε tube επωάζουμε 5μl δείγματος, 795μl d.H<sub>2</sub>O και 200μl χρωστικής Bio-Rad Assay για 5 λεπτά (μέγιστο 1 ώρα).
- Έπειτα από αναλύσεις, επιλέχθηκε η ποσότητα των 10μg πρωτεΐνης. Η αραίωση των δειγμάτων πυρηνικής πρωτεΐνης έγινε με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (sample buffer), το οποίο είχε την εξής σύνθεση:
  - ❖ 4 ml d.d. H<sub>2</sub>O
  - ❖ 1 ml Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)
  - ❖ 800 μl Glycerol (Sigma-Aldrich)
  - ❖ 1.6 ml SDS 10 % w/v (Sigma-Aldrich)
  - ❖ 400 μl 2-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma-Aldrich)
  - ❖ 200 μl bromophenol blue 0.1 % (Sigma-Aldrich)
- Η πρωτεΐνη και το διάλυμα φόρτωσης αναμείχθηκαν και οι πρωτεΐνες αποδιατάχθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά σε heat block (Stuart block heater SBH130DC, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο για ~ 5 λεπτά και στην συνέχεια αφέθηκαν εκτός πάγου, έως ότου η θερμοκρασία προσεγγίσει εκείνη του περιβάλλοντος και στην συνέχεια φορτώθηκαν στη γέλη για ηλεκτροφόρηση με ίδιες συνθήκες όπως ακριβώς αναφέρθηκαν στις προηγούμενες παραγράφους.

### **9.B11) Φαρμακοκινητική ανάλυση.**

Για την φαρμακοκινητική ανάλυση, συλλέχθηκαν δείγματα θρεπτικού υλικού από καλλιέργειες κυττάρων HUVEC μετά από 24 και 96 ώρες έκθεσης σε VRL/DVRL. Για την ανάλυση των 96 ωρών, το θρεπτικό υλικό συλλεγόταν κάθε 24 ώρες και αποθηκευόταν στους -80° C. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν με ξηρό πάγο στο Ινστιτούτο Έρευνας Της Pierre Fabre στη Γαλλία όπου και αναλύθηκαν. Οι συγκεντρώσεις των VRL/DVRL προσδιορίστηκαν με την ευαίσθητη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας σύμφωνα με τις αρχές που περιέγραψαν οι Μπριασούλης και Παππάς ( Briasoulis, Pappas, Puosso et al, 2011).

### **9.B12) Δοκιμασία μετανάστευσης (Wound healing Assay).**

Για να καθορίσουμε τις αντιμεταναστευτικές ιδιότητες της μετρονομικής VRL, πραγματοποιήσαμε ένα ενδεικτικό test μετανάστευσης *in vitro*. Κύτταρα HUVEC καλλιιεργήθηκαν σε τρυβλία 6cm. Τους χορηγήθηκαν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις VRL και επώαστηκαν στους 37° C, 5% CO<sub>2</sub> για 96 ώρες, στο μετρονομικό μοντέλο (όπως περιεγράφηκε παραπάνω). Στο τέλος των 96 ωρών, σχεδιάστηκε προσεκτικά μια γραμμή στο τρυβλίο έτσι ώστε τα κύτταρα να αποκολληθούν. Το πλάτος της γραμμής ήταν περίπου 500μm. Μετά την αποκόλληση των κυττάρων, το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και στη συνέχεια χορηγήθηκε φρέσκο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας. Σε αυτό το σημείο, φωτογραφήσαμε τα κύτταρα σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, και το θεωρήσαμε το χρονικό σημείο 0 (0 ώρες). Έπειτα, τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν και σε 2 άλλα χρονικά σημεία, στις 8 και στις 24 ώρες και μετρήθηκε το πλάτος της γραμμής.

### **9.Γ) ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ποσοστά επι τις 100(%) της ομάδας ελέγχου σε σχέση με την ομάδα αναφοράς (control group). Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του Student's t-test. Στατιστικά σημαντικό θεωρείται το αποτέλεσμα με τιμή  $p < 0,05$ .

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: Συγχορήγηση Ροσιγλιταζόνης με μετρονομική VRL.**

### **10.1) ΥΛΙΚΑ**

#### **10.1A) Φαρμακευτική ουσία.**

Για τη μελέτη του συνδυασμού των δυο φαρμάκων χρησιμοποιήθηκε μηλεϊνική ροσιγλιταζόνη (RSG) που πρόσφερε η εταιρεία GlaxoSmithKline (SDS No 1219) αλλά και ροσιγλιταζόνη σε μορφή καλιούχου άλατος της εταιρείας CAYMAN (No 71742). Η ροσιγλιταζόνη κυκλοφορεί με το εμπορικό όνομα Avandia και αποτελεί νεότερο αντιδιαβητικό φάρμακο, που ανήκει στην κατηγορία των θειαζολιδινεδιονών. Ο κυριότερος μηχανισμός δράσης είναι η ευαισθητοποίηση των κυττάρων στην ινσουλίνη μέσω της σύνδεσής της με τους υποδοχείς PPAR στα λιποκύτταρα. Χρησιμοποιείται σε φαρμακοτεχνική μορφή χαπιού είτε μόνη είτε σε συνδυασμό με μετφορμίνη ή γλιμεπιρίδη.

Αρχικά, δημιουργήθηκε φρέσκο διάλυμα αρχικής συγκέντρωσης RSG 10mM με DMSO και στη συνέχεια, στην αρχή κάθε πειραματικής διαδικασίας δημιουργούνταν φρέσκα διαλύματα με θρεπτικό υλικό στις επιθυμητές συγκεντρώσεις του φαρμάκου.

#### **10.1B) κυτταρική σειρά.**

Ανθρώπινα Ενδοθηλιακά κύτταρα (Human umbilical vein endothelial cells-HUVEC) απομονώθηκαν από τη ομφαλική φλέβα ομφάλιου λώρου νεογνών με την διαδικασία της κολλαγενάσης και καλλιεργήθηκαν στις κατάλληλες συνθήκες σύμφωνα με το ερευνητικό πρωτόκολλο της μελέτης. Η συλλογή των ομφάλιων λώρων πραγματοποιήθηκε στη γυναικολογική-μαιευτική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κατόπιν συγκατάθεσης. Η Απομόνωση και η καλλιέργεια των κυττάρων HUVEC περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 9.B1.

## 10.2) ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

HUVEC απομονώθηκαν από φλέβα ομφάλιου λώρου και καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό που περιείχε τον συνδυασμό VRL και ροσιγλιταζόνης σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 1pM μέχρι 100μM για 96 ώρες με ανά 24ώρη αλλαγή και προσθήκη νέου διαλύματος (μετρονομικό μοντέλο), αλλά και τη ροσιγλιταζόνη μόνη της. Διερευνήθηκε η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (δοκιμασία MTS), υπολογίστηκε η μεσομέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC50) και προσδιορίστηκε η επίδραση του συνδυασμού στην έκφραση γονιδίων αγγειογένεσης σε μεταγραφικό επίπεδο (qRT-PCR) με τις διαδικασίες που περιγράφονται αναλυτικά στα προηγούμενα κεφάλαια (κεφάλαιο 9).

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

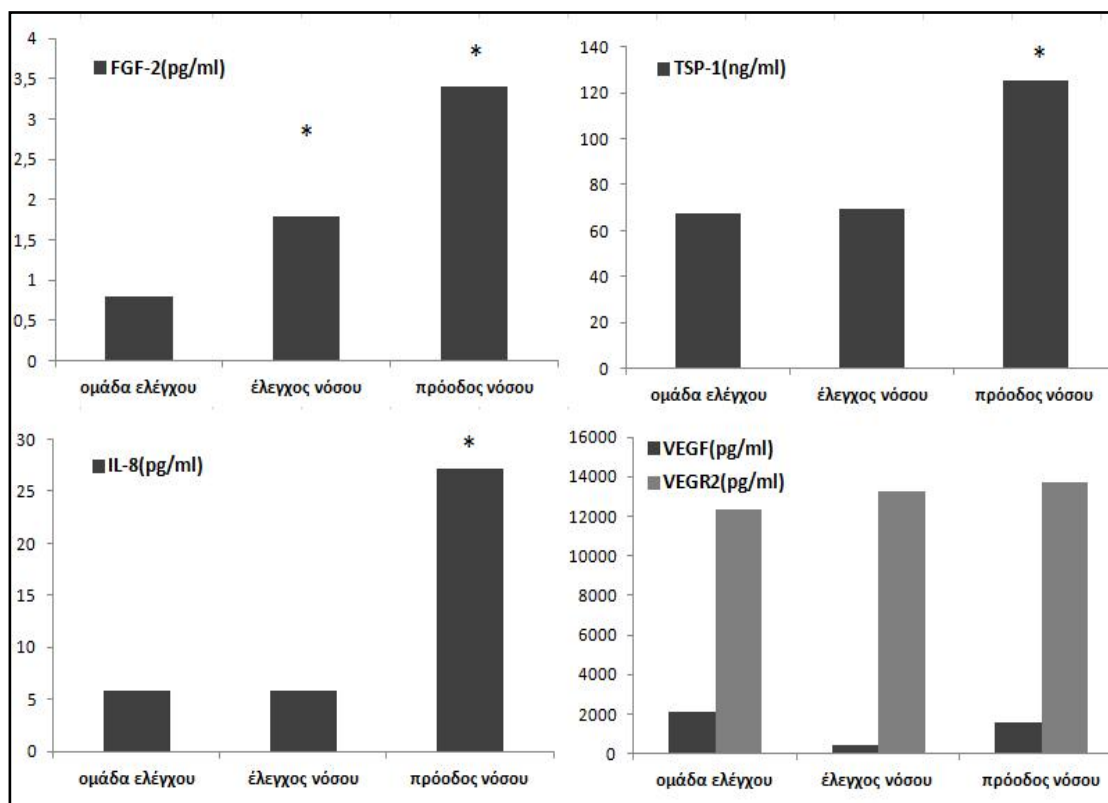
## **ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ.**

Στη κλινική δοκιμή MOVIN μελετήθηκαν στο πλάσμα, τα επίπεδα συγκεκριμένων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην αγγειογένεση, με τη μέθοδο της ELISA. Σε 12 ασθενείς μετρήθηκαν οι FGF-2, IL-8, TSP-1, VEGF και VEGFR2. Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν τα επίπεδα στο χρονικό σημείο 0, δηλαδή λίγο πριν ξεκινήσει η θεραπεία που θεωρούνται βασικά επίπεδα, ενώ αναλύθηκαν και άλλα χρονικά σημεία που αντιστοιχούσαν στις εβδομάδες 2, 6, 8 και 12. Τα επίπεδα αυτά συνολικά συγκρίθηκαν με τα επίπεδα από τους υγιείς δότες και στη συνέχεια έγινε ανάλυση με βάση τη πρόοδο της νόσου.

Από την ανάλυση των αγγειογενετικών πρωτεϊνών διαπιστώθηκε ότι τα βασικά επίπεδα όλων των υπό μελέτη πρωτεϊνών διέφεραν σημαντικά σε σχέση με αυτά της ομάδας control. Όμως καμία από αυτές τις μετρήσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντική καθώς υπήρχε μεγάλη διακύμανση. Αντίθετα, όταν έγινε ανάλυση των αποτελεσμάτων με βάση τις 2 ομάδες ασθενών, δηλαδή σε αυτούς που ανταποκρίθηκαν και σε αυτούς που παρουσίασαν πρόοδο νόσου, τα αποτελέσματα διαφοροποιήθηκαν. Όσον αφορά στον FGF-2 και στην IL-8, τα βασικά επίπεδα των ασθενών που ανταποκρίθηκαν στη χημειοθεραπεία ήταν παρόμοια ή πλησίαζαν αυτά των υγιών εθελοντών. Αντίθετα, τα επίπεδα των πρωτεϊνών αυτών που παρουσίασαν πρόοδο νόσου ήταν πολύ μεγαλύτερα. Επομένως, φαίνεται πως η IL-8 και ο FGF-2 αποτελούν δείκτες με προβλεπτική αξία στην ικανοποιητική απάντηση στη μετρονομική χημειοθεραπεία ( $p$  value=0.02 και 0.006 αντίστοιχα). Από την άλλη πλευρά, τα βασικά επίπεδα του VEGF και του VEGFR2, δεν διέφεραν ανάμεσα στους ασθενείς που είχαν καλή και κακή ανταπόκριση στη μετρονομική χημειοθεραπεία. Τέλος, όσον αφορά στη TSP-1 τα δεδομένα είναι ασαφή, με οριακή στατιστική σημαντικότητα και μεγάλη διακύμανση στις τιμές. **(πίνακας 5).**

|        |         | Ομάδα ελέγχου | Έλεγχος νόσου | Πρόοδος νόσου |
|--------|---------|---------------|---------------|---------------|
| FGF-2  | N       | 8             | 7             | 5             |
|        | Median  | 0.8           | 1.8           | 3.4           |
|        | Range   | ( 0.2-2.3)    | ( 0.4-14.8)   | ( 1.9-23.7)   |
|        | P-value | <b>0.020</b>  |               |               |
| IL-8   | N       | 8             | 7             | 5             |
|        | Median  | 5.8           | 5.8           | 27.2          |
|        | Range   | ( 1.1-7.5)    | ( 2.8-18.9)   | ( 12.2-61.9)  |
|        | P-value | <b>0.006</b>  |               |               |
| TSP-1  | N       | 8             | 7             | 5             |
|        | Median  | 67.3          | 69.6          | 125.1         |
|        | Range   | ( 9-710.1)    | (24-452)      | (85.1-328.4)  |
|        | P-value | <b>0.047</b>  |               |               |
| VEGF   | N       | 10            | 7             | 5             |
|        | Median  | 2094          | 428.6         | 1552          |
|        | Range   | ( 9.0-710.1)  | ( 24.0-452.3) | ( 85.1-328.4) |
|        | P-value | 0.074         |               |               |
| VEGFR2 | N       | 8             | 7             | 5             |
|        | Median  | 12328         | 13275         | 13680         |
|        | Range   | ( 8235-17615) | ( 7455-18065) | ( 8945-16465) |
|        | P-value | 0.657         |               |               |

**Πίνακας 5:** Οι αγγειογενετικές πρωτεΐνες ως προβλεπτικοί δείκτες ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία (292).



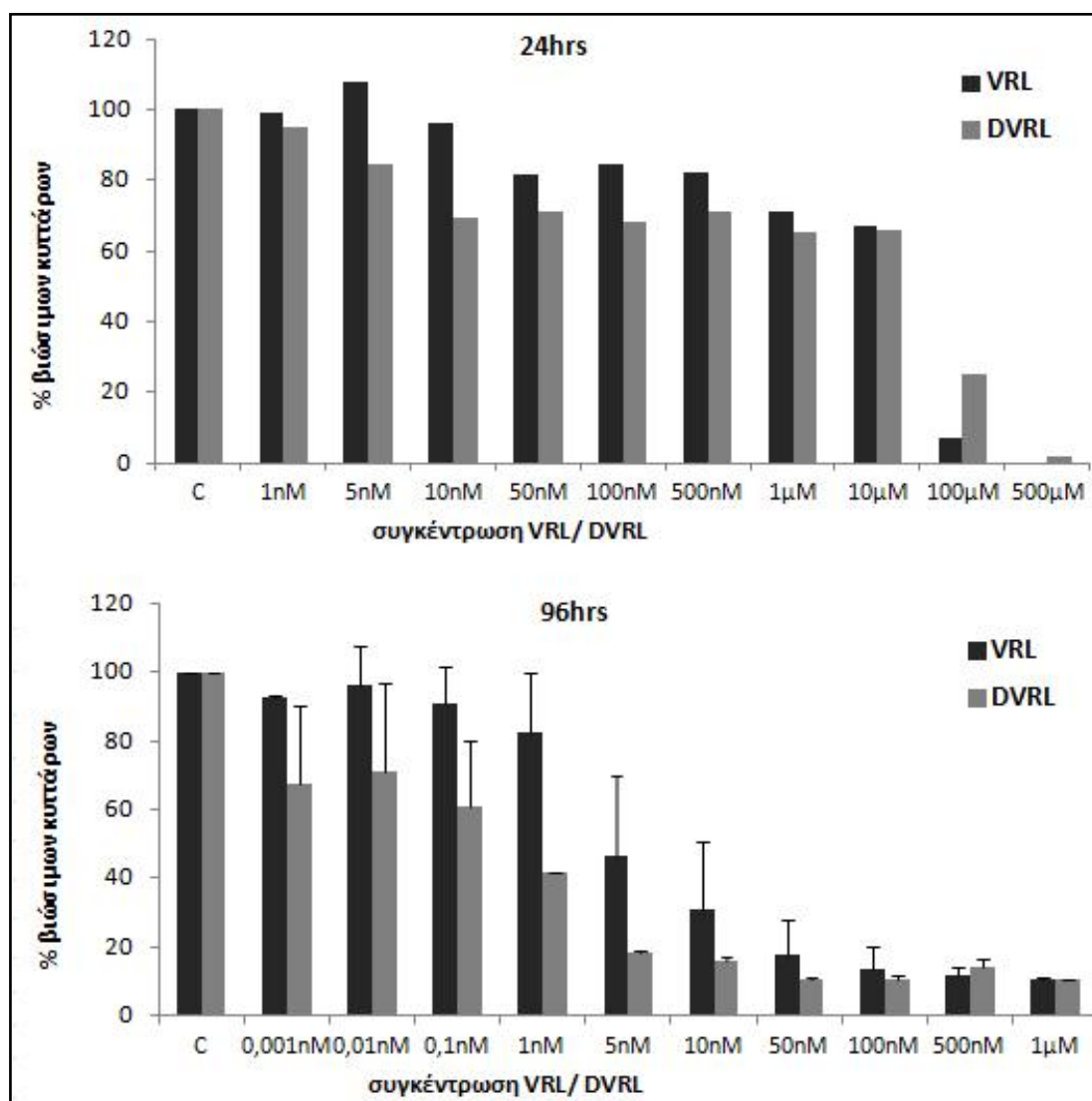
**Εικόνα 25:** Έκφραση αγγειογενετικών πρωτεϊνών σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους που έλαβαν μετρονομική VRL (MOVIN). Δείγματα ορού συγκεντρώθηκαν στο χρονικό σημείο μηδέν, δηλαδή πριν την έναρξη της θεραπείας. Η έκφραση των FGF-2, IL-8, TSP-1, VEGF/VEGFR2 αναλύθηκε με τη μέθοδο ELISA. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 3 ομάδες : ομάδα ελέγχου (υγιείς), ομάδα με πρόοδο νόσου, ομάδα με έλεγχο της νόσου και ανταπόκριση στη θεραπεία. Με αστερίσκο δηλώνονται τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ( $p$  value < 0,05) (292).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ In VITRO ΜΕΛΕΤΗΣ.

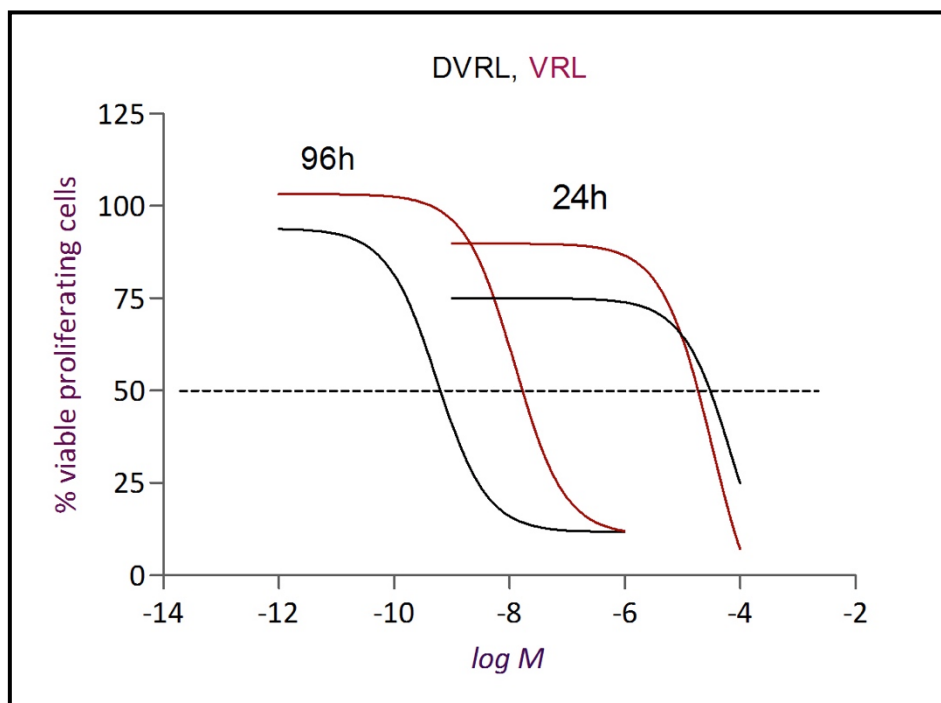
### 12.1) Επίδραση της VRL/DVRL στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν για 4, 24 και 96 ώρες με τις συνθήκες που προαναφέρθηκαν στην παράγραφο 9.B1 και χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 0,001nM μέχρι 1μM των δύο φαρμάκων. Ο βαθμός που η έκθεση των κυττάρων στο VRL ή το DVRL επηρέασε την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μελετήθηκε με την βοήθεια του τεστ κυτταροτοξικότητας MTS.

Για να ανασταλεί σημαντικά ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων HUVEC μετά από 24 ώρες έκθεσης στην VRL απαιτούνται συγκεντρώσεις φαρμάκου πάνω από  $10^{-5}$  M, ενώ αντίθετα συγκεντρώσεις  $10^{-9}$  M VRL είναι ικανές να αναστείλουν το πολλαπλασιασμό πάνω από 50% όταν χορηγούνται για 96 ώρες στα κύτταρα, σε παρατεταμένη χορήγηση (μετρονομικό μοντέλο) **(εικόνα 26)**. Ακόμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαρμάκου ( $>10\mu\text{M}$ ) χρειάζονται για την αναστολή του πολλαπλασιασμού στο χρονικό σημείο των 4 ωρών. Επιπλέον, η μεσομέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC50) για την VRL είναι τέσσερις τάξεις μεγέθους (λογαρίθμους) χαμηλότερη όταν τα HUVEC εκτίθενται στην VRL για 96 ώρες σε σύγκριση με τις 24 ώρες (1.23nM vs 32μM για την VRL και 0.55nM vs 78μM για τον μεταβολίτη) **(εικόνα 27)**. Τέλος, όσον αφορά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ο μεταβολίτης DVRL είναι πιο δραστικός σε σχέση με την VRL.



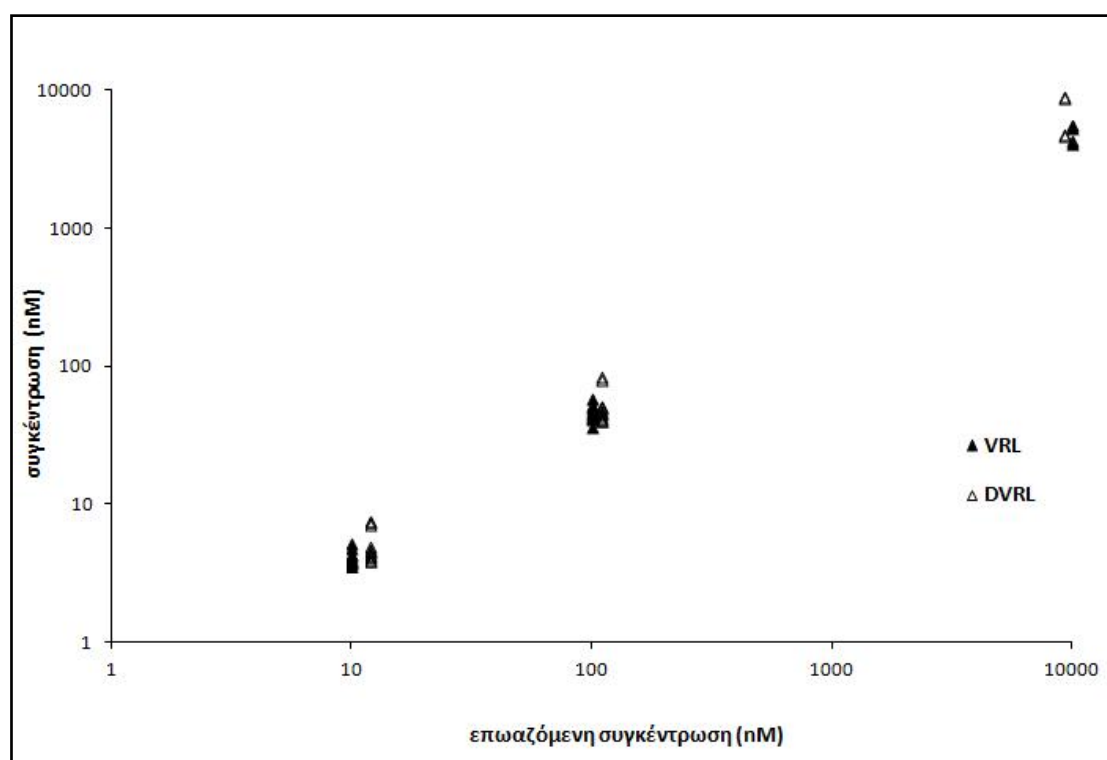
**Εικόνα 26:** Αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων από VRL/DVRL. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με τις ανάλογες συγκεντρώσεις VRL/DVRL για 24 και 96ωρες. Η βιωσιμότητα των κυττάρων ανιχνεύθηκε με τη βοήθεια του τεστ MTS.



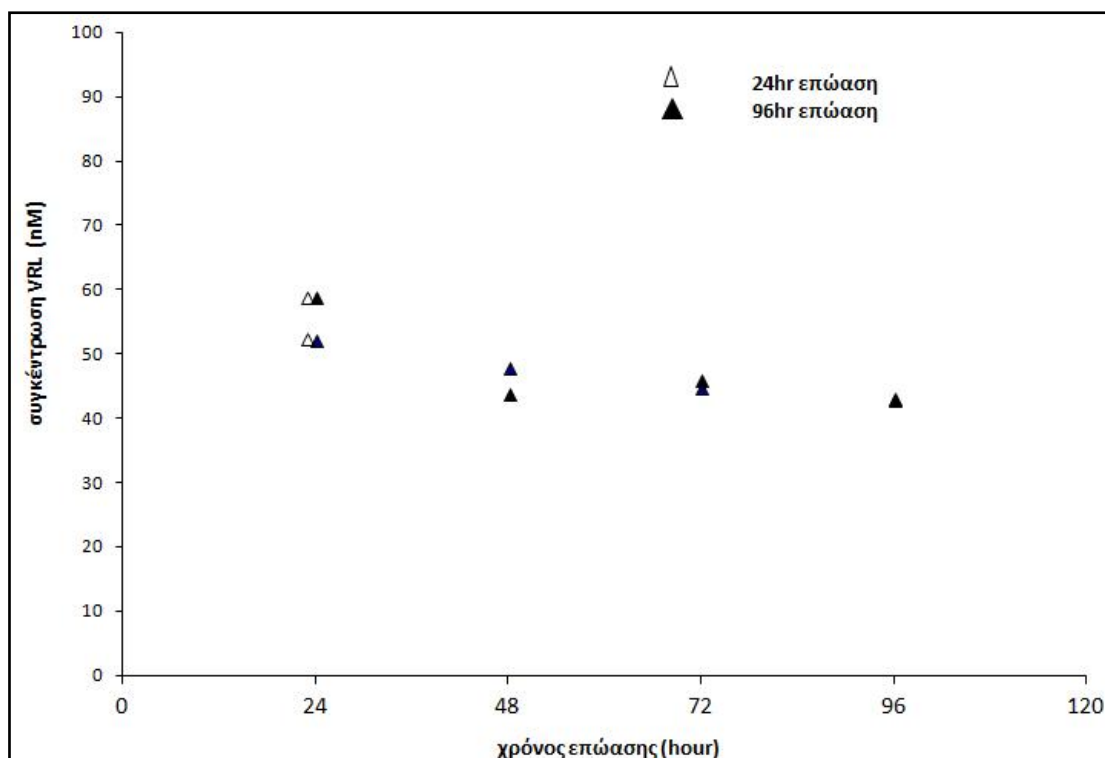
**Εικόνα 27:** Επίδραση των VRL/DVRL στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HUVEC μετά από 24 και 96ωρες έκθεσης (μετρονομικό μοντέλο). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επι τις % ποσοστό της ομάδας ελέγχου και της μεσομέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (IC50).

## 12.2) Φαρμακοκινητική ανάλυση.

Η φαρμακοκινητική ανάλυση ανέδειξε ότι το *in vitro* σύστημα του μετρονομικού μοντέλου χημειοθεραπείας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη χαρακτηρίζεται από δοσοεξαρτώμενη γραμμικότητα για τα επίπεδα της VRL ( $R^2 = 0.9814$ , **εικόνα 28**). Επιπλέον, η επαναλαμβανόμενη χορήγηση σταθερών συγκεντρώσεων VRL δεν οδήγησε σε συσσώρευση του φαρμάκου, καθώς τα επίπεδα της VRL στο θρεπτικό υλικό παρέμειναν σταθερά για όλο το χρονικό διάστημα των 96 ωρών. Για την φαρμακοκινητική μελέτη χρησιμοποιήθηκε σαν συγκέντρωση έκθεσης των κυττάρων σε VRL τα 100nM που οδήγησαν σε μια μέση συγκέντρωση VRL τα 50nM (**εικόνα 29**) στο τέλος του διαστήματος έκθεσης των κυττάρων (24 ή 96 ώρες).



**Εικόνα 28:** Συγκεντρώσεις VRL/DVRL στα HUVEC μετά από 96 ώρες επώασης. Τα δείγματα συγκεντρώθηκαν στο τέλος κάθε 24ώρου στα 10, 100 και 10000nM of VRL/DVRL. Δεδομένα από 12, 12 και 4 δείγματα από κάθε ομάδα αντίστοιχα.



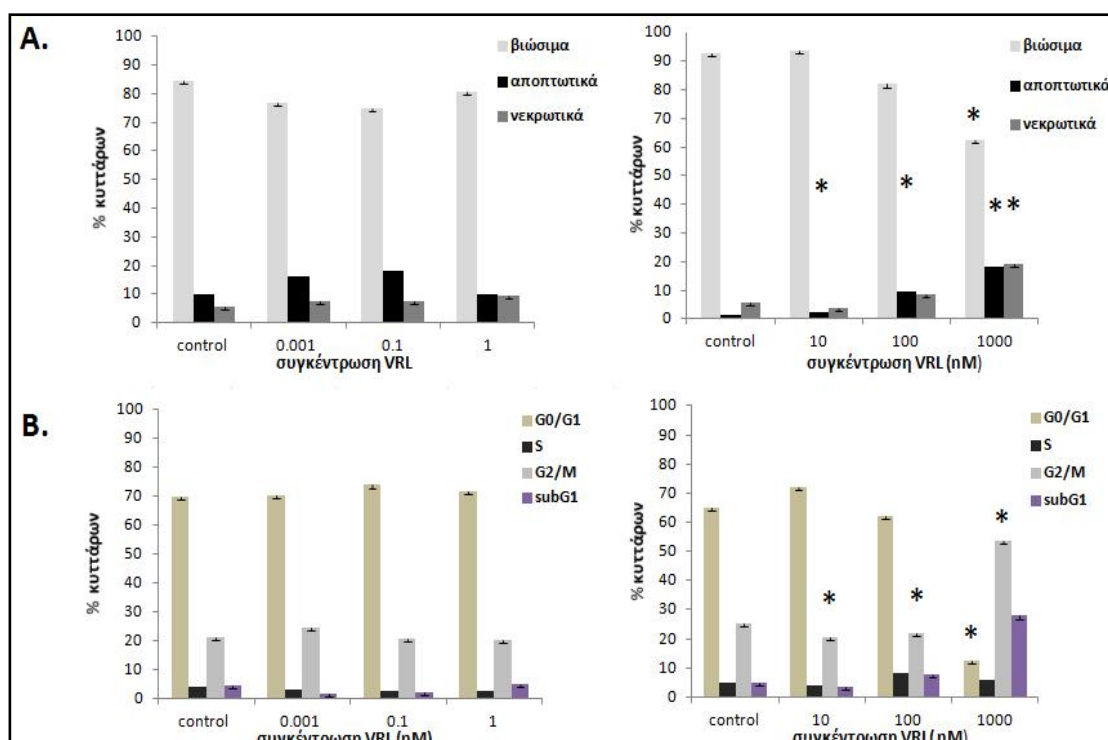
**Εικόνα 29:** Συγκεντρώσεις VRL μετά από επώαση 100nM της ουσίας στα HUVEC. 100nM VRL χορηγήθηκαν στα HUVEC για 24 ώρες καθώς και για 96 ώρες-μετρονομικό μοντέλο. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε στο τέλος κάθε 24ώρου.

Όσον αφορά στο DVRL, η φαρμακοκινητική ανάλυση ανέδειξε παρόμοια δοσοεξαρτώμενη γραμμικότητα ( $R^2=0.9025$ ). Επίσης, βρέθηκε ότι μετά από 24 ώρες, ο μεταβολίτης DVRL συντίθεται από τη VRL, χωρίς να συσσωρεύεται στο θρεπτικό υλικό. Συμπερασματικά, στο τέλος των 96 ωρών, στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των κυττάρων υπάρχουν σταθερές συγκεντρώσεις και των δύο φαρμάκων γεγονός που αποδεικνύει ότι το *in vitro* σύστημα των HUVEC που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη αποτελεί μια αξιόπιστη αποτύπωση του κλινικού μετρονομικού μοντέλου χορήγησης αντινεοπλασματικής θεραπείας.

### 12.3) Επίδραση της VRL στο κυτταρικό κύκλο και στην απόπτωση.

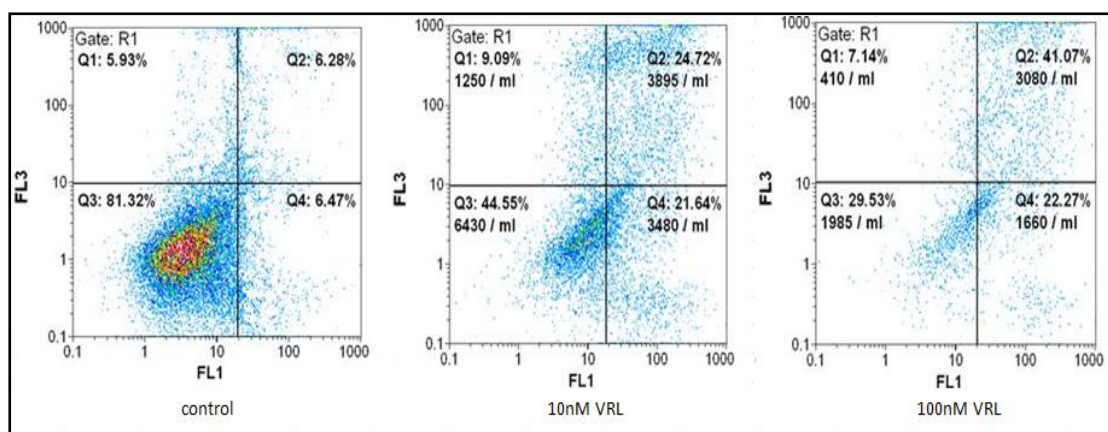
Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν με VRL σε δυο πειραματικά πρωτόκολλα. Το πρώτο αντιστοιχεί στη μετρονομική χημειοθεραπεία και περιλαμβάνει τη παρατεταμένη χορήγηση φαρμάκου για 96 ώρες με ανά 24ώρο αφαίρεση και προσθήκη νέου φαρμάκου σε συγκεντρώσεις από 0,001nM μέχρι 100nM. Το δεύτερο περιλαμβάνει τη χορήγηση VRL από 10nM μέχρι 1μM για 4 ώρες που ακολουθείται από χρονικό διάστημα έκπλυσης 92 ωρών με θρεπτικό υλικό (wash out period), που αντιστοιχεί στα κλασικά σχήματα χημειοθεραπείας.

Η μετρονομική χορήγηση της VRL δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και δεν προκάλεσε απόπτωση στα HUVEC (εικόνα 30).



**Εικόνα 30:** Επίδραση της VRL στον κυτταρικό κύκλο και στην απόπτωση. Κύτταρα HUVEC εκτέθηκαν σε VRL για 96 ώρες (0.001, 0.1 και 1nM, μετρονομικό μοντέλο) ή για 4 ώρες με 92 ώρες wash out (10-1000nM, κλασσική χημειοθεραπεία). Καταγράφονται ποσοστά βιώσιμων, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (A) ή κύτταρα στο κυτταρικό κύκλο (B) με το μετρονομικό μοντέλο (αριστερό διάγραμμα) και στο κλασικό χημειοθεραπευτικό σχήμα (δεξιό διάγραμμα). \*, Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $P < 0.05$ ).

Όμως, συγκεντρώσεις VRL πάνω από 10nM προκάλεσαν σημαντική απόπτωση στα HUVEC ( $p < 0.004$ ) (εικόνα 31). Επιπλέον, η μεγαλύτερη συγκέντρωση των 100nM VRL προκάλεσε συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G2/M στις 96 ώρες ( $p = 0.02$ ) (πίνακας 6). Αξίζει να σημειωθεί πως η δόση των 100nM VRL είναι αρκετά μεγάλη και δεν περιλαμβάνεται στις μετρονομικές συγκεντρώσεις.



**Εικόνα 31:** Αύξηση της απόπτωσης των HUVEC μετά από έκθεση σε 10nM και 100nM VRL για 96 ώρες.

Αντίθετα, η 4ώρη χορήγηση VRL οδήγησε τα κύτταρα σε πρόωρη και καθυστερημένη απόπτωση αλλά και νέκρωση, στη συγκέντρωση των 100nM. Επιπλέον, η συγκέντρωση των 1μM αύξησε σημαντικά το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονταν στη φάση sub-G1, μείωσε τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων και οδήγησε στη συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G2-M (εικόνα 30 δεξιά).

| VRL     | %G0/G1 |      | %Sphase |      | %G2/M |      | %subG1 |      |
|---------|--------|------|---------|------|-------|------|--------|------|
|         | 96hrs  | 4hrs | 96hrs   | 4hrs | 96hrs | 4hrs | 96hrs  | 4hrs |
| control | 69,86  | 65   | 4,34    | 5    | 21,6  | 25,2 | 4,62   | 4,8  |
| 0,1nM   | 73,74  | 69,7 | 2,59    | 4,4  | 20,85 | 20,9 | 2,42   | 4,9  |
| 1nM     | 71,62  | 73,5 | 2,85    | 3,4  | 20,47 | 19,3 | 5,09   | 4    |
| 10nM    | 74,44  | 72,1 | 3,1     | 4,1  | 14,35 | 20,5 | 7,76   | 3,4  |
| 100nM   | 16,9   | 62   | 10,9    | 8,2  | 52,1  | 21,8 | 19     | 7,9  |

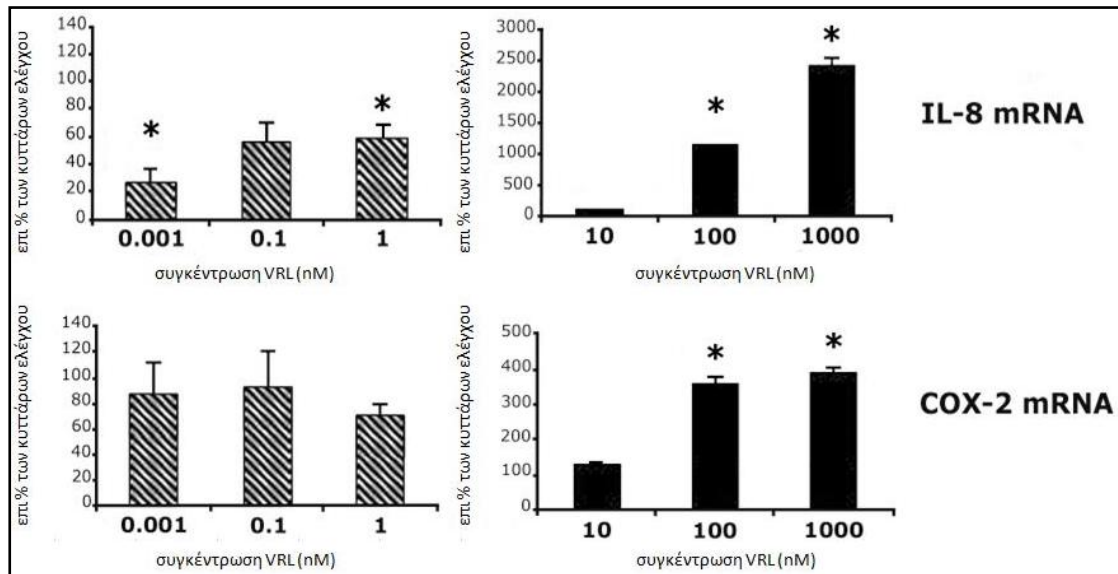
**Πίνακας 6:** Κατανομή των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μετά από 4 και 96 ώρες έκθεση σε VRL (με κόκκινο χρώμα σημειώνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές,  $p < 0.05$ ).

#### 12.4) Επίδραση της VRL στους μοριακούς δείκτες αγγειογένεσης σε επίπεδο μεταγραφής.

##### 12.4.1) Επίδραση της VRL στους προαγγειογενετικούς δείκτες.

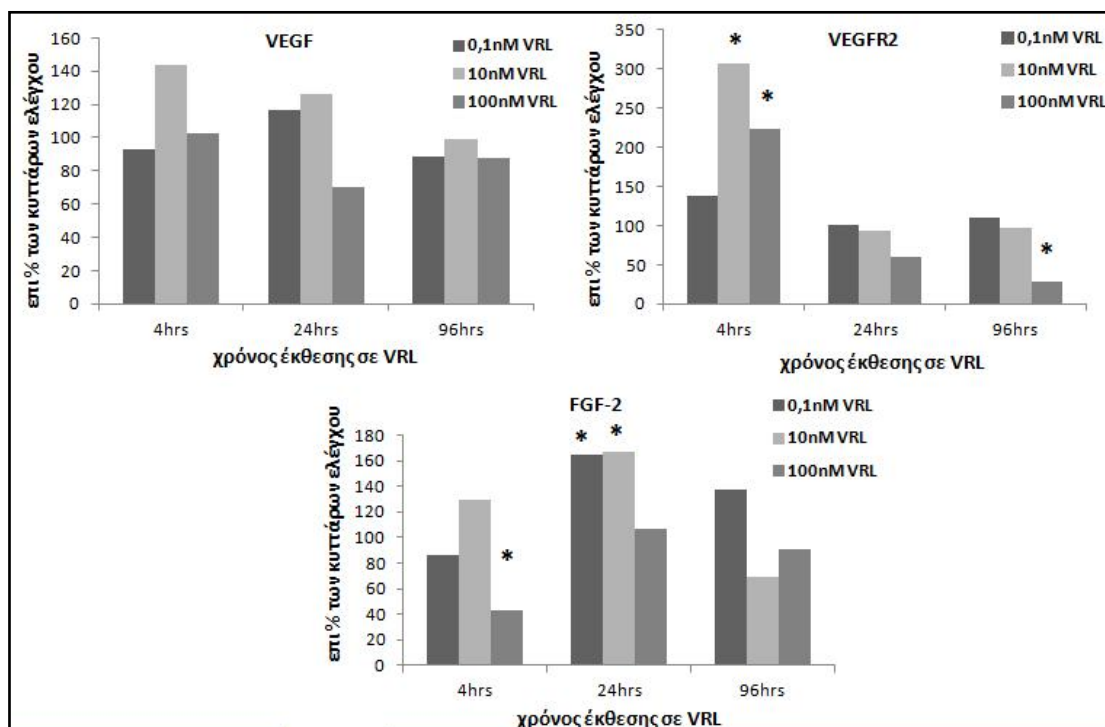
Μετά από καλλιέργεια των κυττάρων για 4, 24 και 96 ώρες με διάφορες συγκεντρώσεις VRL, όπως αναφέρεται στις παραπάνω παραγράφους, γενετικό υλικό μεταγραφών συγκεντρώθηκε και αναλύθηκε με τη μέθοδο RT-PCR, προκειμένου να διαπιστωθεί αν το φάρμακο μπορεί να επηρεάσει τους δείκτες αγγειογένεσης.

Οι ‘μετρονομικές’ συγκεντρώσεις της VRL προκάλεσαν δόσο-εξαρτώμενες μεταβολές στα προαγγειογενετικά μόρια της IL-8 και COX-2. Συγκεκριμένα, οι πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις των 0.001, 0.1 και 1nM VRL μετά από 96 ώρες κατέστειλαν τα επίπεδα της IL-8 σε στατιστικά σημαντικό ποσοστό ( $p < 0.05$ ), ενώ δεν επηρέασαν τα επίπεδα της COX-2 (εικόνα 32 - αριστερά). Αντίθετα, η έκθεση των κυττάρων σε συγκεντρώσεις VRL πάνω από 10nM για 4ώρες με 92ώρες wash out period (πρωτόκολλο που προσομοιάζει με αυτά της κλασικής χημειοθεραπείας) και για 24 ώρες προκάλεσε επαγωγή της έκφρασης της IL-8 και της COX-2 (εικόνα 32 - δεξιά).



**Εικόνα 32:** Έκφραση της IL-8 και της COX-2 μετά από έκθεση κυττάρων HUVEC σε VRL. Κύτταρα HUVEC επωάστηκαν για 96 ώρες (μετρονομικό μοντέλο) και 4 ώρες με 92 ώρες έκπλυσης (κλασσικό μοντέλο) με VRL. RNA συγκεντρώθηκε και γονίδια αγγειογένεσης μελετήθηκαν με τη μέθοδο qRT-PCR. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό επι τις εκατό της ομάδας ελέγχου (control).

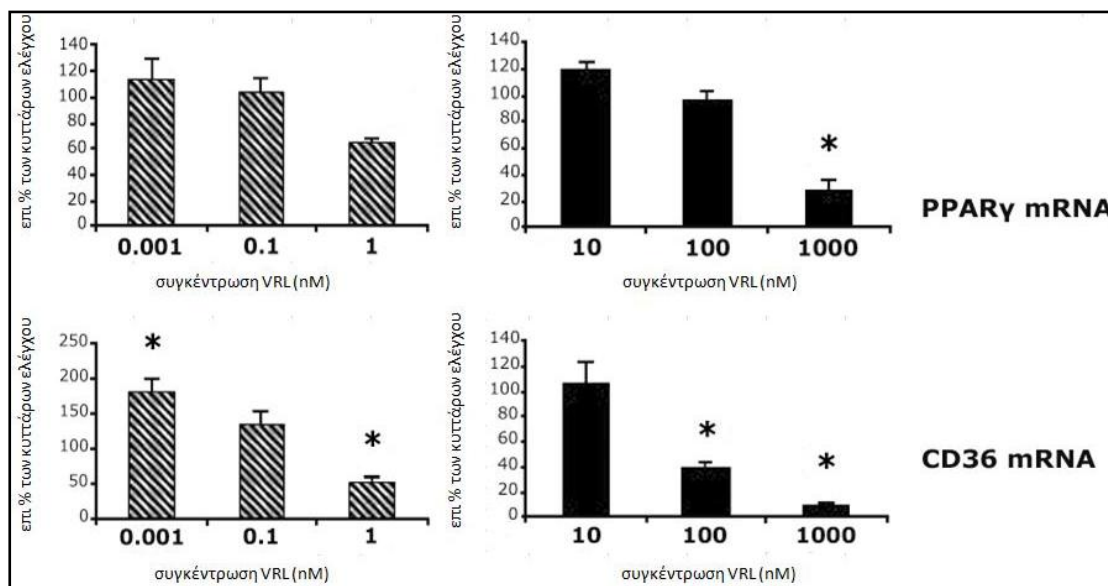
Όσον αφορά στον VEGF, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στα υπό μελέτη χρονικά διαστήματα. Αντίθετα, στις 4 και στις 24 ώρες παρατηρήθηκε αύξηση του VEGFR2 και του FGF-2 αντίστοιχα, σε σχέση πάντα με τις ομάδες ελέγχου (**εικόνα 33**). Τέλος, στο μετρονομικό μοντέλο των 96 ωρών και στις χαμηλές συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων.



**Εικόνα 33:** Δοσοεξαρτώμενες και χρόνοςεξαρτώμενες μεταβολές στην έκφραση προαγγειογενετικών παραγόντων σε κύτταρα HUVEC. Κύτταρα HUVEC επωάστηκαν για 4ώρες, 24 και 96ώρες (μετρονομικό μοντέλο) με VRL σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Ο VEGF, ο VEGFR2 και ο FGF-2 μελετήθηκαν με τη μέθοδο qRT-PCR. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό επί τις εκατό της ομάδας ελέγχου (control). Με αστερίσκο σημειώνονται τα αποτελέσματα με στατιστική σημαντικότητα  $p$  value < 0,05.

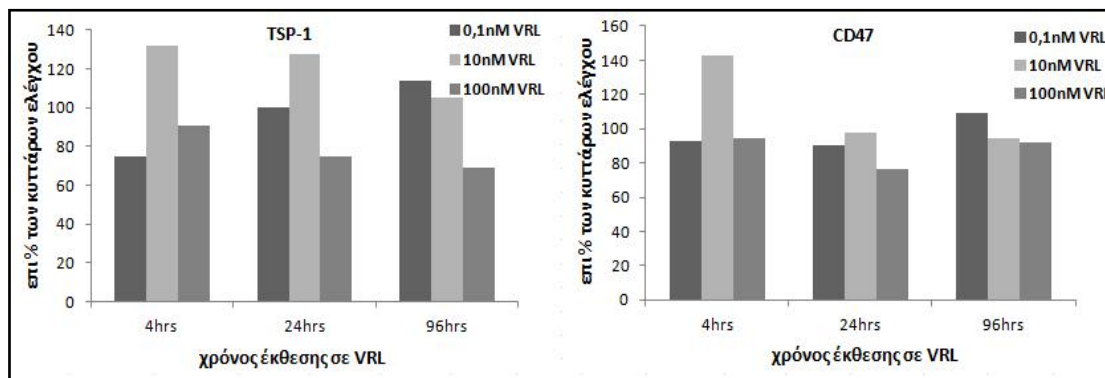
#### 12.4.2) Επίδραση της VRL στους αντιαγγειογενετικούς δείκτες.

Όσον αφορά στα αντιαγγειογενετικά μόρια PPAR $\gamma$  και CD36, οι χαμηλές συγκεντρώσεις της VRL (0,001 και 0,1nM) διατηρούν την έκφραση του PPAR $\gamma$  στα βασικά επίπεδα ενώ η χαμηλότερη συκέντρωση 0,001nM VRL αυξάνει το mRNA του CD36 ( $p < 0.05$ ) στο 'μετρονομικό' πρωτόκολλο των 96 ωρών (**εικόνα 34-αριστερά**). Αντίθετα, συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 10nM προκάλεσαν σημαντική μείωση στο mRNA τόσο του PPAR $\gamma$  ( $p < 0.005$  στα 1 $\mu$ M), όσο και του CD36 ( $p < 0.05$  στα 100nM) (**εικόνα 34-δεξιά**) τόσο στο μετρονομικό μοντέλο όσο και στο πρωτόκολλο της κλασικής χημειοθεραπείας.



**Εικόνα 34:** Έκφραση του PPAR $\gamma$  και του CD36 μετά από έκθεση κυττάρων HUVEC σε VRL. Κύτταρα HUVEC επωάστηκαν για 96 ώρες (μετρονομικό μοντέλο) και 4 ώρες με 92 ώρες έκπλυσης (κλασικό μοντέλο) με VRL. RNA συγκεντρώθηκε και γονίδια αγγειογένεσης μελετήθηκαν με τη μέθοδο qRT-PCR. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό επί τις εκατό της ομάδας ελέγχου (control).

Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν αξιόλογες μεταβολές στην έκφραση της TSP-1 και του υποδοχέα της CD47, που διατηρήθηκαν στα βασικά επίπεδα και στα 3 ερευνητικά σχήματα (εικόνα 35).



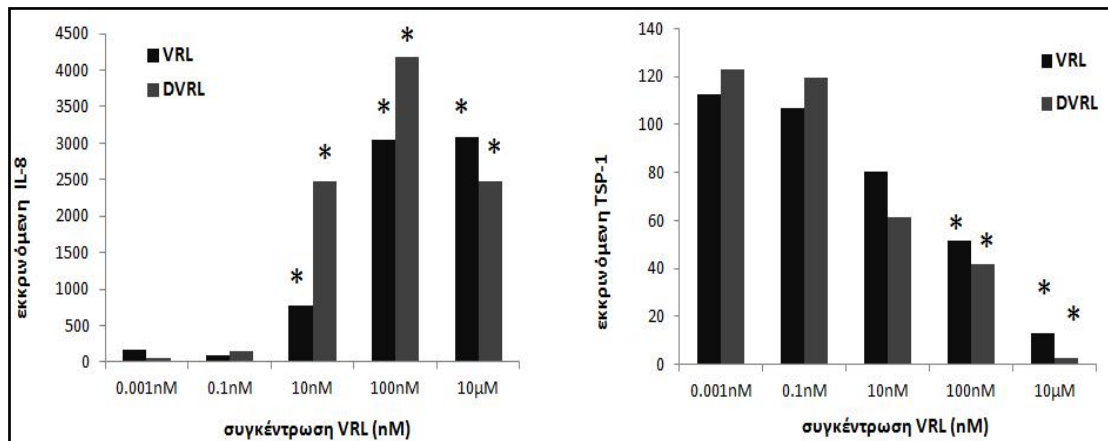
**Εικόνα 35:** Δοσοεξαρτώμενες και χρόνοςεξαρτώμενες μεταβολές στην έκφραση της TSP-1 και του υποδοχέα της CD47 σε κύτταρα HUVEC. Κύτταρα HUVEC επωάστηκαν για 4ώρες, 24 και 96ώρες (μετρονομικό μοντέλο) με VRL σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα παραπάνω γονίδια μελετήθηκαν με τη μέθοδο qRT-PCR. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό επι τις εκατό της ομάδας ελέγχου (control).

### 12.5) Επίδραση της VRL/DVRL στις εκκρινόμενες πρωτεΐνες.

Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν στις κατάλληλες συνθήκες και επωάστηκαν με VRL/DVRL για 96 ώρες σύμφωνα με το μετρονομικό μοντέλο. Στο τέλος του χρονικού διαστήματος συλλέχθηκε το θρεπτικό υλικό-medium και μετά από επεξεργασία που περιγράφεται παραπάνω έγινε ανάλυση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών VEGF, VEGFR2, TSP-1 και IL-8 με τη μέθοδο ELISA.

Όσον αφορά στις προαγγειογενετικές πρωτεΐνες VEGF/VEGFR2 ούτε η VRL ούτε ο μεταβολίτης προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές στα εκκρινόμενα επίπεδα στο μετρονομικό μοντέλο. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις 0,001nM και 0,1nM VRL προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση της IL-8, ενώ συγκεντρώσεις πάνω από

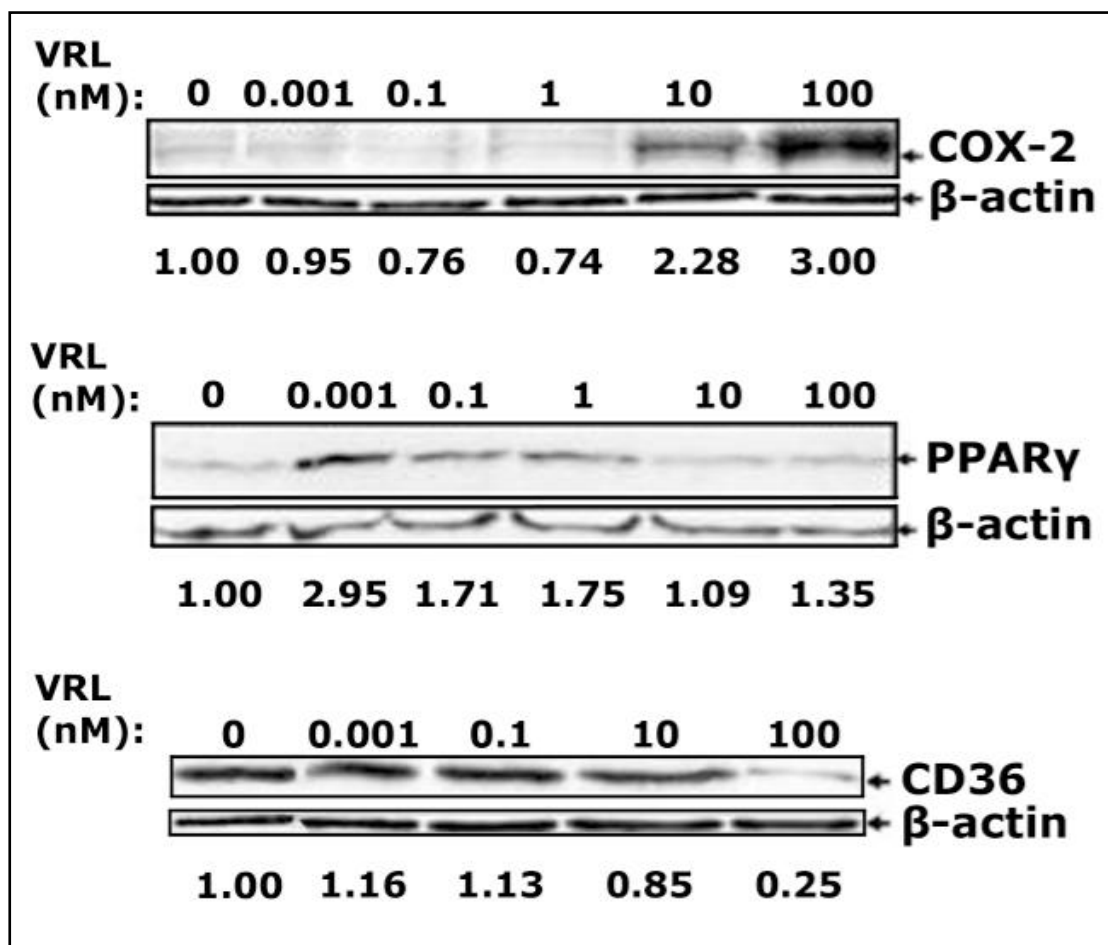
10nM οδήγησαν σε μεγάλη αύξηση στα εκκρινόμενα επίπεδα της IL-8 (30% αύξηση) με ταυτόχρονη στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα της αντιαγγειογενετικής TSP-1 (εικόνα 36). Οι ίδιες περίπου μεταβολές παρατηρήθηκαν μετά από επώαση των κυττάρων για 96 ώρες με το μεταβολίτη DVRL.



**Εικόνα 36:** Επίδραση των VRL/DVRL στα επίπεδα των IL-8 και TSP-1. Θρεπτικό υλικό-medium συλλέχθηκε μετά από 96 ώρες επώασης (μετρονομικό μοντέλο) και τα επίπεδα των πρωτεϊνών μετρήθηκαν με ELISA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί τις % ποσοστό της ομάδας ελέγχου (control). Με αστερίσκο σημειώνονται τα στατιστικώς σημαντικά ( $p$  value  $< 0,05$ ).

## 12.6) Επίδραση της VRL στις ολικές πρωτεΐνες.

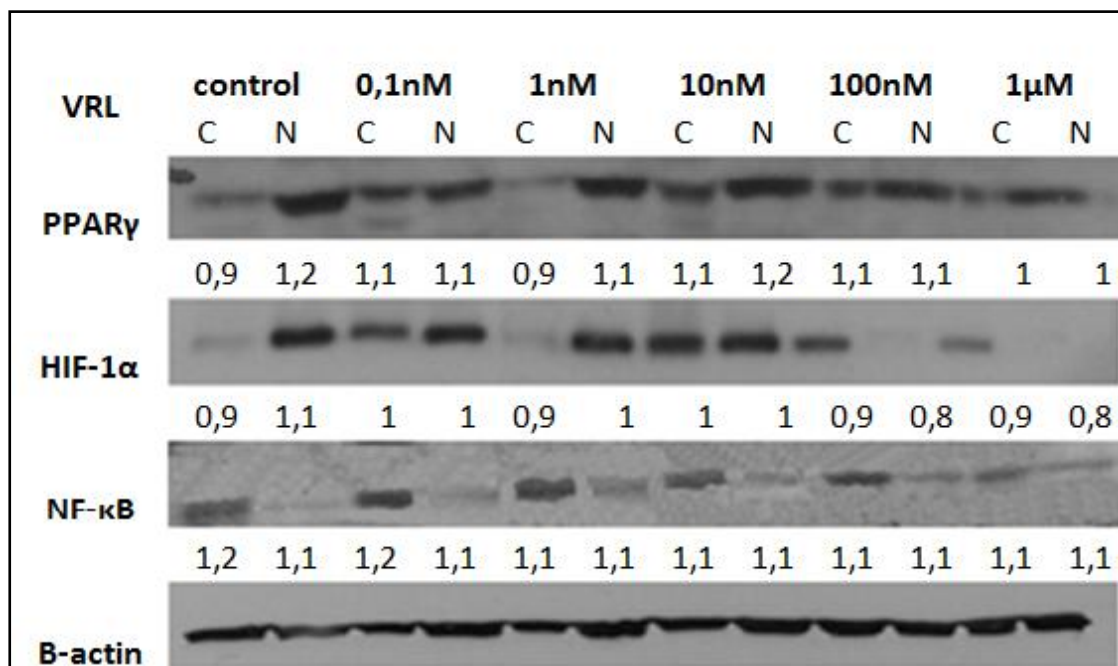
Ολικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από τα κύτταρα HUVEC και μελετήθηκαν με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης όπως περιγράφεται στη παράγραφο 9.B9. Στο 'μετρονομικό' πρόγραμμα, οι συγκεντρώσεις των 0,001 και 0,1nM VRL αύξησαν την πρωτεΐνη PPAR $\gamma$  σε στατιστικά σημαντικό ποσοστό ( $p < 0.05$ ) ενώ τα επίπεδα της COX-2 και CD36 διατηρήθηκαν σε επίπεδα παρόμοια με την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της ουσίας (10 και 100nM) προκάλεσαν δόσο-εξαρτώμενη μείωση των αντιαγγειογενετικών PPAR $\gamma$  και CD36 με παράλληλη αύξηση της αγγειογενετικής COX-2 (εικόνα 37).



**Εικόνα 37:** Ολικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν και αναλύθηκαν με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης, μετά από καλλιέργεια των HUVEC με VRL για 96 ώρες. Τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν μετά από κανονικοποίηση με  $\beta$ -ακτίνη.

### 12.7) Πυρηνική έκφραση μεταγραφικών παραγόντων.

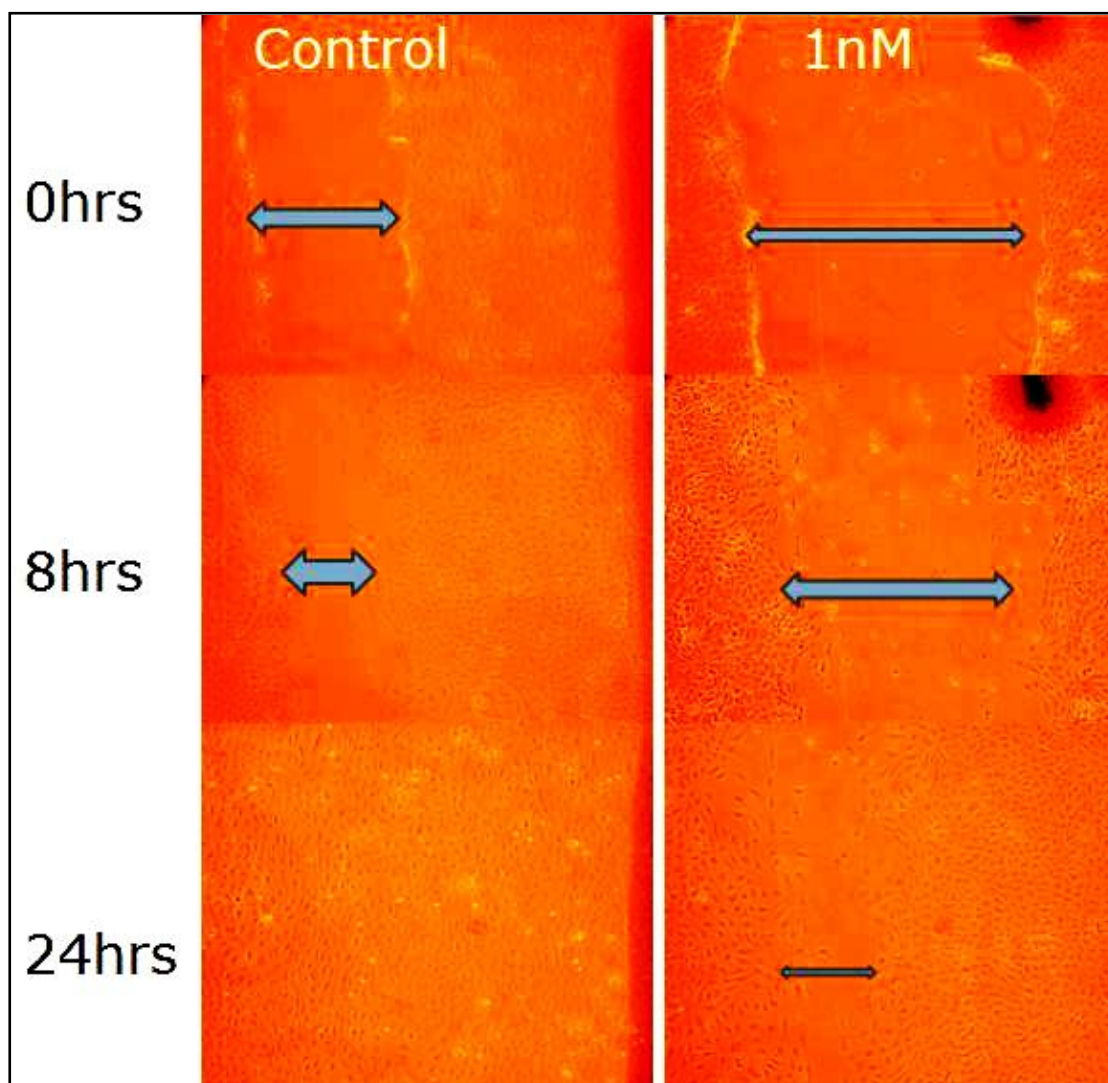
Για να διερευνήσουμε τη συμμετοχή του NF-κΒ στα σηματοδοτικά μονοπάτια της IL-8 and COX-2, κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών απομονώθηκαν και με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης αναλύθηκαν οι NF-κΒ, PPAR $\gamma$  και HIF-1 $\alpha$ . Τόσο ο PPAR $\gamma$ , όσο και ο HIF-1 $\alpha$  σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται στον πυρήνα του κυττάρου. Αντίθετα, ο NF-κΒ (p65) βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Η μετρονομική χορήγηση VRL δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση των παραπάνω μεταγραφικών πρωτεϊνών, ενώ οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαίνεται προς προκαλούν μετατόπιση του PPAR $\gamma$  και HIF-1 $\alpha$  από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Επίσης, στις κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις της VRL (1 $\mu$ M) η έκφραση του PPAR $\gamma$  και του HIF-1 $\alpha$  μειώνεται στον πυρήνα αλλά και στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή διάσπασή τους (degradation). Όσον αφορά στον NF-κΒ, η μετρονομική VRL δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την έκφρασή του (εικόνα 38).



**Εικόνα 38:** Έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων στα πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα. Πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν από τα HUVEC μετά από μετρονομική VRL. (c:κυτταρόπλασμα, n:πυρήνας). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται μετά από κανονικοποίηση με β-ακτίνη.

### 12.8) Μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας wound healing assay παρατηρήθηκε πως συγκεντρώσεις VRL μέχρι και 1nM, στο 'μετρονομικό μοντέλο' καθυστέρησαν την μετανάστευση-μετακίνηση των κυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ενώ η συγκέντρωση των 100nM προκάλεσε άμεση τοξικότητα στα κύτταρα (εικόνα 39).



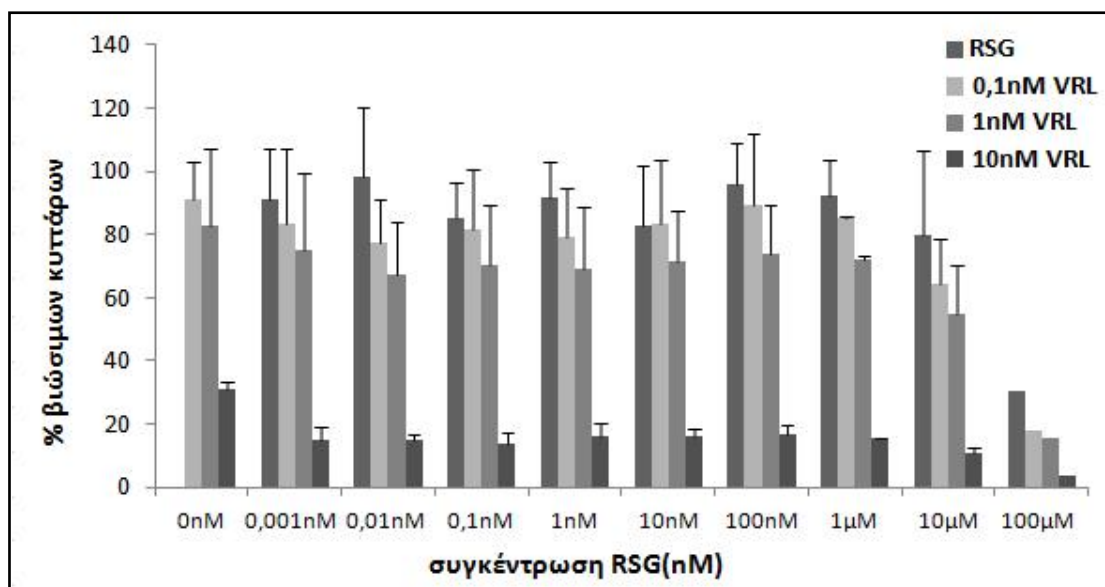
**Εικόνα 39:** Μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων - Wound healing Assay. Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν με VRL στο μετρονομικό μοντέλο. Μετά από 96 ώρες, δημιουργήθηκε στο τρυβλίο οπή και τα κύτταρα αποκολλήθηκαν σε πάχος περίπου 500μm. Καθορίστηκαν 3 χρονικά σημεία και έπειτα φωτογραφήσαμε τα κύτταρα με τη βοήθεια του συνεστιακού μικροσκοπίου.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΓΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΡΟΣΙΓΛΙΤΑΖΟΝΗΣ ΜΕ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ ΒΙΝΟΡΕΑΜΠΙΝΗ.

### 13.1) Επίδραση της συγχορήγησης ροσιγλιταζόνης (RSG) με μετρονομική VRL στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν για 96 ώρες είτε με RSG είτε με το συνδυασμό διαφορετικών συγκεντρώσεων RSG και σταθερών, μετρονομικών συγκεντρώσεων VRL (παράγραφος 9.B1 και 10.2). Με τη βοήθεια του τεστ MTS μελετήθηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός.

Παρατηρήθηκε πως όταν χορηγείται η RSG μόνη της χρειάζονται συγκεντρώσεις πάνω από 100μM για να ανασταλεί ο πολλαπλασιασμός του 50% των κυττάρων. Αντίθετα, όταν χορηγούμε μετρονομικές συγκεντρώσεις VRL (0,1nM και 1nM) απαιτείται συγκέντρωση 10μM RSG για να έχουμε ανάλογο αποτέλεσμα. Τέλος, όταν αυξάνουμε τη συγκέντρωση της VRL, σε δόσεις μεγαλύτερες της μετρονομικής, παρατηρείται σημαντικότερη κυτταροτοξικότητα σε οποιαδήποτε συγκέντρωση ροσιγλιταζόνης (εικόνα 40).



**Εικόνα 40:** Βιωσιμότητα κυττάρων HUVEC μετά από την επίδραση VRL, ροσιγλιταζόνης (RSG) ή συγχορήγησης VRL και RSG σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,001nM-100μM) στο μετρονομικό μοντέλο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως % των βιώσιμων κυττάρων.

### 13.2) Επίδραση της συγχορήγησης RSG με μετρονομική VRL στο κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση.

Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν μόνο με RSG για 96 ώρες (αλλάζοντας καθημερινά το θρεπτικό υλικό) ή και σε συνδυασμό μετρονομικών συγκεντρώσεων VRL με 3 συγκεντρώσεις RSG (1nM, 10nM και 100nM). Η επιλογή των συγκεντρώσεων της RSG έγινε με βάση το τεστ MTS καθώς δεν θέλαμε να έχουμε επιπλέον τοξικότητα στα κύτταρα από τη ροσιγλιταζόνη.

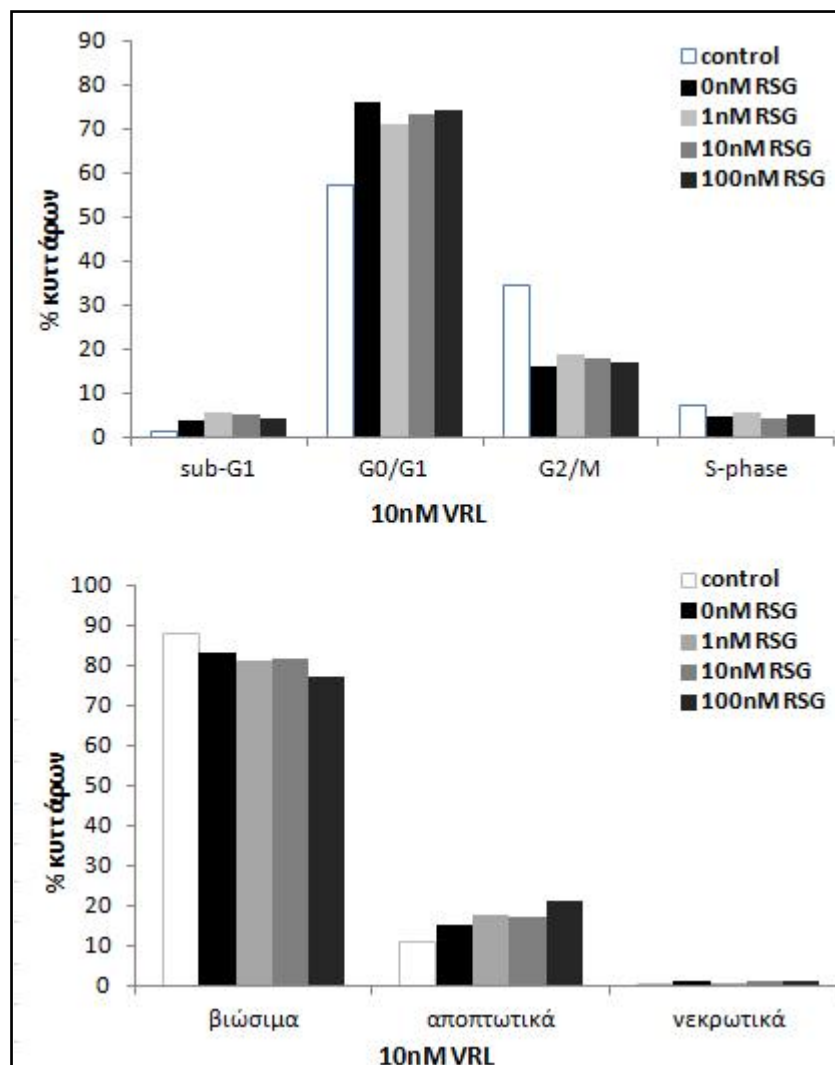
Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση της RSG στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση, όπου δεν διαπιστώθηκε καμία μεταβολή σε σχέση με την ομάδα control. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον **πίνακα 7**.

| RSG            | κυτταρικός κύκλος |         |       |        | απόπτωση |            |           |
|----------------|-------------------|---------|-------|--------|----------|------------|-----------|
|                | %G0/G1            | %Sphase | %G2/M | %subG1 | βιώσιμα  | αποπτωτικά | νεκρωτικά |
| <b>control</b> | 52,6              | 7,8     | 36,8  | 1,7    | 93,6     | 5,9        | 0,5       |
| <b>1nM</b>     | 52,8              | 10,5    | 35,6  | 1,7    | 92,6     | 6,6        | 0,8       |
| <b>10nM</b>    | 52,3              | 11,1    | 35,2  | 1,6    | 92,6     | 6,6        | 0,9       |
| <b>100nM</b>   | 54,0              | 8,6     | 38,1  | 2,0    | 93,3     | 6,0        | 0,6       |
| <b>1μM</b>     | 51,7              | 7,0     | 38,4  | 2,7    | 92,6     | 6,6        | 0,8       |
| <b>10μM</b>    | 54,0              | 7,5     | 35,0  | 2,4    | 93,6     | 5,7        | 0,6       |

**Πίνακας 7:** Επίδραση της RSG στον κυτταρικό κύκλο και στην απόπτωση των HUVEC μετά από 96 ώρες έκθεσης.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και στη συγχορήγηση μετρονομικών συγκεντρώσεων VRL με RSG. Καμία από τις συγκεντρώσεις της RSG δεν κατάφερε να επηρεάσει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στις μετρονομικές συγκεντρώσεις αλλά ούτε και να προκαλέσει απόπτωση στα HUVEC. Αντίθετα, η συγχορήγηση της μεγάλης συγκέντρωσης της VRL με όλες τις συγκεντρώσεις της RSG προκαλεί αύξηση του ποσοστού των κυττάρων της G0/G1 και μείωση αυτών που βρίσκονται στη φάση S. Όμως, τα αποτελέσματα αυτά δεν είχαν στατιστική σημαντικότητα. Τέλος, στο συνδυασμό των μεγάλων συγκεντρώσεων παρατηρήθηκε μικρή αύξηση

των αποπτωτικών κυττάρων σε σύγκριση με την ομάδα control. Αξίζει να σημειωθεί πως η αύξηση αυτή δεν διαφέρει σημαντικά σε σύγκριση με την αύξηση στην απόπτωση που προκαλεί μόνη της η δόση των 10nM VRL στις 96hrs (**εικόνα 41**).



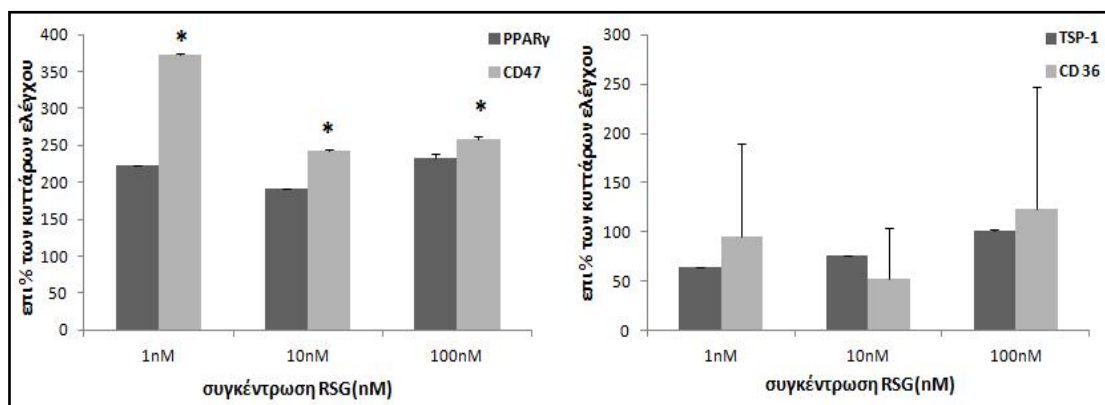
**Εικόνα 41:** Συγχορήγηση 10nM VRL με συγκεντρώσεις ροσιγλιταζόνης για 96 ώρες στο μετρονομικό πρωτόκολλο. Κάθε στήλη αντιστοιχεί σε μία συγκέντρωση ροσιγλιταζόνης. Η μαύρη στήλη αντιστοιχεί στα 10nM VRL (0 nM RSG).

### 13.3) Επίδραση της RSG στην έκφραση παραγόντων που συμμετέχουν στην αγγειογένεση.

#### 13.3.1) Επίδραση της RSG στους παράγοντες αγγειογένεσης.

Μετά από καλλιέργεια των κυττάρων για 96 ώρες με διάφορες συγκεντρώσεις RSG, όπως αναφέρεται στις παραγράφους 10.2, συγκεντρώθηκε RNA και αναλύθηκε με τη μέθοδο qRT-PCR, προκειμένου να διαπιστωθεί αν το φάρμακο μπορεί να επηρεάσει τους δείκτες αγγειογένεσης.

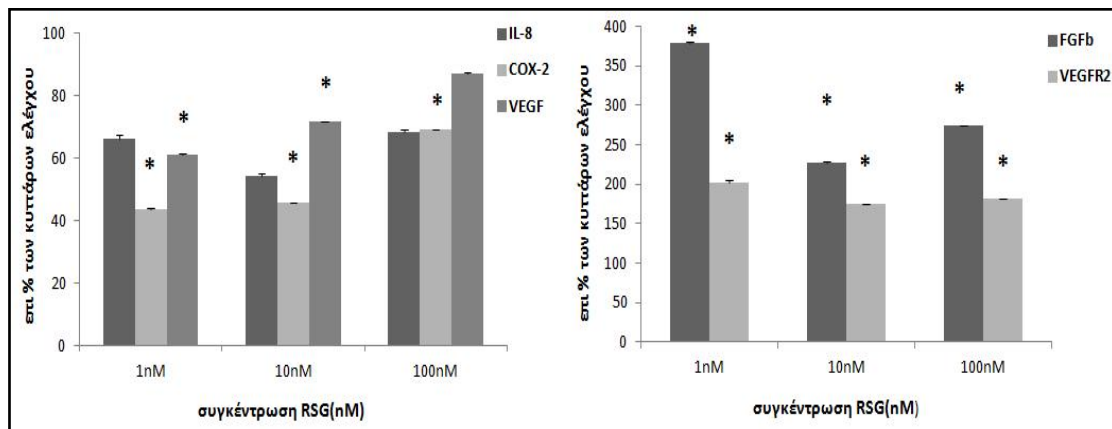
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την qRT-PCR, αποκάλυψε πως η RSG προκαλεί μια δόσοεξαρτώμενη αύξηση του PPAR $\gamma$ . Στατιστικά σημαντική αύξηση κυρίως στις συγκεντρώσεις μέχρι 100nM παρατηρήθηκε και για τον υποδοχέα της θρομβοσπονδίνης CD47. Τα επίπεδα της θρομβοσπονδίνης TSP-1 και του υποδοχέα CD36 παρέμειναν αμετάβλητα (εικόνα 42).



**Εικόνα 42:** Έκφραση των αντιαγγειογενετικών παραγόντων μετά από 96 hrs έκθεση στη RSG. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επι τις % ποσοστό των κυττάρων ελέγχου (control). Με αστερίσκο σημειώνονται τα στατιστικώς σημαντικά ( $p$  value <0,05)

Αντίθετα, τα επίπεδα των προαγγειογενετικών παραγόντων IL-8, COX-2 και VEGF μειώθηκαν με την αύξηση της συγκέντρωσης της RSG (εικόνα 43) ενώ στις

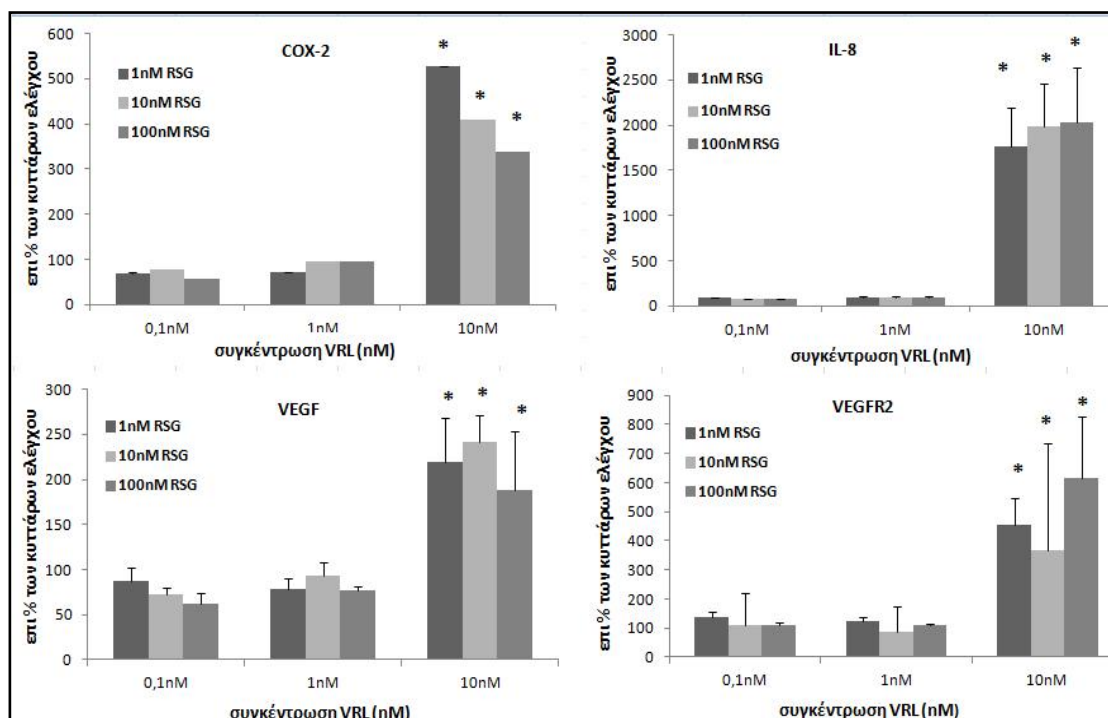
μικρότερες συγκεντρώσεις της RSG παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των FGF-2 και VEGFR2, η οποία όμως δεν διατηρήθηκε στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.



**Εικόνα 43:** Έκφραση των προαγγειογενετικών παραγόντων μετά από 96 hrs έκθεση στη RSG. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επι τις % ποσοστό των κυττάρων ελέγχου (control). Με αστερίσκο σημειώνονται τα στατιστικώς σημαντικά ( $p$  value < 0,05).

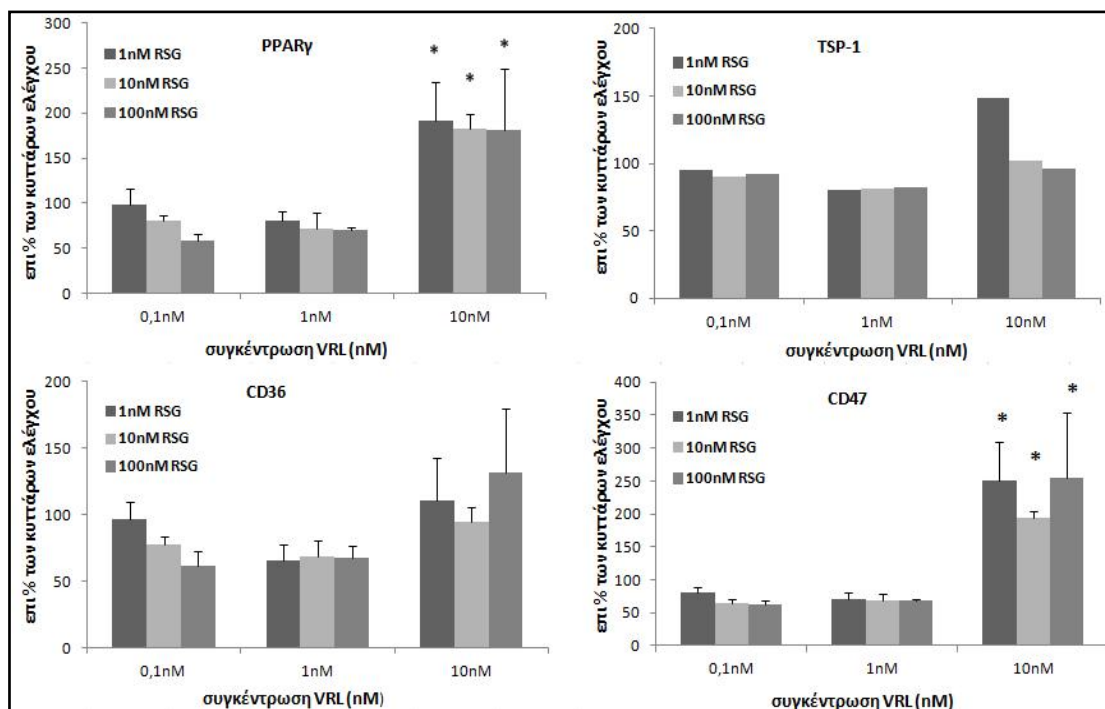
### 13.3.2) Συγχρόνηση μετρονομικής VRL με RSG και αγγειογένεση.

Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν με δυο μετρονομικές συγκεντρώσεις VRL σε συνδυασμό με 3 συγκεντρώσεις ροσιγλιταζόνης (1nM, 10nM, 100nM) καθώς και μία μεγαλύτερη συγκέντρωση VRL, αυτή των 10nM με τον ίδιο συνδυασμό RSG. Η έκφραση των γονιδίων αγγειογένεσης μελετήθηκε σε επίπεδο mRNA με τη μέθοδο qRT-PCR. Βρέθηκε λοιπόν, ότι ο συνδυασμός χαμηλών συγκεντρώσεων VRL με δοσοεξαρτώμενη αύξηση της RSG αναστέλλει την έκφραση των προ-αγγειογενετικών παραγόντων IL-8 και COX-2 ενώ διατηρούν σε χαμηλά επίπεδα, σχεδόν ίδια με τα επίπεδα της ομάδας control, την έκφραση του VEGF και VEGFR2. Αντίθετα, η συγχρόνηση των 10nM VRL με RSG οδήγησε σε αύξηση της IL-8, COX-2, VEGF και VEGFR2 με την μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση της RSG για την IL-8 (**εικόνα 44**). Τέλος, ο συνδυασμός των δυο φαρμάκων δεν επηρέασε τα επίπεδα του FGF-2.



**Εικόνα 44:** Επίδραση της RSG στη μετρονομική VRL στην έκφραση προ αγγειογενετικών μοριακών δεικτών. Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σύμφωνα με το μετρονομικό πρωτόκολλο με βινορελμπίνη και ροσιγλιταζόνη. RNA απομονώθηκε και αναλύθηκε με τη μέθοδο της qRT-PCR. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επι τις % ποσοστό των κυττάρων ελέγχου (control). Με αστερίσκο σημειώνονται τα στατιστικώς σημαντικά ( $p$  value < 0,05).

Όσον αφορά στους αντιαγγειογενετικούς δείκτες, ο συνδυασμός της μετρονομικής VRL με τη RSG δεν επηρέασε σημαντικά την έκφραση των PPAR $\gamma$ , TSP-1, CD36 και CD47. Όμως, παρατηρήθηκε αύξηση στο συνδυασμό των μεγάλων συγκεντρώσεων των δυο φαρμάκων, τόσο για το PPAR $\gamma$  όσο και για τον υποδοχέα CD47 (εικόνα 45).



**Εικόνα 45:** Επίδραση της RSG στη μετρονομική VRL στην έκφραση αντι-αγγειογενετικών μοριακών δεικτών. Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σύμφωνα με το μετρονομικό πρωτόκολλο με βινορελμπίνη και ροσιγλιταζόνη. RNA απομονώθηκε και αναλύθηκε με τη μέθοδο της qRT-PCR. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επι τις % ποσοστό των κυττάρων ελέγχου (control). Με αστερίσκο σημειώνονται τα στατιστικώς σημαντικά (p value < 0,05.)

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## **Συσχέτιση των *in vitro* αποτελεσμάτων με τη κλινική μελέτη MOVIN.**

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στράφηκε σε ένα καινούργιο πεδίο έρευνας, αυτό της μετρονομικής χημειοθεραπείας. Μια εναλλακτική θεραπευτική στρατηγική, που χρησιμοποιεί κλασικά κυτταροτοξικά φάρμακα, με νέα δοσολογικά πρωτόκολλα. Έτσι, άρχισαν να πραγματοποιούνται κλινικές δοκιμές με μετρονομικά σχήματα που χρησιμοποιούσαν αντιμιτωτικά φάρμακα σε υποτοξικές δόσεις (χαμηλότερες της μέγιστης ανεκτής δόσης), χωρίς όμως να υπάρχουν χρονικά μεσοδιαστήματα. Η φαρμακοτεχνική μορφή των αντιμιτωτικών φαρμάκων αποτελούσε σημαντικό εμπόδιο στο σχεδιασμό των μελετών, με αποτέλεσμα οι περισσότερες μελέτες να περιλαμβάνουν τη κυκλοφωσφαμίδη. Όμως, πριν λίγα χρόνια κυκλοφόρησε στο εμπόριο η καινούργια φαρμακοτεχνική της VRL, με τη μορφή κάψουλας, που επέτρεψε στην ομάδα μας να πραγματοποιήσει κλινική δοκιμή φάσης I και II, με από του στόματος χορήγηση μετρονομικής VRL (288, 292).

Βασικός στόχος των δυο μελετών ήταν η ανεύρεση της βέλτιστης μετρονομικής δόσης καθώς και μοριακών δεικτών με προβλεπτική αξία. Από τους σημαντικότερους δείκτες ήταν η IL-8, της οποίας τα χαμηλά επίπεδα πριν από τη θεραπεία, συσχετίστηκαν με μεγαλύτερο όφελος από τη θεραπεία με μετρονομική VRL. Όμως, η IL-8 φέρεται να έχει καθοριστικό ρόλο και σε κυτταρικό επίπεδο, καθώς η μετρονομική βινoreλμπίνη μειώνει τα επίπεδα τόσο του mRNA όσο και της πρωτεΐνης, ενώ οι πιο υψηλές δόσεις του φαρμάκου προκαλούν την αύξησή της. Άρα, η μετρονομική VRL φαίνεται πως διατηρεί χαμηλά τα επίπεδα της IL-8 *in vitro* και τα *in vivo* χαμηλά επίπεδα σχετίζονται με όφελος από τη θεραπεία και καλύτερη πρόγνωση (308). Επομένως, τόσο τα *in vitro* πειραματικά δεδομένα όσο και τα *in vivo* πιστοποιούν το σημαντικό ρόλο της IL-8 στη μετρονομική θεραπεία με βινoreλμπίνη.

Αντίθετα, ενώ από τις δημοσιευμένες μελέτες αποδείχθηκε η προβλεπτική αξία των χαμηλών επιπέδων του VEGF και του FGF-2, στο δικό μας *in vitro* μετρονομικό μοντέλο, οι αγγειογενετικοί αυτοί παράγοντες δεν φάνηκαν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Όμως, πρέπει να επισημάνουμε πως όσον αφορά στο VEGF, τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες, ενώ εκφράζουν σημαντικά

τους υποδοχείς του. Δεν είναι ξεκάθαρο λοιπόν, εάν ο VEGF δρα αυτοκρινικά (122). Τέλος, από τη μελέτη φάσης I φάνηκε πως και η TSP-1 θα μπορούσε να αποτελέσει προβλεπτικό παράγοντα της μετρονομικής χημειοθεραπείας, με τα υψηλά επίπεδα προ της θεραπείας να δηλώνουν την ανταπόκριση σε αυτήν, σε αντίθεση με τα χαμηλά επίπεδα που παρατηρήθηκαν σε αυτούς που δεν ωφελήθηκαν. Όμως, όπως και στο *in vitro* μοντέλο, έτσι και στη μελέτη φάσης II τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά.

Εκτός από την ανεύρεση μοριακών δεικτών, καταληκτικό σημείο στη μελέτη φάσης II ήταν ο καθορισμός της βέλτιστης δόσης του φαρμάκου. Απαραίτητη προϋπόθεση αποτελούσε το γεγονός πως έπρεπε να επιτευχθούν σταθερά επίπεδα φαρμάκου καθ' όλη τη διάρκεια της θεραπευτικής περιόδου. Η φαρμακοκινητική ανάλυση έδειξε πως η σχέση συγκέντρωσης και δόσης είναι γραμμική, πως τα επίπεδα του φαρμάκου διατηρήθηκαν σταθερά σε όλη τη διάρκεια της θεραπείας και πως τα *tough steady-state* επίπεδα κυμαίνονταν από 0,5 μέχρι 1,5 ng/ml. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με αυτά της παρούσας διατριβής, καθώς η φαρμακοκινητική ανάλυση του θεραπευτικού υλικού των HUVEC, μετά την επίδραση του μετρονομικού πρωτοκόλλου, ανέδειξε παρόμοια γραμμική συσχέτιση συγκέντρωσης-δόσης. Επίσης τα επίπεδα της VRL παρέμειναν σταθερά και δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση του φαρμάκου στο τέλος της επώασης. Επιπλέον, τα επίπεδα που βρέθηκαν στην φαρμακοκινητική ανάλυση των ασθενών αντιστοιχούν στα επίπεδα εκείνα που προκαλούν αναστολή στον πολλαπλασιασμό των HUVEC κατά 50% (IC<sub>50</sub> για τη VRL 1,23 nM).

Συμπερασματικά λοιπόν, τα αποτελέσματα της κλινικής δοκιμής συσχετίζονται σε πολλά σημεία με αυτά της *in vitro* πειραματικής διαδικασίας. Η παρούσα μελέτη παρέχει σημαντικά ερευνητικά δεδομένα που υποστηρίζουν τα ευνοϊκά αποτελέσματα της πρόσφατης κλινικής δοκιμής με από του στόματος μετρονομικής χημειοθεραπείας (MOVIN). Σημαντικότερο όλων, η ανάδειξη της IL-8 ως πιθανό διαμεσολαβητή της μετρονομικής VRL. Όμως, υπάρχουν ακόμα ανεξερεύνητα πεδία που χρειάζεται να διαλευκανθούν σχετικά με την μετρονομική χημειοθεραπεία και την αγγειογένεση. Σε αυτό θα συμβάλλουν, περισσότερες *in vitro* μελέτες αλλά και κλινικές δοκιμές όπου θα χρησιμοποιούνται νεότερα θεραπευτικά πρωτόκολλα σε συνδυασμό με άλλες

αντιαγγειογενετικές θεραπείες ή ακόμα και νεότερους μοριακούς παράγοντες στόχευσης.

### **In vitro μετρονομική βινορελμπίνη.**

Η μετρονομική χορήγηση VRL έχει αποδειχθεί σε κλινικές μελέτες πως ασκεί αντικαρκινικές δράσεις στον μεταστατικό καρκίνο, κυρίως μέσα από αντιαγγειογενετικούς μηχανισμούς (288, 292, 309). Επιδιώξαμε λοιπόν, να μελετήσουμε τις κυτταρικές και μοριακές επιδράσεις της μετρονομικής VRL και του ενεργού μεταβολίτη της (DVRL) σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC, προκειμένου να εμπλουτίσουμε τη μετρονομική θεωρία με επιπρόσθετα δεδομένα αλλά και να αναπτύξουμε πιθανούς συνδυασμούς θεραπευτικής δράσης. Από τα πιο σημαντικά ευρήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η αποτελεσματικότητα της μετρονομικής VRL στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και η ανάδειξη της IL-8 και του PPAR $\gamma$  ως κυριότερων διαμεσολαβητών της αντιαγγειογενετικής δράσης της.

Πρωταρχικό στόχο της μελέτης αποτέλεσε η επίτευξη ενός μετρονομικού μοντέλου χορήγησης της VRL στα HUVEC, το οποίο θα προσομοίαζε όσο το δυνατόν περισσότερο με αυτό της κλινικής πράξης. Έτσι, χορηγήσαμε την βινορελμπίνη για 96 ώρες με καθημερινή σταθερή συγκέντρωση. Έπειτα, έπρεπε να επιβεβαιώσουμε πως τα κύτταρα βρίσκονταν υπό την επίδραση σταθερής συγκέντρωσης του φαρμάκου. Αυτό επαληθεύτηκε με τη φαρμακοκινητική ανάλυση του θεραπευτικού υλικού, που ανέδειξε τη δόσοεξαρτώμενη γραμμικότητα της VRL και του DVRL αλλά και τη σταθερότητα των επιπέδων του φαρμάκου καθόλη τη διάρκεια των 96 ωρών χωρίς να υπάρχει συσσώρευση. Επομένως, καταφέραμε να προσομοιάσουμε ένα μετρονομικό μοντέλο in vitro χορήγησης VRL σε κύτταρα HUVEC, γεγονός που περιγράφεται για πρώτη φορά από όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε.

Στη συνέχεια, έπρεπε να αποδείξουμε εάν η μετρονομική VRL μπορεί να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να επάγει την απόπτωση, που αποτελούν βασικά σημεία στη καρκινογένεση ή αλλιώς «hallmarks of cancer» (1). Στο δικό μας

μετρονομικό μοντέλο, συγκεντρώσεις VRL μεταξύ 1nM-5nM, βρέθηκαν να προκαλούν αναστολή του πολλαπλασιασμού περίπου στο 50% (IC<sub>50</sub> 1.23nM) ενώ οι ίδιες συγκεντρώσεις δεν επηρέασαν τον πολλαπλασιασμό των HUVEC στις 24 ώρες. Αντίθετα, για να ανασταλεί ο πολλαπλασιασμός των HUVEC στις 24 ώρες, χρειάστηκαν συγκεντρώσεις φαρμάκου πάνω από 10μM (IC<sub>50</sub> 32μM). Από την ανασκόπηση των αποτελεσμάτων στη βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα του μετρονομικού μοντέλου δεν μπορούν να συγκριθούν με άλλα καθώς η VRL δεν έχει χρησιμοποιηθεί με αυτό τον τρόπο στο παρελθόν. Όμως, όπως προκύπτει από μια μελέτη του Hayot, ο οποίος προσπάθησε να αποδείξει τις αντιαγγειογενετικές ιδιότητες 20 αντιμιτωτικών φαρμάκων, ανάμεσα τους και η βινορελμπίνη, το IC<sub>50</sub> του φαρμάκου ήταν κατά 2 μονάδες μεγέθους χαμηλότερο στις 24 ώρες (15). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική τεχνική αλλά και στον διαφορετικό αριθμό κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν. Στη περίπτωση της μετρονομικής χημειοθεραπείας, η αναστολή του πολλαπλασιασμού των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων ενδοθηλιακών κυττάρων οφείλεται σε ένα βαθμό είτε στην απόπτωση είτε στην αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου (310). Στο πειραματικό μας μοντέλο αποδείξαμε την αποτελεσματικότητα της VRL στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των HUVEC, αλλά όχι ανάλογη επαγωγή της απόπτωσης. Οι υποτοξικές συγκεντρώσεις VRL, δηλαδή αυτές που θεωρούμε ότι αντιστοιχούν στις μετρονομικές συγκεντρώσεις, δεν προκάλεσαν απόπτωση αλλά ούτε και αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο των HUVEC, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στη διατήρηση σταθερών επιπέδων της TSP-1 σε συγκεντρώσεις 1 nM και μικρότερες (196). Απόπτωση παρατηρήθηκε στα 10 nM και κυρίως στη συγκέντρωση των 100 nM VRL, όπου διαπιστώθηκε και συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G2/M, που όμως αποτελεί συγκέντρωση πρακτικά εκτός πεδίου μετρονομικής χορήγησης. Επιπλέον, σε αυτά τα επίπεδα συγκεντρώσεων παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές και στο μοντέλο της κλασσικής χημειοθεραπείας, με τις μεγάλες δόσεις του φαρμάκου να προκαλούν απόπτωση και αναστολή του κυτταρικού κύκλου.

Φαίνεται λοιπόν, πως κάποιες από τις αγγειογενετικές δράσεις της VRL εμφανίζονται σε συγκεντρώσεις περισσότερο τοξικές όπως προκύπτει και από τη μελέτη του Hayot το 2002, που απέδωσε την ικανότητα αναστολής της δημιουργίας αγγειακών δομών

και της μετανάστευσης στην άμεση κυτταροτοξικότητα της VRL σε αντίθεση με τα υπόλοιπα αντιμυτωτικά φάρμακα (15). Παρόμοια αποτελέσματα περιγράφονται και στις μελέτες του Vacca με τη βινβλαστίνη (311) και του Hotchkiss με τη δοσιταξέλη (22) όπου οι βασικές αντιαγγειογενετικές ιδιότητες των φαρμάκων κατά των μικροσωληνίσκων της τουμπουλίνης (microtubule-binding drugs) εμφανίζονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Σημαντικό μέρος της συγκεκριμένης διατριβής αποτέλεσε η μελέτη μοριακών δεικτών που κατέχουν κύριες θέσεις στα σηματοδοτικά μονοπάτια της αγγειογένεσης, καθώς και οι μεταβολές του από τη μετρονομική VRL. Συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε πως τόσο το μετρονομικό μοντέλο όσο και το κλασικό μοντέλο, επηρέασαν τα βασικά επίπεδα της IL-8 και του PPAR $\gamma$  με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, αλλά προς την αντίθετη πλευρά. Ειδικότερα, η μετρονομική βινορελμπίνη μείωσε τα επίπεδα του mRNA και της εκκρινόμενης πρωτεΐνης IL-8, ενώ η κλασική χημειοθεραπεία προκάλεσε σημαντική αύξηση στο mRNA της IL-8. Από τα πειραματικά δεδομένα επαληθεύεται πως η IL-8 εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC (140) και πως δυνητικά είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας αυτών των κυττάρων με αυτοκρινικό τρόπο. Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα της IL-8, όπως το χημικό στρες και η υποξία (144). Παρατηρούμε λοιπόν, πως ενώ οι υποτοξικές, μετρονομικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου μειώνουν την έκφραση της IL-8, οι συγκεντρώσεις εκείνες που προκαλούν κυτταροτοξικότητα και απόπτωση (δηλαδή συγκεντρώσεις πάνω από 10 nM) την αυξάνουν σημαντικά. Είναι γνωστό, πως η διατήρηση της IL-8 σε χαμηλά επίπεδα αποτελεί σημαντικό στοιχείο στη θεραπευτική του καρκίνου. Χαρακτηριστικά, η υπερέκφραση της IL-8 συσχετίστηκε με την υποτροπή του όγκου και τις μεταστάσεις (308) ενώ στη πρόσφατη κλινική δοκιμή με τη μετρονομική VRL, οι ασθενείς που ωφελήθηκαν από την θεραπεία ήταν αυτοί που είχαν χαμηλότερα επίπεδα IL-8 (292). Το γεγονός πως τα επίπεδα της IL-8 καταστέλλονται από τη μετρονομική βινορελμπίνη *in vitro* σε συνδυασμό με το προγνωστικό χαρακτήρα που φέρει *in vivo* την καθιστούν σημαντικό ρυθμιστή και διαμεσολαβητή της μετρονομικής χημειοθεραπείας.

Σημαντικές μεταβολές που αποδεικνύουν το δικό του σημαντικό ρόλο στη μετρονομική χημειοθεραπεία παρατηρήθηκαν στα επίπεδα του υποδοχέα PPAR $\gamma$ . Οι

μετρονομικές συγκεντρώσεις που προκαλούν μείωση των επιπέδων της IL-8, προκαλούν επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης του PPAR $\gamma$ . Επιπλέον, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (10nM και 100nM) μειώνουν τα επίπεδα του PPAR $\gamma$ . Ο PPAR $\gamma$  αποτελεί ένα πυρηνικό υποδοχέα με ρόλο μεταγραφικού παράγοντα που ρυθμίζει λειτουργίες όπως την απόπτωση και την αγγειογένεση (247). Επιπλέον, κάποιοι από τους προσδέτες του PPAR $\gamma$  διαθέτουν αντικαρκινικές δράσεις σε διαφόρων ειδών όγκους (248). Όπως προκύπτει από τη παρούσα έρευνα, υπάρχει σημαντική συσχέτιση των συγκεντρώσεων του φαρμάκου και της έκφρασης του υποδοχέα. Επίσης, τα δεδομένα της συγχορήγησης της ροσιγλιταζόνης με τη βινορελμίνη υποδεικνύουν τη συνεργική δράση των δυο φαρμάκων. Επομένως, οι δοσοεξαρτώμενες μεταβολές στα επίπεδα του PPAR $\gamma$  και η ενεργοποίησή του, που κυρίως συμβαίνουν στο μετρονομικό μοντέλο, αποτελούν έναν ακόμα πιθανό μηχανισμό της αντιαγγειογενετικής δράσης της μετρονομικής VRL.

Ένα ακόμα μονοπάτι που σχετίζεται με την IL-8 και συμμετέχει στην αγγειογένεση είναι της COX-2 (312). Όπως είναι γνωστό, η COX-2 είναι ένα ένζυμο που δεν ανιχνεύεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες. Στο δικό μας πειραματικό μοντέλο, σε φυσιολογικές συνθήκες, σε επίπεδο κυττάρων ελέγχου ανιχνεύτηκαν χαμηλά επίπεδα mRNA της COX-2, γεγονός που παρατηρείται και στη μελέτη του Cook-Jonhson (168). Οι μετρονομικές δόσεις της VRL διατήρησαν χαμηλά τα επίπεδα αυτά. Αντίθετα, οι υψηλές δόσεις της VRL, στις 96 ώρες, προκάλεσαν αύξηση της έκφρασης της COX-2, με την μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται στη συγκέντρωση των 100 nM. Δοσοεξαρτώμενη αύξηση στη έκφραση της COX-2 παρατηρήθηκε και στα άλλα δυο πειραματικά μοντέλα. Παρατηρούμε λοιπόν, πως η μετρονομική VRL με τα χαμηλά επίπεδα mRNA της COX-2 ασκεί έμμεσες αντιαγγειογενετικές δράσεις.

Αντίθετα, ούτε το μετρονομικό ούτε το κλασικό μοντέλο χημειοθεραπείας που χρησιμοποιήθηκε, προκάλεσαν αλλαγές στα επίπεδα του VEGF και VEGFR2. Από την ανάλυση της βιβλιογραφίας προκύπτει πως το μονοπάτι του VEGF αποτελεί ένα απ' τα κυριότερα μονοπάτια της αγγειογένεσης και πως η μετρονομική χημειοθεραπεία ασκεί αρνητική ρύθμιση σε *in vivo* μελέτες (47) αλλά και σε *in vitro* πειράματα με διαφόρων ειδών καρκινικές σειρές (48). Όμως, είναι σημαντικό να τονίσουμε πως τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες του

VEGF, ενώ εκφράζουν σημαντικά τους υποδοχείς του. Αυτός είναι ίσως και ο λόγος που στο δικό μας πειραματικό μοντέλο δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές, καθώς υπήρχε μόνο ένας κυτταρικός πληθυσμός ενδοθηλιακών κυττάρων (122).

Επιπλέον, δημοσιευμένες μελέτες υποδεικνύουν πως ο PPAR $\gamma$ , η COX-2 και η IL-8 ρυθμίζονται από τον NF- $\kappa$ B (144, 313). Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε πως ο NF- $\kappa$ B εμπλέκεται στο οξειδωτικό τραύμα που προκαλεί η βινορελμπίνη αλλά σε δόσεις μεγαλύτερες από αυτές που χρησιμοποιούνται στη κλασσική χημειοθεραπεία (314). Στη δική μας μελέτη, οι μετρονομικές συγκεντρώσεις της VRL δεν προκάλεσαν καμία μεταβολή στην έκφραση του NF- $\kappa$ B. Μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις VRL προκάλεσαν μετατόπιση του NF- $\kappa$ B από το κυτταρόπλασμα στο πυρήνα (όχι στατιστικά σημαντικό). Η μεταβολή αυτή πιθανά σχετίζεται με ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα. Όμως χρειάζονται επιπλέον πειραματικά δεδομένα προκειμένου να εξακριβωθεί ο ρόλος του NF- $\kappa$ B στη μετρονομική χημειοθεραπεία.

Τέλος, ενώ η TSP-1 φαίνεται να είναι μερικά υπεύθυνη για την αντιαγγειογενετική δράση της μετρονομικής χημειοθεραπείας (53) η μετρονομική VRL στο κυτταρικό μοντέλο μας δεν κατάφερε να μεταβάλλει σημαντικά την έκφρασή της, ούτε σε επίπεδο mRNA ούτε σε επίπεδο πρωτεΐνης. Αντίθετα, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις VRL φαίνεται πως μειώνουν τα επίπεδα της TSP-1 αλλά και του υποδοχέα της CD36. Αξιοσημείωτη είναι η αύξηση του CD36 στη χαμηλότερη συγκέντρωση μετρονομικής VRL που όμως δεν συνοδεύτηκε από ανάλογη αύξηση της TSP-1. Συμπεραίνουμε λοιπόν, πως η μετρονομική VRL διαθέτει αντιαγγειογενετική δράση καθώς ρυθμίζει την έκφραση σημαντικών αγγειογενετικών δεικτών με κυριότερους την IL-8 και τον PPAR $\gamma$ .

Συμπερασματικά, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, η συνεχόμενη χορήγηση υποτοξικών συγκεντρώσεων της VRL, που προσομοιάζει με αυτήν της μετρονομικής από του στόματος χορήγησης VRL, υπερέχει σε σχέση με την εφάπαξ χορήγηση υψηλότερων δόσεων φαρμάκου σε τομείς που αφορούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και τη ρύθμιση αγγειογενετικών μορίων. Η αρνητική ρύθμιση προαγγειογενετικών μορίων όπως είναι η IL-8 και η COX-2 αλλά και η θετική ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων όπως είναι ο PPAR $\gamma$  αποτελούν ενδείξεις πως η μετρονομική

χημειοθεραπεία με βινορελμπίνη μπορεί να ασκήσει αντιαγγειογενετική δράση χωρίς επιπλέον τοξικότητα στα κύτταρα. Επιπλέον, η ανάδειξη της IL-8 ως διαμεσολαβητής της μετρονομικής VRL in vitro επαληθεύει το ρόλο της ως βιοδείκτη στη κλινική πράξη. Όμως, χρειάζονται επιπλέον μελέτες και πειράματα in vivo και in vitro για να διευκρινιστούν οι μοριακοί μηχανισμοί και τα υπόλοιπα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην αγγειογένεση.

## **Συγχορήγηση ενεργοποιητών του PPAR $\gamma$ με μετρονομική VRL σε ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC.**

Ο PPAR $\gamma$  αποτελεί πυρηνικό υποδοχέα, που λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας και ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται σε πληθώρα βιολογικών λειτουργιών όπως η σύνθεση των λιπιδίων, ο μεταβολισμός της γλυκόζης, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η επιβίωση (238). Με το πέρασμα των χρόνων, αποδείχθηκε πως συμμετέχει στη φλεγμονή, στην αγγειογένεση και στην καρκινογένεση (239). Η ενεργοποίηση του PPAR $\gamma$  γίνεται είτε με ενδογενή μόρια-συνδέτες, είτε με εξωγενή συνθετικά μόρια. Η μεγαλύτερη κατηγορία εξωγενών ενεργοποιητών του PPAR $\gamma$  είναι οι θειαζολινεδιόνες, νεότερα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του διαβήτη. Αρκετές είναι οι μελέτες που έχουν δημοσιευτεί και πιστοποιούν τις αντιαγγειογενετικές δράσεις των θειαζολινεδιονών (239), τόσο σε *in vitro* συστήματα όσο και σε *in vivo* (300). Όμως, από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, προκύπτει πως ελάχιστες ήταν οι μελέτες που συνδύασαν τις θειαζολινεδιόνες με μετρονομικού τύπου θεραπεία (282), (301). Επιδιώξαμε λοιπόν, να μελετήσουμε τις κυτταρικές και μοριακές επιδράσεις της ροσιγλιταζόνης, που ανήκει στην κατηγορία των θειαζολινεδιονών, αλλά και τυχόν μεταβολές που μπορεί να προκύψουν από τη συγχορήγηση μετρονομικής VRL. Παρατηρήσαμε λοιπόν, πως η συγχορήγηση της ροσιγλιταζόνης με τη μετρονομική βινορελμπίνη έχει συνεργική δράση στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στη ρύθμιση των αντιαγγειογενετικών παραγόντων.

Όσον αφορά στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στο δικό μας πειραματικό μοντέλο, η RSG μόνη δεν επηρέασε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό παρά μόνο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των 100 $\mu$ M. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με παλαιότερα δεδομένα από τη βιβλιογραφία, που δηλώνουν πως χρειάζονται υψηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου προκειμένου να μειωθεί κατά 50% ο πολλαπλασιασμός στα HUVEC (315) αλλά και σε άλλες κυτταρικές σειρές (316). Όμως, η συγχορήγηση της RSG με μετρονομικές συγκεντρώσεις VRL είναι πιο αποτελεσματικές και προκαλούν σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού στη συγκέντρωση των 10 $\mu$ M. Αξίζει να

σημειώσουμε πως οι μετρονομικές συγκεντρώσεις της VRL (0,1nM & 1nM) δεν επηρέασαν σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HUVEC. Παρατηρούμε λοιπόν, μια συνεργική δράση των δύο φαρμάκων στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, που μπορεί να επιτευχθεί σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

Οι ενεργοποιητές του PPAR $\gamma$  προκαλούν αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω της απόπτωσης (249). Όμως, η ροσιγλιταζόνη, όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία, φαίνεται πως προστατεύει τα HUVEC από την απόπτωση, σε αντίθεση με τους άλλους ενεργοποιητές του PPAR $\gamma$  (317, 318). Το συμπέρασμα αυτό έρχεται να επιβεβαιώσει και η δική μας μελέτη, όπου καμία από τις συγκεντρώσεις της RSG δεν οδήγησε τα HUVEC σε απόπτωση. Επιπλέον, η RSG αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με αναστολή του κυτταρικού κύκλου (319, 320) στη φάση G1 (cell cycle arrest). Το γεγονός αυτό δεν επιβεβαιώθηκε από τη δική μας εργασία καθώς δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στη συγχορήγηση των μικρότερων συγκεντρώσεων των δύο φαρμάκων. Αντίθετα, κατά τη συγχορήγηση των 10nM VRL με οποιαδήποτε συγκέντρωση RSG, παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη αύξηση των κυττάρων της φάσης G0/G1 και μείωση των κυττάρων της φάσης S γεγονός που θα μπορούσε να υποδηλώσει αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω cell cycle arrest. Τέλος, η συγχορήγηση των μεγαλύτερων συγκεντρώσεων των δυο φαρμάκων προκάλεσε μικρή αύξηση στην απόπτωση, παρόμοια με αυτήν της VRL στην ίδια συγκέντρωση, γεγονός που οφείλεται κυρίως στη κυτταροτοξική δράση της VRL και δευτερευόντως στη προστατευτική δράση της RSG στην απόπτωση.

Εκτός όμως από την αποπτωτική δράση τους, οι ενεργοποιητές του PPAR $\gamma$  διαθέτουν και αντιαγγειογενετική δράση σε μοριακό επίπεδο (250). Αυτή αφορά στην αναστολή παραγωγής αγγειογενετικών κυτταροκινών (251) και επαγωγή της έκφρασης του υποδοχέα CD36 της TSP-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα (252).

Στο δικό μας πειραματικό μοντέλο, η RSG προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη μείωση των προαγγειογενετικών παραγόντων IL-8, COX-2 και VEGF ενώ προκάλεσε αύξηση του VEGFR-2 και του FGF-2 σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν μελέτες με τη ροσιγλιταζόνη που να επιβεβαιώνουν τα συγκεκριμένα αποτελέσματα. Όμως, συγκριτικά με τους υπόλοιπους ενεργοποιητές του PPAR $\gamma$ , φαίνεται πως η δράση της RSG είναι παρόμοια. Συγκεκριμένα, οι θειαζολινεδιόνες μειώνουν τα εκκρινόμενα επίπεδα του VEGF σε διάφορες καρκινικές σειρές (239), ενώ ενδογενείς αλλά και εξωγενείς συνδέτες του PPAR $\gamma$  καταστέλλουν τα επίπεδα της COX-2 και IL-8 (255). Αντίθετα, καμία μελέτη δεν επιβεβαιώνει την αύξηση του υποδοχέα VEGFR2 από τη ροσιγλιταζόνη. Μάλιστα, πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν πως ο ενδογενής προσδέτης-ενεργοποιητής του PPAR $\gamma$ , 15d-PGJ2 μειώνει τα επίπεδα του παραπάνω υποδοχέα στα κύτταρα HUVEC (300). Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δικαιολογεί το γεγονός αυτό στη διαφορετικού βαθμού ενεργοποίηση του PPAR $\gamma$  από τους συνδέτες του. Όσον αφορά στους αντιαγγειογενετικούς παράγοντες, η ροσιγλιταζόνη προκάλεσε σημαντική αύξηση του PPAR $\gamma$  και του CD47 αλλά δεν διαφοροποίησε σημαντικά τα επίπεδα της TSP-1 και CD36, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία (232, 252) όπου οι ενεργοποιητές του PPAR $\gamma$  επάγουν την έκφραση της TSP-1 και του CD36.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον όμως, παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της συγχορήγησης μετρονομικής VRL με τη ροσιγλιταζόνη, τα οποία επηρεάζονται διαφορετικά από το κάθε φάρμακο ανάλογα τη συγκέντρωση. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε τη μεγάλη αύξηση του PPAR $\gamma$  στο συνδυασμό των μεγαλύτερων συγκεντρώσεων των φαρμάκων. Φαίνεται πως η ροσιγλιταζόνη υπερτερεί στην ενεργοποίηση του PPAR $\gamma$  από τη βινορελμπίνη, που σε αυτό το εύρος των συγκεντρώσεων προκαλεί μείωση των επιπέδων του πυρηνικού υποδοχέα. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται για τον υποδοχέα της θρομβοσπονδίνης CD47, αλλά όχι για την ίδια την πρωτεΐνη. Αντίθετα, στους προαγγειογενετικούς παράγοντες φαίνεται πως υπάρχει διαφορετική επίδραση των δύο φαρμάκων αφού στη μεγαλύτερη συγκέντρωση VRL (δεν ανήκει στις μετρονομικές) η ροσιγλιταζόνη δεν καταφέρνει να κρατήσει σε χαμηλά επίπεδα τους VEGF, VEGFR2, IL-8 και COX-2. Η τοξικότητα που προκαλεί η δόση των 10nM VRL είναι αρκετά μεγάλη έτσι ώστε τα κύτταρα εκκρίνουν τους συγκεκριμένους αυξητικούς παράγοντες με αυτοκρινικό τρόπο, προκειμένου να ενισχύσουν τους

μηχανισμούς επιβίωσης. Από την άλλη πλευρά, η συγχορήγηση της ροσιγλιταζόνης με τη μετρονομική VRL διατηρεί, και σε κάποιες περιπτώσεις προκαλεί μικρή μείωση των επιπέδων των αγγειογενετικών παραγόντων, γεγονός που υποδηλώνει τη συνεργική δράση των δυο φαρμάκων.

Συμπερασματικά λοιπόν, η συγχορήγηση μετρονομικών συγκεντρώσεων VRL με κλινικά επιτεύξιμες συγκεντρώσεις ροσιγλιταζόνης μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και να επηρεάζει κατασταλτικά τους μοριακούς μηχανισμούς της αγγειογένεσης. Παρόλα αυτά χρειάζονται επιπλέον πειραματικά δεδομένα που θα διαλευκάνουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια αλλά και θα καθορίσουν τα μόρια-κλειδιά στις διαδικασίες της αγγειογένεσης. Τέλος, η συνεργική δράση των δύο φαρμάκων αφήνει ανοιχτό το δρόμο για περαιτέρω μελέτες μετρονομικής VRL με ενεργοποιητές του PPARγ.

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ❖ Η μετρονομική VRL επηρεάζει σημαντικά μονοπάτια της αγγειογένεσης. Ένα από αυτά, είναι της IL-8, όπου η έκφρασή της καταστέλλεται από τις μετρονομικές συγκεντρώσεις της VRL σε επίπεδο γονιδίου αλλά και πρωτεΐνης. Αντίθετα, υψηλότερες συγκεντρώσεις, κυτταροτοξικές προκαλούν αύξηση της IL-8. Φαίνεται λοιπόν, πως η IL-8 θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό ρυθμιστή και διαμεσολαβητή της αντιαγγειογενετικής δράσης της μετρονομικής VRL.
- ❖ Η μετρονομική VRL διατηρεί σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης και την COX-2, σημαντικό ένζυμο στη διαδικασία της αγγειογένεσης.
- ❖ Η μετρονομική VRL επάγει την έκφραση του πυρηνικού υποδοχέα PPAR $\gamma$  που συμμετέχει σε σημαντικές διαδικασίες της αγγειογένεσης, όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση. Το γεγονός πως η έκφρασή του είναι δόσοεξαρτώμενη και πως οι μεγαλύτερες και πιο τοξικές συγκεντρώσεις καταστέλλουν τα επίπεδά του υποδηλώνει πως ο πυρηνικός υποδοχέας αποτελεί ρυθμιστή της μετρονομικής VRL.
- ❖ Η μετρονομική VRL δεν κατάφερε στο πειραματικό μας μοντέλο να αυξήσει την έκφραση της TSP-1, που παρουσιάζεται ως διαμεσολαβητής της μετρονομικής χημειοθεραπείας στη βιβλιογραφία. Εντούτοις, τα υψηλά βασικά επίπεδα της TSP-1 σε συνδυασμό με την αύξηση του CD36 υποστηρίζουν ως πιθανό τον αντιαγγειογενετικό μηχανισμό δράσης της μετρονομικής VRL.
- ❖ Σημαντικό ρόλο στην μετρονομική VRL παίζει ο μεταγραφικός παράγοντας NF- $\kappa$ B, του οποίου η έκφραση μεταβάλλεται και πιθανώς προκαλεί αλληλεπιδράσεις με την IL-8 και PPAR $\gamma$ . Θα πρέπει όμως να γίνουν επιπλέον μελέτες για να διασαφηνιστούν οι αλληλεπιδράσεις αυτές.

- ❖ Η VRL αποτελεί ιδανικό υποψήφιο φάρμακο για τη μελέτη της μετρονομικής χημειοθεραπείας σε *in vitro* συστήματα, καθώς μπορεί να χορηγηθεί σε μεγάλα χρονικά διαστήματα, διατηρώντας σταθερά τα επίπεδά του χωρίς να συσσωρεύεται στο θρεπτικό υλικό της κυτταροκαλλιέργειας.
- ❖ Οι χαμηλές συγκεντρώσεις της VRL, όταν χρησιμοποιούνται σε μετρονομικά πρωτόκολλα, είναι πολύ αποτελεσματικές στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (IC<sub>50</sub> για τη VRL 1.23 nM).
- ❖ Οι μετρονομικές συγκεντρώσεις της VRL κάτω του 1 nM δεν προκαλούν ούτε αναστολή του κυτταρικού κύκλου ούτε απόπτωση στα ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC.
- ❖ Συγκεντρώσεις VRL μεγαλύτερες από 100 nM, είναι κυτταροτοξικές, προκαλούν G2/M arrest και απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων.
- ❖ Η RSG προκαλεί σημαντική δόσοεξαρτώμενη αύξηση του PPAR $\gamma$ . Η συγχορήγηση της RSG με όλες τις συγκεντρώσεις της VRL βελτίωσε σημαντικά τα επίπεδα του πυρηνικού υποδοχέα, ακόμα και σε αυτές τις συγκεντρώσεις όπου υπήρχε μείωση από τη βινορελμπίνη. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο του PPAR $\gamma$  στη μετρονομική VRL και τη συνεργική δράση των δύο φαρμάκων.
- ❖ Η RSG διαθέτει έμμεσες αντιαγγειογενετικές δράσεις καθώς προκαλεί δόσοεξαρτώμενη μείωση των προαγγειογενετικών παραγόντων IL-8, COX-2 και VEGF.
- ❖ Η συγχορήγηση της RSG με τη μετρονομική VRL διατηρεί, και σε κάποιες περιπτώσεις προκαλεί μικρή μείωση των επιπέδων των αγγειογενετικών παραγόντων, γεγονός που υποδηλώνει τη συνεργική δράση των δυο φαρμάκων.
- ❖ Η συγχορήγηση της RSG με τη μετρονομική VRL σταματά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από ότι τα δυο φάρμακα ξεχωριστά και επάγει μοριακές δράσεις οδηγώντας σε αύξηση της έκφρασης

των αντιαγγειογενετικών παραγόντων και σε καταστολή της έκφρασης των προαγγειογενετικών πρωτεϊνών.

- ❖ Η RSG μόνη της δεν προκαλεί απόπτωση αλλά αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1. Με αυτόν τον μηχανισμό επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αντίθετα, η συγχορήγηση συγκέντρωσης 10nM VRL με τη RSG προκαλεί απόπτωση στα ενδοθηλιακά κύτταρα.
- ❖ Η IL-8 αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της δράσης της μετρονομικής VRL τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Όπως προκύπτει από τη κλινική δοκιμή, η IL-8 αποτελεί προβλεπτικό δείκτη ανταπόκρισης, καθώς τα χαμηλά επίπεδα πριν τη θεραπεία, σχετίζονται με όφελος από τη μετρονομική χημειοθεραπεία.
- ❖ Η μετρονομική χημειοθεραπεία με VRL, όπως προκύπτει από τη παρούσα διδακτορική διατριβή, διαθέτει σημαντικές αντιαγγειογενετικές ιδιότητες, καθώς ασκεί θετική ρύθμιση σε αντιαγγειογενετικούς παράγοντες και αναστέλλει σημαντικούς αγγειογενετικούς παράγοντες. Η ενεργοποίηση του PPAR $\gamma$  ευνοεί τη συγχορήγηση μετρονομικής χημειοθεραπείας με ενεργοποιητές του PPAR $\gamma$  προκειμένου να αποκτήσουμε το μέγιστο αντιαγγειογενετικό αποτέλεσμα. Παρόλα αυτά, χρειάζονται επιπλέον πειραματικά δεδομένα για να διαλευκανθεί πληρέστερα το άγνωστο πεδίο των μοριακών και κυτταρικών επιδράσεων της μετρονομικής χημειοθεραπείας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου βασίζεται στη χορήγηση κυτταροστατικών φαρμάκων σε μέγιστες ανεκτές δόσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα, με στόχο την αναστολή του πολλαπλασιασμού των ταχέως αναπτυσσόμενων καρκινικών κυττάρων. Όμως, εκτός από τη καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, δημιουργούνται φθορές και στα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αρκετών παρενεργειών. Επιπρόσθετα, οι μέχρι τώρα θεραπευτικές επιλογές δεν έχουν προσφέρει σημαντικό κλινικό όφελος στην αντιμετώπιση των περισσότερων τύπων προχωρημένου ή μεταστατικού καρκίνου. Έτσι, η επιστημονική κοινότητα στράφηκε σε νεότερα πεδία έρευνας όπως η αγγειογένεση και η μετρονομική χημειοθεραπεία.

Ο όρος Μετρονομική Χημειοθεραπεία χαρακτηρίζει δοσολογικά σχήματα χημειοθεραπείας σε συχνή, αδιάλειπτη χορήγηση υποδοξικών δόσεων κυτταροστατικών φαρμάκων σε μακροχρόνια βάση. Η στρατηγική αυτή στοχεύει κατά κύριο λόγο στα ενεργοποιημένα, πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων των όγκων παρά στα καρκινικά κύτταρα. Σύμφωνα λοιπόν, με επιστημονικά δεδομένα η μετρονομική χημειοθεραπεία ενεργεί μέσω μηχανισμών αναστολής του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων των όγκων και ρύθμισης της ισορροπίας των αγγειογενετικών παραγόντων.

Σκοπό της παρούσας ερευνητικής διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση της κυτταρικής και μοριακής δράσης της VRL (Navelbine®) επί πολλαπλασιαζόμενων ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων σε σχήματα που προσομοιάζουν με αυτά της μετρονομικής θεραπείας στην κλινική της εφαρμογή. Επίσης, η επίδραση της VRL σε κύριους μηχανισμούς που διέπουν την αγγειογένεση στο παραπάνω *in vitro* μοντέλο αποτέλεσε σημαντικό ερευνητικό στόχο. Επιπλέον στόχοι του ερευνητικού έργου ήταν η μελέτη του ρόλου του υποδοχέα PPAR $\gamma$  στο μοντέλο της *in vitro* μετρονομικής χημειοθεραπείας ενδοθηλιακών κυττάρων, και οι αλλαγές που προκαλεί στο μετρονομικό προφίλ της VRL η συγχορήγηση με ενεργοποιητές του

PPAR $\gamma$  (ροσιγλιταζόνη) ως προς την αναστολή του πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης.

Υλικό της συγκεκριμένης μελέτης αποτέλεσαν τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVEC) που απομονώθηκαν από την ομφαλική φλέβα ομφάλιου λώρου και καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό που περιείχε βινορελμίνη, τον μεταβολίτη ή ροσιγλιταζόνη ή και τον συνδυασμό τους, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0,001nM μέχρι 100μM για 4, 24 και 96 ώρες. Αρχικά, με τη μέθοδο MTS Assay διερευνήθηκε η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και υπολογίστηκε η μεσομέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC<sub>50</sub>). Με την μέθοδο qRT-PCR, ELISA και Western blot μετρήθηκε η γονιδιακή και η πρωτεϊνική έκφραση δεικτών αγγειογένεσης, ενώ με κυτταρομετρία ροής μελετήθηκε η απόπτωση και ο κυτταρικός κύκλος.

Η μετρονομική χορήγηση VRL βρέθηκε σημαντικά πιο δραστική στην αναστολή πολλαπλασιασμού των HUVEC σε σχέση με την βραχεία έκθεση με συγκριτική διαφορά τεσσάρων τάξεων μεγέθους (IC<sub>50</sub>: 1,23nM vs. 32μM). Παρόλα αυτά δεν επηρέασε την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και δεν προκάλεσε απόπτωση των HUVEC. Επιπλέον, σε μετρονομικούς χρόνους και συγκεντρώσεις η VRL έδειξε να επάγει την έκφραση των αγγειοκατασταλτικών γονιδίων PPAR $\gamma$  και CD36 ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει την έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων IL-8 και COX-2. Η IL-8 αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της μετρονομικής VRL *in vitro* αλλά και *in vivo* καθώς τα χαμηλά επίπεδα πριν τη μετρονομική θεραπεία με VRL καθορίζουν τους ασθενείς που θα ωφεληθούν από την συγκεκριμένη θεραπεία.

Η συγχορήγηση της μετρονομικής VRL με τη ροσιγλιταζόνη βρέθηκε να βελτιώνει τα αντιαγγειογενετικά αποτελέσματα, καθώς αυξάνει την έκφραση του PPAR $\gamma$  ακόμα και στις συγκεντρώσεις που προηγουμένως ανέστειλαν την έκφρασή του. Επιπλέον, με τη συγχορήγηση έχουμε διατήρηση των αγγειογενετικών παραγόντων σε βασικά, χαμηλά επίπεδα. Τέλος συνεργική δράση των δυο φαρμάκων παρατηρήθηκε και στην αναστολή του πολλαπλασιασμού.

Συμπερασματικά σε ένα *in vitro* μοντέλο μετρονομικής χημειοθεραπείας η VRL αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και επηρεάζει κατασταλτικά τους μοριακούς μηχανισμούς της αγγειογένεσης με σημαντικότερη

δράση στο μονοπάτι του PPAR $\gamma$  και της IL-8. Η ενεργοποίηση του πυρηνικού υποδοχέα PPAR $\gamma$  από τη μετρονομική χημειοθεραπεία ανοίγει το δρόμο για τη δημιουργία μελετών συγχορήγησης μετρονομικής χημειοθεραπείας με ενεργοποιητές του PPAR $\gamma$ , έτσι ώστε να διερευνηθεί καλύτερα κ εις βάθος ο ρόλος του. Γενικότερα, η μετρονομική χημειοθεραπεία προβάλλει ως μια υποσχόμενη εναλλακτική στη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου, με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Όμως, χρειάζονται ακόμα πολλές μελέτες για να αποκαλυφθούν οι μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτήν.

## SUMMARY

A chemotherapy dosing strategy that attracts growing clinical interest is low dose metronomic chemotherapy. It involves the close, regular administration of conventional chemotherapeutic drugs without prolonged drug free intervals over extended periods of time. In contrast with conventional chemotherapy of maximum tolerated dose (MTD), the primary target of metronomic chemotherapy is thought to be tumor's neovasculature. Angiogenesis, as the pioneer in the field Judah Folkman suggested in one of his latest papers, plays in cancer the role of 'organizing principle' because of its critical role in malignant tumor development. In this context angiogenesis is understood as a tumor supporting process, which is kept up aberrantly active through the influence of counterbalancing proteins that are produced by cancer cells and the microenvironment and drive endothelial cells functional and proliferating. In view of that, antiangiogenic cancer therapy optimally aims to inhibit proliferation and function of activated endothelial cells and thereof tackle cancer progression on a chronic basis. Among different classes of cytotoxics, microtubule disruptors are considered most appropriate for metronomic low-dose antiangiogenic chemotherapy because of their potency to inhibit proliferation and also function of endothelial cells at very low concentrations. Recently, availability of oral formulation of microtubule disrupting vinorelbine (Navelbine Soft Capsules®) led to clinical investigation of this drug at a metronomic dosing schedule [NCT00278070]. In this context we investigated functional and molecular effects of vinorelbine (VRL) against proliferating human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in an experimental in vitro simulation of conventional and metronomic chemotherapy.

In regard to induced changes in angiogenesis signaling genes under the influence of protracted and short exposure to VRL we studied interleukin-8 (IL-8), cyclooxygenase-2 (COX-2), thrombospondin-1 (TSP-1), the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) and the cytoplasmic receptors CD36, and finally the transcription factors NF- $\kappa$ B and HIF-1 $\alpha$ . Also, we studied the antiproliferative and the molecular effects of rosiglitazone in combination with

metronomic vinorelbine on proliferating endothelial cells and investigate the role of PPAR $\gamma$  in the metronomic model.

In this study, we used primary human umbilical cord vein (HUVEC) cells, which were isolated from human umbilical cord veins. HUVECs were plated to sub-confluence in plates coated with collagen and treated with VRL, RSG or the combination for 4, 24 and 96hrs. In the 96hr experiment, to simulate a metronomic dosing schedule we replaced the drug-enriched medium every 24hrs. In contrast, the treatment with VRL for 4hrs with a wash out period with drug-free medium for the consecutive 92hrs, and the 24hr time point simulate the classic schedule of chemotherapy with the Maximum Tolerated Dose (MTD). Initially, with the MTS Assay method we investigated the inhibition of cell proliferation and calculated IC<sub>50</sub>. By qRT-PCR, ELISA and Western blot we measured gene and protein expression of markers of angiogenesis, while with flow cytometry we studied apoptosis and cell cycle of HUVECs.

The metronomic administration of vinorelbine was significantly more active in inhibiting proliferation of HUVEC compared to the short exposure with comparative difference of four orders of magnitude (IC<sub>50</sub>: 1,23nM vs. 32mM). Still, it did not affect cell cycle progression or induced cell apoptosis. Moreover, metronomic vinorelbine was shown to induce the expression of PPAR $\gamma$  and CD36 and inhibit the expression of angiogenic factors such as IL-8 and COX-2.

Co-administration of metronomic vinorelbine with rosiglitazone was found to improve the antiangiogenic effects and increase the expression of PPAR even at concentrations previously inhibited his expression. Furthermore, coadministration of the two drugs conserved angiogenic factors in low, basic levels. Finally, synergistic effect of the two drugs was observed in inhibiting proliferation of the endothelial cells.

In conclusion, metronomic vinorelbine inhibits proliferation of endothelial cells and suppresses molecular mechanisms of angiogenesis, mainly affecting the expression of PPAR $\gamma$  and IL-8 in endothelial cells. IL-8 seems to be a metronomic vinorelbine therapy mediator. The activation of the nuclear receptor PPAR $\gamma$  by metronomic chemotherapy opens the way for the creation of co-administration studies of

metronomic chemotherapy with activators of PPAR $\gamma$  in order to identify his exact role. Generally, the metronomic chemotherapy emerges as a promising alternative in the treatment of cancer, with satisfactory results. However, many studies are still needed to reveal the mechanisms involved in its anticancer actions.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- (2) Skipper HE, Schabel FM, Jr., Wilcox WS. Experimental Evaluation Of Potential Anticancer Agents. XIII. On The Criteria And Kinetics Associated With "Curability" Of Experimental Leukemia. *Cancer Chemother Rep* 1964 Feb;35:1-111.
- (3) Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. *Cell* 1991 Sep 20;66(6):1071-4.
- (4) Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 2005 Jul 14;353(2):172-87.
- (5) Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009 Jul;59(4):225-49.
- (6) Denekamp J, Dasu A, Waites A. Vasculature and microenvironmental gradients: the missing links in novel approaches to cancer therapy? *Adv Enzyme Regul* 1998;38:281-99.
- (7) Ioannidis JP, Pavlidis N. Levels of absolute survival benefit for systemic therapies of advanced cancer. a call for standards. *Eur J Cancer* 2003 Jun;39(9):1194-8.
- (8) Davis AJ, Tannock JF. Repopulation of tumour cells between cycles of chemotherapy: a neglected factor. *Lancet Oncol* 2000 Oct;1:86-93.
- (9) Romiti A, Cox MC, Sarcina I, Di RR, D'Antonio C, Barucca V, et al. Metronomic chemotherapy for cancer treatment: a decade of clinical studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013 Jul;72(1):13-33.
- (10) Gasparini G. Metronomic scheduling: the future of chemotherapy? *Lancet Oncol* 2001 Dec;2(12):733-40.
- (11) 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.
- (12) Kerbel RS. A cancer therapy resistant to resistance. *Nature* 1997 Nov 27;390(6658):335-6.

- (13) Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001 May 17;411(6835):375-9.
- (14) Miller KD, Sweeney CJ, Sledge GW, Jr. Redefining the target: chemotherapeutics as antiangiogenics. *J Clin Oncol* 2001 Feb 15;19(4):1195-206.
- (15) Hayot C, Farinelle S, De DR, Decaestecker C, Darro F, Kiss R, et al. In vitro pharmacological characterizations of the anti-angiogenic and anti-tumor cell migration properties mediated by microtubule-affecting drugs, with special emphasis on the organization of the actin cytoskeleton. *Int J Oncol* 2002 Aug;21(2):417-25.
- (16) Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004 Apr;4(4):253-65.
- (17) Belotti D, Vergani V, Drudis T, Borsotti P, Pitelli MR, Viale G, et al. The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res* 1996 Nov;2(11):1843-9.
- (18) Pasquier E, Carre M, Pourroy B, Camoin L, Rebai O, Briand C, et al. Antiangiogenic activity of paclitaxel is associated with its cytostatic effect, mediated by the initiation but not completion of a mitochondrial apoptotic signaling pathway. *Mol Cancer Ther* 2004 Oct;3(10):1301-10.
- (19) Eichhorn ME, Strieth S, Dellian M. Anti-vascular tumor therapy: recent advances, pitfalls and clinical perspectives. *Drug Resist Updat* 2004 Apr;7(2):125-38.
- (20) Wang J, Lou P, Lesniewski R, Henkin J. Paclitaxel at ultra low concentrations inhibits angiogenesis without affecting cellular microtubule assembly. *Anticancer Drugs* 2003 Jan;14(1):13-9.
- (21) Pourroy B, Honore S, Pasquier E, Bourgarel-Rey V, Kruczynski A, Briand C, et al. Antiangiogenic concentrations of vinflunine increase the interphase microtubule dynamics and decrease the motility of endothelial cells. *Cancer Res* 2006 Mar 15;66(6):3256-63.
- (22) Hotchkiss KA, Ashton AW, Mahmood R, Russell RG, Sparano JA, Schwartz EL. Inhibition of endothelial cell function in vitro and angiogenesis in vivo by docetaxel (Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center. *Mol Cancer Ther* 2002 Nov;1(13):1191-200.
- (23) Liao G, Nagasaki T, Gundersen GG. Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. *J Cell Sci* 1995 Nov;108 ( Pt 11):3473-83.

- (24) Murtagh J, Lu H, Schwartz EL. Taxotere-induced inhibition of human endothelial cell migration is a result of heat shock protein 90 degradation. *Cancer Res* 2006 Aug 15;66(16):8192-9.
- (25) Honore S, Pagano A, Gauthier G, Bourgarel-Rey V, Verdier-Pinard P, Civiletti K, et al. Antiangiogenic vinflunine affects EB1 localization and microtubule targeting to adhesion sites. *Mol Cancer Ther* 2008 Jul;7(7):2080-9.
- (26) Vincent L, Kermani P, Young LM, Cheng J, Zhang F, Shido K, et al. Combretastatin A4 phosphate induces rapid regression of tumor neovessels and growth through interference with vascular endothelial-cadherin signaling. *J Clin Invest* 2005 Nov;115(11):2992-3006.
- (27) Bertolini F, Paul S, Mancuso P, Monestiroli S, Gobbi A, Shaked Y, et al. Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. *Cancer Res* 2003 Aug 1;63(15):4342-6.
- (28) Miller KD, Sweeney CJ, Sledge GW, Jr. Can tumor angiogenesis be inhibited without resistance? *EXS* 2005;(94):95-112.
- (29) Hanahan D, Bergers G, Bergsland E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 2000 Apr;105(8):1045-7.
- (30) Pasquier E, Honore S, Braguer D. Microtubule-targeting agents in angiogenesis: where do we stand? *Drug Resist Updat* 2006 Feb;9(1-2):74-86.
- (31) Kerbel RS. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *Bioessays* 1991 Jan;13(1):31-6.
- (32) Klement G, Baruchel S, Rak J, Man S, Clark K, Hicklin DJ, et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest* 2000 Apr;105(8):R15-R24.
- (33) Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000 Apr 1;60(7):1878-86.
- (34) Pasquier E, Kavallaris M, Andre N. Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions. *Nat Rev Clin Oncol* 2010 Aug;7(8):455-65.
- (35) Larsen NS. Angiogenesis research yields new approaches to cancer treatment and prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1993 Oct 20;85(20):1629-30.

- (36) Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971 Nov 18;285(21):1182-6.
- (37) Cavallo T, Sade R, Folkman J, Cotran RS. Tumor angiogenesis. Rapid induction of endothelial mitoses demonstrated by autoradiography. *J Cell Biol* 1972 Aug;54(2):408-20.
- (38) Hobson B, Denekamp J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer* 1984 Apr;49(4):405-13.
- (39) Bocci G, Nicolaou KC, Kerbel RS. Protracted low-dose effects on human endothelial cell proliferation and survival in vitro reveal a selective antiangiogenic window for various chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 2002 Dec 1;62(23):6938-43.
- (40) Tentori L, Vergati M, Muzi A, Levati L, Ruffini F, Forini O, et al. Generation of an immortalized human endothelial cell line as a model of neovascular proliferating endothelial cells to assess chemosensitivity to anticancer drugs. *Int J Oncol* 2005 Aug;27(2):525-35.
- (41) Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 2002 Sep;30(9):973-81.
- (42) de Bont ES, Guikema JE, Scherpen F, Meeuwssen T, Kamps WA, Vellenga E, et al. Mobilized human CD34+ hematopoietic stem cells enhance tumor growth in a nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mouse model of human non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 2001 Oct 15;61(20):7654-9.
- (43) Bolontrade MF, Zhou RR, Kleinerman ES. Vasculogenesis Plays a Role in the Growth of Ewing's Sarcoma in Vivo. *Clin Cancer Res* 2002 Nov;8(11):3622-7.
- (44) Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer* 2006 Nov;6(11):835-45.
- (45) Nor JE, Christensen J, Liu J, Peters M, Mooney DJ, Strieter RM, et al. Up-Regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth. *Cancer Res* 2001 Mar 1;61(5):2183-8.
- (46) Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Apr 2;99(7):4349-54.

- (47) Lau DH, Xue L, Young LJ, Burke PA, Cheung AT. Paclitaxel (Taxol): an inhibitor of angiogenesis in a highly vascularized transgenic breast cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 1999 Feb;14(1):31-6.
- (48) Avramis IA, Kwock R, Avramis VI. Taxotere and vincristine inhibit the secretion of the angiogenesis inducing vascular endothelial growth factor (VEGF) by wild-type and drug-resistant human leukemia T-cell lines. *Anticancer Res* 2001 Jul;21(4A):2281-6.
- (49) Escuin D, Kline ER, Giannakakou P. Both microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs inhibit hypoxia-inducible factor-1alpha accumulation and activity by disrupting microtubule function. *Cancer Res* 2005 Oct 1;65(19):9021-8.
- (50) Lee K, Qian DZ, Rey S, Wei H, Liu JO, Semenza GL. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Feb 17;106(7):2353-8.
- (51) Kim YJ, Lee HJ, Kim TM, Eisinger-Mathason TS, Zhang AY, Schmidt B, et al. Overcoming evasive resistance from vascular endothelial growth factor a inhibition in sarcomas by genetic or pharmacologic targeting of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Int J Cancer* 2013 Jan 1;132(1):29-41.
- (52) Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med* 2002 Jan;6(1):1-12.
- (53) Bocci G, Francia G, Man S, Lawler J, Kerbel RS. Thrombospondin 1, a mediator of the antiangiogenic effects of low-dose metronomic chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Oct 28;100(22):12917-22.
- (54) Hamano Y, Sugimoto H, Soubasakos MA, Kieran M, Olsen BR, Lawler J, et al. Thrombospondin-1 associated with tumor microenvironment contributes to low-dose cyclophosphamide-mediated endothelial cell apoptosis and tumor growth suppression. *Cancer Res* 2004 Mar 1;64(5):1570-4.
- (55) Damber JE, Vallbo C, Albertsson P, Lennernas B, Norrby K. The anti-tumour effect of low-dose continuous chemotherapy may partly be mediated by thrombospondin. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006 Sep;58(3):354-60.
- (56) Shaked Y, Bertolini F, Man S, Rogers MS, Cervi D, Foutz T, et al. Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis. *Cancer Cell* 2005 Jan;7(1):101-11.
- (57) Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002 Nov;3(11):991-8.

- (58) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- (59) Kosmaczewska A, Ciszak L, Potoczek S, Frydecka I. The significance of Treg cells in defective tumor immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz )* 2008 May;56(3):181-91.
- (60) Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, et al. CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother* 2006 Sep;55(9):1064-71.
- (61) Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 2004 Feb;34(2):336-44.
- (62) Banissi C, Ghiringhelli F, Chen L, Carpentier AF. Treg depletion with a low-dose metronomic temozolomide regimen in a rat glioma model. *Cancer Immunol Immunother* 2009 Oct;58(10):1627-34.
- (63) Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007 May;56(5):641-8.
- (64) Udagawa T. Tumor dormancy of primary and secondary cancers. *APMIS* 2008 Jul;116(7-8):615-28.
- (65) Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003 Jun;3(6):401-10.
- (66) Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004 Dec 15;10(24):8152-62.
- (67) Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 2007 Nov;7(11):834-46.
- (68) Brem S, Brem H, Folkman J, Finkelstein D, Patz A. Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous. *Cancer Res* 1976 Aug;36(8):2807-12.
- (69) Ohtani N, Mann DJ, Hara E. Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging. *Cancer Sci* 2009 May;100(5):792-7.
- (70) Roninson IB. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* 2003 Jun 1;63(11):2705-15.

- (71) Zetterberg A, Larsson O. Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 Aug;82(16):5365-9.
- (72) Coller HA, Sang L, Roberts JM. A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol* 2006 Mar;4(3):e83.
- (73) Schirmacher V. T-cell immunity in the induction and maintenance of a tumour dormant state. *Semin Cancer Biol* 2001 Aug;11(4):285-95.
- (74) Andre N, Pasquier E. Response to 'Intermittent androgen blockade should be regarded as standard therapy in prostate cancer'. *Nat Clin Pract Oncol* 2009 Feb;6(2):E1.
- (75) Goymer P. Natural selection: The evolution of cancer. *Nature* 2008 Aug 28;454(7208):1046-8.
- (76) Perez-Tomas R. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Curr Med Chem* 2006;13(16):1859-76.
- (77) Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 2006 Dec;6(12):924-35.
- (78) Gatenby RA, Silva AS, Gillies RJ, Frieden BR. Adaptive therapy. *Cancer Res* 2009 Jun 1;69(11):4894-903.
- (79) Andre N, Pasquier E. For cancer, seek and destroy or live and let live? *Nature* 2009 Jul 16;460(7253):324.
- (80) Seruga B, Tannock IF. Intermittent androgen blockade should be regarded as standard therapy in prostate cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2008 Oct;5(10):574-6.
- (81) Sabnis GJ, Macedo LF, Goloubeva O, Schayowitz A, Brodie AM. Stopping treatment can reverse acquired resistance to letrozole. *Cancer Res* 2008 Jun 15;68(12):4518-24.
- (82) Kavallaris M, Kuo DY, Burkhart CA, Regl DL, Norris MD, Haber M, et al. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isoforms. *J Clin Invest* 1997 Sep 1;100(5):1282-93.
- (83) Kieran MW, Turner CD, Rubin JB, Chi SN, Zimmerman MA, Chordas C, et al. A feasibility trial of antiangiogenic (metronomic) chemotherapy in pediatric patients with recurrent or progressive cancer. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005 Nov;27(11):573-81.
- (84) Choi LM, Rood B, Kamani N, La FD, Packer RJ, Santi MR, et al. Feasibility of metronomic maintenance chemotherapy following high-dose

chemotherapy for malignant central nervous system tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2008 May;50(5):970-5.

- (85) Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990 Jan 3;82(1):4-6.
- (86) Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996 Aug 9;86(3):353-64.
- (87) Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005 Dec 15;438(7070):932-6.
- (88) Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995 Dec 28;333(26):1757-63.
- (89) Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007 Apr;6(4):273-86.
- (90) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997 Feb 14;275(5302):964-7.
- (91) Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000 Feb 1;95(3):952-8.
- (92) Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003 Mar 11;107(9):1322-8.
- (93) Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999 Jul 15;18(14):3964-72.
- (94) Carmeliet P, Luttun A. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001 Jul;86(1):289-97.
- (95) Rafii S, Heissig B, Hattori K. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther* 2002 May;9(10):631-41.
- (96) Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2009 Oct;19(5):329-37.

- (97) de Castro JG, Puglisi F, de AE, El Saghir NS, Awada A. Angiogenesis and cancer: A cross-talk between basic science and clinical trials (the "do ut des" paradigm). *Crit Rev Oncol Hematol* 2006 Jul;59(1):40-50.
- (98) Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999 Jun 18;284(5422):1994-8.
- (99) Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989 May 4;339(6219):58-61.
- (100) Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992 Jun 5;267(16):10931-4.
- (101) Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010 Feb;10(2):116-29.
- (102) Ori A, Wilkinson MC, Fernig DG. The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges. *Front Biosci* 2008;13:4309-38.
- (103) Moscatelli D, Presta M, Rifkin DB. Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis, and migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 Apr;83(7):2091-5.
- (104) Klein S, Bikfalvi A, Birkenmeier TM, Giancotti FG, Rifkin DB. Integrin regulation by endogenous expression of 18-kDa fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem* 1996 Sep 13;271(37):22583-90.
- (105) Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res* 1992;59:115-65.
- (106) Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I. A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane. *Am J Pathol* 1988 Feb;130(2):393-400.
- (107) Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005 Apr;16(2):159-78.
- (108) Daviet I, Herbert JM, Maffrand JP. Involvement of protein kinase C in the mitogenic and chemotaxis effects of basic fibroblast growth factor on bovine cerebral cortex capillary endothelial cells. *FEBS Lett* 1990 Jan 1;259(2):315-7.
- (109) Czubayko F, Liaudet-Coopman ED, Aigner A, Tuveson AT, Berchem GJ, Wellstein A. A secreted FGF-binding protein can serve as the angiogenic switch in human cancer. *Nat Med* 1997 Oct;3(10):1137-40.

- (110) Wang Y, Becker D. Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. *Nat Med* 1997 Aug;3(8):887-93.
- (111) Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, Abraham JA, Fiddes JC, Gospodarowicz D. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature* 1987 Jan 15;325(6101):257-9.
- (112) Kerbel RS. Therapeutic implications of intrinsic or induced angiogenic growth factor redundancy in tumors revealed. *Cancer Cell* 2005 Oct;8(4):269-71.
- (113) Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002 Oct;2(10):795-803.
- (114) Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 May;7(5):359-71.
- (115) Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006 Mar 10;312(5):549-60.
- (116) Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* 2011 Jul 15;437(2):169-83.
- (117) Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002 Oct;2(10):727-39.
- (118) Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992 Feb;13(1):18-32.
- (119) Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005 Feb 10;23(5):1011-27.
- (120) Kessler T, Fehrmann F, Bieker R, Berdel WE, Mesters RM. Vascular endothelial growth factor and its receptor as drug targets in hematological malignancies. *Curr Drug Targets* 2007 Feb;8(2):257-68.
- (121) Kut C, Mac GF, Popel AS. Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *Br J Cancer* 2007 Oct 8;97(7):978-85.
- (122) 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 Jan 13;281(2):951-61.

- (123) Jubb AM, Oates AJ, Holden S, Koeppen H. Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy. *Nat Rev Cancer* 2006 Aug;6(8):626-35.
- (124) Dallas NA, Fan F, Gray MJ, Van BG, Lim SJ, Xia L, et al. Functional significance of vascular endothelial growth factor receptors on gastrointestinal cancer cells. *Cancer Metastasis Rev* 2007 Dec;26(3-4):433-41.
- (125) Lee TH, Seng S, Sekine M, Hinton C, Fu Y, Avraham HK, et al. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med* 2007 Jun;4(6):e186.
- (126) Bocci G, Man S, Green SK, Francia G, Ebos JM, du Manoir JM, et al. Increased plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) as a surrogate marker for optimal therapeutic dosing of VEGF receptor-2 monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2004 Sep 15;64(18):6616-25.
- (127) Acker T, Plate KH. Role of hypoxia in tumor angiogenesis-molecular and cellular angiogenic crosstalk. *Cell Tissue Res* 2003 Oct;314(1):145-55.
- (128) Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Jun 6;92(12):5510-4.
- (129) Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997 Jan 1;11(1):72-82.
- (130) Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C, et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 2003 Feb;17(2):271-3.
- (131) Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 2001 Apr 20;292(5516):464-8.
- (132) Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 2001 Apr;13(2):167-71.
- (133) Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003 Oct;3(10):721-32.

- (134) Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000 Mar 15;60(6):1541-5.
- (135) Elson DA, Thurston G, Huang LE, Ginzinger DG, McDonald DM, Johnson RS, et al. Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Genes Dev* 2001 Oct 1;15(19):2520-32.
- (136) Calvani M, Rapisarda A, Uranchimeg B, Shoemaker RH, Melillo G. Hypoxic induction of an HIF-1alpha-dependent bFGF autocrine loop drives angiogenesis in human endothelial cells. *Blood* 2006 Apr 1;107(7):2705-12.
- (137) Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002 Jan;2(1):38-47.
- (138) Semenza GL. Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer. *Intern Med* 2002 Feb;41(2):79-83.
- (139) Salcedo R, Resau JH, Halverson D, Hudson EA, Dambach M, Powell D, et al. Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells. *FASEB J* 2000 Oct;14(13):2055-64.
- (140) Li A, Varney ML, Valasek J, Godfrey M, Dave BJ, Singh RK. Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. *Angiogenesis* 2005;8(1):63-71.
- (141) Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol* 2005 Apr;7(2):122-33.
- (142) Xu L, Xie K, Mukaida N, Matsushima K, Fidler IJ. Hypoxia-induced elevation in interleukin-8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 1999 Nov 15;59(22):5822-9.
- (143) Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*. 1991. 253: 1278-1280. *J Immunol* 2009 Sep 1;183(5):2895-7.
- (144) Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2008 Nov 1;14(21):6735-41.

- (145) Cheng GZ, Park S, Shu S, He L, Kong W, Zhang W, et al. Advances of AKT pathway in human oncogenesis and as a target for anti-cancer drug discovery. *Curr Cancer Drug Targets* 2008 Feb;8(1):2-6.
- (146) Luppi F, Longo AM, de Boer WI, Rabe KF, Hiemstra PS. Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung Cancer* 2007 Apr;56(1):25-33.
- (147) Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 2003 Mar 15;170(6):3369-76.
- (148) Brew R, Erikson JS, West DC, Kinsella AR, Slavin J, Christmas SE. Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* 2000 Jan;12(1):78-85.
- (149) Lang K, Niggemann B, Zanker KS, Entschladen F. Signal processing in migrating T24 human bladder carcinoma cells: role of the autocrine interleukin-8 loop. *Int J Cancer* 2002 Jun 10;99(5):673-80.
- (150) Schraufstatter IU, Trieu K, Zhao M, Rose DM, Terkeltaub RA, Burger M. IL-8-mediated cell migration in endothelial cells depends on cathepsin B activity and transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Immunol* 2003 Dec 15;171(12):6714-22.
- (151) Petreaca ML, Yao M, Liu Y, Defea K, Martins-Green M. Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability. *Mol Biol Cell* 2007 Dec;18(12):5014-23.
- (152) Schraufstatter IU, Chung J, Burger M. IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001 Jun;280(6):L1094-L1103.
- (153) Wang D, Richmond A. Nuclear factor-kappa B activation by the CXC chemokine melanoma growth-stimulatory activity/growth-regulated protein involves the MEKK1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2001 Feb 2;276(5):3650-9.
- (154) Wilson C, Purcell C, Seaton A, Oladipo O, Maxwell PJ, O'Sullivan JM, et al. Chemotherapy-induced CXC-chemokine/CXC-chemokine receptor signaling in metastatic prostate cancer cells confers resistance to oxaliplatin through potentiation of nuclear factor-kappaB transcription and evasion of apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2008 Dec;327(3):746-59.
- (155) Seaton A, Scullin P, Maxwell PJ, Wilson C, Pettigrew J, Gallagher R, et al. Interleukin-8 signaling promotes androgen-independent proliferation of

prostate cancer cells via induction of androgen receptor expression and activation. *Carcinogenesis* 2008 Jun;29(6):1148-56.

- (156) Pienta KJ, Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006 Mar 15;12(6):1665-71.
- (157) Matsushima K, Baldwin ET, Mukaida N. Interleukin-8 and MCAF: novel leukocyte recruitment and activating cytokines. *Chem Immunol* 1992;51:236-65.
- (158) Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992 Dec 11;258(5089):1798-801.
- (159) Kamohara H, Takahashi M, Ishiko T, Ogawa M, Baba H. Induction of interleukin-8 (CXCL-8) by tumor necrosis factor-alpha and leukemia inhibitory factor in pancreatic carcinoma cells: Impact of CXCL-8 as an autocrine growth factor. *Int J Oncol* 2007 Sep;31(3):627-32.
- (160) Yao C, Lin Y, Chua MS, Ye CS, Bi J, Li W, et al. Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Int J Cancer* 2007 Nov 1;121(9):1949-57.
- (161) Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol* 1997 Oct;151(4):1105-13.
- (162) Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001 Dec;12(4):375-91.
- (163) Katori M, Majima M. Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflamm Res* 2000 Aug;49(8):367-92.
- (164) Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998 Sep;12(12):1063-73.
- (165) Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996 Dec 27;271(52):33157-60.
- (166) Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem* 1999 Aug 13;274(33):22903-6.

- (167) Murakami M, Matsumoto R, Austen KF, Arm JP. Prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 couple to different transmembrane stimuli to generate prostaglandin D2 in mouse bone marrow-derived mast cells. *J Biol Chem* 1994 Sep 2;269(35):22269-75.
- (168) Cook-Johnson RJ, Demasi M, Cleland LG, Gamble JR, Saint DA, James MJ. Endothelial cell COX-2 expression and activity in hypoxia. *Biochim Biophys Acta* 2006 Dec;1761(12):1443-9.
- (169) Schmedtje JF, Jr., Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1997 Jan 3;272(1):601-8.
- (170) Csiki I, Yanagisawa K, Haruki N, Nadaf S, Morrow JD, Johnson DH, et al. Thioredoxin-1 modulates transcription of cyclooxygenase-2 via hypoxia-inducible factor-1alpha in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006 Jan 1;66(1):143-50.
- (171) Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, et al. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2001 Sep;2(9):544-51.
- (172) Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996 Nov 29;87(5):803-9.
- (173) Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000 Jun 29;342(26):1946-52.
- (174) Brown JR, DuBois RN. Cyclooxygenase as a target in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004 Jun 15;10(12 Pt 2):4266s-9s.
- (175) Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, Frazier ML, Sinicrope FA. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* 1999 Sep 1;59(17):4356-62.
- (176) Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000 Jun;105(11):1589-94.
- (177) Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998 May 29;93(5):705-16.
- (178) Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci* 2003 Feb;24(2):96-102.

- (179) Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006 Oct 30;25(51):6680-4.
- (180) Perkins ND. The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012 Feb;12(2):121-32.
- (181) Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621-63.
- (182) Guan H, Hou S, Ricciardi RP. DNA binding of repressor nuclear factor-kappaB p50/p50 depends on phosphorylation of Ser337 by the protein kinase A catalytic subunit. *J Biol Chem* 2005 Mar 18;280(11):9957-62.
- (183) Li X, Massa PE, Hanidu A, Peet GW, Aro P, Savitt A, et al. IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program. *J Biol Chem* 2002 Nov 22;277(47):45129-40.
- (184) Sizemore N, Lerner N, Dombrowski N, Sakurai H, Stark GR. Distinct roles of the Ikappa B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor kappa B (NF-kappa B) from Ikappa B and in phosphorylating the p65 subunit of NF-kappa B. *J Biol Chem* 2002 Feb 8;277(6):3863-9.
- (185) Sun SC, Xiao G. Deregulation of NF-kappaB and its upstream kinases in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2003 Dec;22(4):405-22.
- (186) Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999 Nov 22;18(49):6938-47.
- (187) McCarty MF, Block KI. Preadministration of high-dose salicylates, suppressors of NF-kappaB activation, may increase the chemosensitivity of many cancers: an example of proapoptotic signal modulation therapy. *Integr Cancer Ther* 2006 Sep;5(3):252-68.
- (188) Takada Y, Murakami A, Aggarwal BB. Zerumbone abolishes NF-kappaB and IkappaBalpha kinase activation leading to suppression of antiapoptotic and metastatic gene expression, upregulation of apoptosis, and downregulation of invasion. *Oncogene* 2005 Oct 20;24(46):6957-69.
- (189) Arlt A, Schafer H. NFkappaB-dependent chemoresistance in solid tumors. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002 Aug;40(8):336-47.
- (190) Yoo HG, Jung SN, Hwang YS, Park JS, Kim MH, Jeong M, et al. Involvement of NF-kappaB and caspases in silibinin-induced apoptosis of endothelial cells. *Int J Mol Med* 2004 Jan;13(1):81-6.

- (191) Karl E, Warner K, Zeitlin B, Kaneko T, Wurtzel L, Jin T, et al. Bcl-2 acts in a proangiogenic signaling pathway through nuclear factor-kappaB and CXC chemokines. *Cancer Res* 2005 Jun 15;65(12):5063-9.
- (192) Lawler JW, Chao FC, Fang PH. Observation of a high molecular weight platelet protein released by thrombin. *Thromb Haemost* 1977 Apr 30;37(2):355-7.
- (193) Chen H, Sottile J, Strickland DK, Mosher DF. Binding and degradation of thrombospondin-1 mediated through heparan sulphate proteoglycans and low-density-lipoprotein receptor-related protein: localization of the functional activity to the trimeric N-terminal heparin-binding region of thrombospondin-1. *Biochem J* 1996 Sep 15;318 ( Pt 3):959-63.
- (194) Calzada MJ, Sipes JM, Kruttsch HC, Yurchenco PD, Annis DS, Mosher DF, et al. Recognition of the N-terminal modules of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 by alpha6beta1 integrin. *J Biol Chem* 2003 Oct 17;278(42):40679-87.
- (195) Lawler J, Hynes RO. The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J Cell Biol* 1986 Nov;103(5):1635-48.
- (196) Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 2000 Jan;6(1):41-8.
- (197) Majluf-Cruz A, Manns JM, Uknis AB, Yang X, Colman RW, Harris RB, et al. Residues F16-G33 and A784-N823 within platelet thrombospondin-1 play a major role in binding human neutrophils: evaluation by two novel binding assays. *J Lab Clin Med* 2000 Oct;136(4):292-302.
- (198) Margosio B, Rusnati M, Bonezzi K, Cordes BL, Annis DS, Urbinati C, et al. Fibroblast growth factor-2 binding to the thrombospondin-1 type III repeats, a novel antiangiogenic domain. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(4):700-9.
- (199) Kosfeld MD, Frazier WA. Identification of a new cell adhesion motif in two homologous peptides from the COOH-terminal cell binding domain of human thrombospondin. *J Biol Chem* 1993 Apr 25;268(12):8808-14.
- (200) Bornstein P. Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *J Cell Commun Signal* 2009 Dec;3(3-4):189-200.
- (201) Greenwalt DE, Watt KW, So OY, Jiواني N. PAS IV, an integral membrane protein of mammary epithelial cells, is related to platelet and endothelial cell CD36 (GP IV). *Biochemistry* 1990 Jul 31;29(30):7054-9.

- (202) Primo L, Ferrandi C, Roca C, Marchio S, di BL, Alessio M, et al. Identification of CD36 molecular features required for its in vitro angiostatic activity. *FASEB J* 2005 Oct;19(12):1713-5.
- (203) Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2001 Sep;108(6):785-91.
- (204) Dawson DW, Volpert OV, Pearce SF, Schneider AJ, Silverstein RL, Henkin J, et al. Three distinct D-amino acid substitutions confer potent antiangiogenic activity on an inactive peptide derived from a thrombospondin-1 type 1 repeat. *Mol Pharmacol* 1999 Feb;55(2):332-8.
- (205) Huang MM, Bolen JB, Barnwell JW, Shattil SJ, Brugge JS. Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Sep 1;88(17):7844-8.
- (206) Reinhold MI, Lindberg FP, Plas D, Reynolds S, Peters MG, Brown EJ. In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *J Cell Sci* 1995 Nov;108 ( Pt 11):3419-25.
- (207) Sick E, Jeanne A, Schneider C, Dedieu S, Takeda K, Martiny L. CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest. *Br J Pharmacol* 2012 Dec;167(7):1415-30.
- (208) Isenberg JS, Ridnour LA, Dimitry J, Frazier WA, Wink DA, Roberts DD. CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1. *J Biol Chem* 2006 Sep 8;281(36):26069-80.
- (209) Liu Y, Merlin D, Burst SL, Pochet M, Madara JL, Parkos CA. The role of CD47 in neutrophil transmigration. Increased rate of migration correlates with increased cell surface expression of CD47. *J Biol Chem* 2001 Oct 26;276(43):40156-66.
- (210) Manna PP, Dimitry J, Oldenborg PA, Frazier WA. CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2005 Aug 19;280(33):29637-44.
- (211) Kaur S, Martin-Manso G, Pendrak ML, Garfield SH, Isenberg JS, Roberts DD. Thrombospondin-1 inhibits VEGF receptor-2 signaling by disrupting its association with CD47. *J Biol Chem* 2010 Dec 10;285(50):38923-32.
- (212) Lopez-Dee Z, Pidcock K, Gutierrez LS. Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation. *Mediators Inflamm* 2011;2011:296069.
- (213) Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, et al. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is

immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Sep;87(17):6624-8.

- (214) Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawler J, Iruela-Arispe ML. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Oct 23;98(22):12485-90.
- (215) Greenaway J, Lawler J, Moorehead R, Bornstein P, Lamarre J, Petrik J. Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). *J Cell Physiol* 2007 Mar;210(3):807-18.
- (216) Zhang X, Kazerounian S, Duquette M, Perruzzi C, Nagy JA, Dvorak HF, et al. Thrombospondin-1 modulates vascular endothelial growth factor activity at the receptor level. *FASEB J* 2009 Oct;23(10):3368-76.
- (217) Ren B, Song K, Parangi S, Jin T, Ye M, Humphreys R, et al. A double hit to kill tumor and endothelial cells by TRAIL and antiangiogenic 3TSR. *Cancer Res* 2009 May 1;69(9):3856-65.
- (218) Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* 2002 Apr;8(4):349-57.
- (219) 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 Nov 1;106(9):3058-61.
- (220) Oganessian A, Armstrong LC, Migliorini MM, Strickland DK, Bornstein P. Thrombospondins use the VLDL receptor and a nonapoptotic pathway to inhibit cell division in microvascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* 2008 Feb;19(2):563-71.
- (221) Yamauchi M, Imajoh-Ohmi S, Shibuya M. Novel antiangiogenic pathway of thrombospondin-1 mediated by suppression of the cell cycle. *Cancer Sci* 2007 Sep;98(9):1491-7.
- (222) Lawler PR, Lawler J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012 May;2(5):a006627.
- (223) Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP. CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 1997 Aug 11;138(3):707-17.

- (224) Short SM, Derrien A, Narsimhan RP, Lawler J, Ingber DE, Zetter BR. Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by beta1 integrins. *J Cell Biol* 2005 Feb 14;168(4):643-53.
- (225) Isenberg JS, Martin-Manso G, Maxhimer JB, Roberts DD. Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies. *Nat Rev Cancer* 2009 Mar;9(3):182-94.
- (226) Duda DG, Fukumura D, Jain RK. Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *Trends Mol Med* 2004 Apr;10(4):143-5.
- (227) Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 1998 Jun 26;93(7):1159-70.
- (228) Schultz-Cherry S, Chen H, Mosher DF, Misenheimer TM, Kruttsch HC, Roberts DD, et al. Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *J Biol Chem* 1995 Mar 31;270(13):7304-10.
- (229) Wight TN, Raugi GJ, Mumby SM, Bornstein P. Light microscopic immunolocalization of thrombospondin in human tissues. *J Histochem Cytochem* 1985 Apr;33(4):295-302.
- (230) Grimbert P, Bouguermouh S, Baba N, Nakajima T, Allakhverdi Z, Braun D, et al. Thrombospondin/CD47 interaction: a pathway to generate regulatory T cells from human CD4+. *J Immunol* 2006 Sep 15;177(6):3534-41.
- (231) Kaipainen A, Kieran MW, Huang S, Butterfield C, Bielenberg D, Mostoslavsky G, et al. PPARalpha deficiency in inflammatory cells suppresses tumor growth. *PLoS One* 2007;2(2):e260.
- (232) Huang H, Campbell SC, Bedford DF, Nelius T, Veliceasa D, Shroff EH, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands improve the antitumor efficacy of thrombospondin peptide ABT510. *Mol Cancer Res* 2004 Oct;2(10):541-50.
- (233) De SD, Nicolaus G, Maiuri MC, Cipolletta D, Galluzzi L, Cinelli MP, et al. NF-kappaB blockade upregulates Bax, TSP-1, and TSP-2 expression in rat granulation tissue. *J Mol Med (Berl)* 2009 May;87(5):481-92.
- (234) Aurora AB, Biyashev D, Mirochnik Y, Zaichuk TA, Sanchez-Martinez C, Renault MA, et al. NF-kappaB balances vascular regression and angiogenesis via chromatin remodeling and NFAT displacement. *Blood* 2010 Jul 22;116(3):475-84.
- (235) Allegrini G, Falcone A, Fioravanti A, Barletta MT, Orlandi P, Loupakakis F, et al. A pharmacokinetic and pharmacodynamic study on metronomic irinotecan

- in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2008 Apr 22;98(8):1312-9.
- (236) Allegrini G, Di DT, Barletta MT, Fioravanti A, Orlandi P, Canu B, et al. Clinical, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluations of metronomic UFT and cyclophosphamide plus celecoxib in patients with advanced refractory gastrointestinal cancers. *Angiogenesis* 2012 Jun;15(2):275-86.
  - (237) Kodama J, Hashimoto I, Seki N, Hongo A, Yoshinouchi M, Okuda H, et al. Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in invasive cervical cancer: correlation with angiogenesis and prognosis. *Clin Cancer Res* 2001 Sep;7(9):2826-31.
  - (238) Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res* 2006 Mar;45(2):120-59.
  - (239) Panigrahy D, Singer S, Shen LQ, Butterfield CE, Freedman DA, Chen EJ, et al. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest* 2002 Oct;110(7):923-32.
  - (240) Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002;53:409-35.
  - (241) Sainis I, Vareli K, Karavasilis V, Briasoulis E. PPARgamma: The Portrait of a Target Ally to Cancer Chemopreventive Agents. *PPAR Res* 2008;2008:436489.
  - (242) Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 1992 Aug 27;358(6389):771-4.
  - (243) Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* 1998 Oct 30;438(1-2):55-60.
  - (244) Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem* 1997 Feb 21;272(8):5128-32.
  - (245) Floyd ZE, Stephens JM. Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes. *J Biol Chem* 2002 Feb 8;277(6):4062-8.

- (246) Burgermeister E, Chuderland D, Hanoch T, Meyer M, Liscovitch M, Seger R. Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol* 2007 Feb;27(3):803-17.
- (247) Martinasso G, Oraldi M, Trombetta A, Maggiora M, Bertetto O, Canuto RA, et al. Involvement of PPARs in Cell Proliferation and Apoptosis in Human Colon Cancer Specimens and in Normal and Cancer Cell Lines. *PPAR Res* 2007;2007:93416.
- (248) Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer* 2004 Jan;4(1):61-70.
- (249) Sun H, Berquin IM, Owens RT, O'Flaherty JT, Edwards IJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated up-regulation of syndecan-1 by n-3 fatty acids promotes apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer Res* 2008 Apr 15;68(8):2912-9.
- (250) Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A, Theocharis S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Ligands: Potential Pharmacological Agents for Targeting the Angiogenesis Signaling Cascade in Cancer. *PPAR Res* 2008;2008:431763.
- (251) Keshamouni VG, Arenberg DA, Reddy RC, Newstead MJ, Anthwal S, Standiford TJ. PPAR-gamma activation inhibits angiogenesis by blocking ELR+CXC chemokine production in non-small cell lung cancer. *Neoplasia* 2005 Mar;7(3):294-301.
- (252) McCarty MF, Barroso-Aranda J, Contreras F. PPAR gamma agonists can be expected to potentiate the efficacy of metronomic chemotherapy through CD36 up-regulation. *Med Hypotheses* 2008;70(2):419-23.
- (253) Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res* 2007 Jul 15;13(14):4042-5.
- (254) Han S, Roman J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: a novel target for cancer therapeutics? *Anticancer Drugs* 2007 Mar;18(3):237-44.
- (255) Hazra S, Peebles KA, Sharma S, Mao JT, Dubinett SM. The Role of PPARgamma in the Cyclooxygenase Pathway in Lung Cancer. *PPAR Res* 2008;2008:790568.
- (256) Kristiansen G, Jacob J, Buckendahl AC, Grutzmann R, Alldinger I, Sipos B, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is highly expressed in pancreatic cancer and is associated with shorter overall survival times. *Clin Cancer Res* 2006 Nov 1;12(21):6444-51.

- (257) Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem* 2001 Apr 13;276(15):12440-8.
- (258) Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995 Dec 1;83(5):813-9.
- (259) Inoue H, Tanabe T, Umesono K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem* 2000 Sep 8;275(36):28028-32.
- (260) Li MY, Deng H, Zhao JM, Dai D, Tan XY. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit cell growth and induce apoptosis in human liver cancer BEL-7402 cells. *World J Gastroenterol* 2003 Aug;9(8):1683-8.
- (261) Bren-Mattison Y, Meyer AM, Van P, V, Li H, Kuhn K, Stearman R, et al. Antitumorigenic effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in non-small-cell lung cancer cells are mediated by suppression of cyclooxygenase-2 via inhibition of nuclear factor-kappaB. *Mol Pharmacol* 2008 Mar;73(3):709-17.
- (262) Yoon EK, Lee WK, Lee JH, Yu SM, Hwang SG, Kim SJ. ERK-1/-2 and p38 kinase oppositely regulate 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandinJ(2)-Induced PPAR-gamma activation that mediates dedifferentiation but not cyclooxygenase-2 expression in articular chondrocytes. *J Korean Med Sci* 2007 Dec;22(6):1015-21.
- (263) Colleoni M, Rocca A, Sandri MT, Zorzino L, Masci G, Nole F, et al. Low-dose oral methotrexate and cyclophosphamide in metastatic breast cancer: antitumor activity and correlation with vascular endothelial growth factor levels. *Ann Oncol* 2002 Jan;13(1):73-80.
- (264) Bottini A, Generali D, Brizzi MP, Fox SB, Bersiga A, Bonardi S, et al. Randomized phase II trial of letrozole and letrozole plus low-dose metronomic oral cyclophosphamide as primary systemic treatment in elderly breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2006 Aug 1;24(22):3623-8.
- (265) Orlando L, Cardillo A, Ghisini R, Rocca A, Balduzzi A, Torrasi R, et al. Trastuzumab in combination with metronomic cyclophosphamide and methotrexate in patients with HER-2 positive metastatic breast cancer. *BMC Cancer* 2006;6:225.
- (266) Dellapasqua S, Bertolini F, Bagnardi V, Campagnoli E, Scarano E, Torrasi R, et al. Metronomic cyclophosphamide and capecitabine combined with

- bevacizumab in advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2008 Oct 20;26(30):4899-905.
- (267) du Manoir JM, Francia G, Man S, Mossoba M, Medin JA, Vilorio-Petit A, et al. Strategies for delaying or treating in vivo acquired resistance to trastuzumab in human breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2006 Feb 1;12(3 Pt 1):904-16.
- (268) Watanabe T, Sano M, Takashima S, Kitaya T, Tokuda Y, Yoshimoto M, et al. Oral uracil and tegafur compared with classic cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil as postoperative chemotherapy in patients with node-negative, high-risk breast cancer: National Surgical Adjuvant Study for Breast Cancer 01 Trial. *J Clin Oncol* 2009 Mar 20;27(9):1368-74.
- (269) Jurado JM, Sanchez A, Pajares B, Perez E, Alonso L, Alba E. Combined oral cyclophosphamide and bevacizumab in heavily pre-treated ovarian cancer. *Clin Transl Oncol* 2008 Sep;10(9):583-6.
- (270) Fontana A, Galli L, Fioravanti A, Orlandi P, Galli C, Landi L, et al. Clinical and pharmacodynamic evaluation of metronomic cyclophosphamide, celecoxib, and dexamethasone in advanced hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009 Aug 1;15(15):4954-62.
- (271) de WO, van de Donk NW, Veth G, Bloem AC, Hagenbeek A, Lokhorst HM. Continuous low-dose cyclophosphamide-prednisone is effective and well tolerated in patients with advanced multiple myeloma. *Neth J Med* 2001 Aug;59(2):50-6.
- (272) Perry JR, Rizek P, Cashman R, Morrison M, Morrison T. Temozolomide rechallenge in recurrent malignant glioma by using a continuous temozolomide schedule: the "rescue" approach. *Cancer* 2008 Oct 15;113(8):2152-7.
- (273) Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Gururangan S, Sampson JH, Sathornsumetee S, et al. Metronomic chemotherapy with daily, oral etoposide plus bevacizumab for recurrent malignant glioma: a phase II study. *Br J Cancer* 2009 Dec 15;101(12):1986-94.
- (274) Young SD, Whissell M, Noble JC, Cano PO, Lopez PG, Germond CJ. Phase II clinical trial results involving treatment with low-dose daily oral cyclophosphamide, weekly vinblastine, and rofecoxib in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2006 May 15;12(10):3092-8.
- (275) Krzyzanowska MK, Tannock IF, Lockwood G, Knox J, Moore M, Bjarnason GA. A phase II trial of continuous low-dose oral cyclophosphamide and celecoxib in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007 Jun;60(1):135-41.

- (276) Herrlinger U, Rieger J, Steinbach JP, Nagele T, Dichgans J, Weller M. UKT-04 trial of continuous metronomic low-dose chemotherapy with methotrexate and cyclophosphamide for recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 2005 Feb;71(3):295-9.
- (277) Kesari S, Schiff D, Doherty L, Gigas DC, Batchelor TT, Muzikansky A, et al. Phase II study of metronomic chemotherapy for recurrent malignant gliomas in adults. *Neuro Oncol* 2007 Jul;9(3):354-63.
- (278) Bhatt RS, Merchan J, Parker R, Wu HK, Zhang L, Seery V, et al. A phase 2 pilot trial of low-dose, continuous infusion, or "metronomic" paclitaxel and oral celecoxib in patients with metastatic melanoma. *Cancer* 2010 Apr 1;116(7):1751-6.
- (279) Andre N, Carre M, Pasquier E. Metronomics: towards personalized chemotherapy? *Nat Rev Clin Oncol* 2014 Jul;11(7):413-31.
- (280) Nannini M, Nobili E, Di CR, Brandi G, Maleddu A, Pantaleo MA, et al. To widen the setting of cancer patients who could benefit from metronomic capecitabine. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009 Jun;64(1):189-93.
- (281) Borne E, Desmedt E, Duhamel A, Mirabel X, Dziwniel V, Maire C, et al. Oral metronomic cyclophosphamide in elderly with metastatic melanoma. *Invest New Drugs* 2010 Oct;28(5):684-9.
- (282) Vogt T, Hafner C, Bross K, Bataille F, Jauch KW, Berand A, et al. Antiangiogenetic therapy with pioglitazone, rofecoxib, and metronomic trofosfamide in patients with advanced malignant vascular tumors. *Cancer* 2003 Nov 15;98(10):2251-6.
- (283) Reichle A, Vogt T. Systems biology: a therapeutic target for tumor therapy. *Cancer Microenviron* 2008 Dec;1(1):159-70.
- (284) Kato H, Ichinose Y, Ohta M, Hata E, Tsubota N, Tada H, et al. A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 2004 Apr 22;350(17):1713-21.
- (285) Briasoulis E, Karavasilis V, Anastasopoulos D, Tzamakou E, Fountzilas G, Rammou D, et al. Weekly docetaxel in minimally pretreated cancer patients: a dose-escalation study focused on feasibility and cumulative toxicity of long-term administration. *Ann Oncol* 1999 Jun;10(6):701-6.
- (286) Briasoulis E, Pentheroudakis G, Karavasilis V, Tzamakou E, Rammou D, Pavlidis N. Weekly paclitaxel combined with pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx<sup>TM</sup>) given every 4 weeks: dose-finding and pharmacokinetic study in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol* 2004 Oct;15(10):1566-73.

- (287) Kakolyris S, Samonis G, Koukourakis M, Vlachonicolis I, Chalkiadakis G, Kalbakis K, et al. Treatment of non-small-cell lung cancer with prolonged oral etoposide. *Am J Clin Oncol* 1998 Oct;21(5):505-8.
- (288) Briasoulis E, Pappas P, Puozzo C, Tolis C, Fountzilas G, Dafni U, et al. Dose-ranging study of metronomic oral vinorelbine in patients with advanced refractory cancer. *Clin Cancer Res* 2009 Oct 15;15(20):6454-61.
- (289) Marty M, Fumoleau P, Adenis A, Rousseau Y, Merrouche Y, Robinet G, et al. Oral vinorelbine pharmacokinetics and absolute bioavailability study in patients with solid tumors. *Ann Oncol* 2001 Nov;12(11):1643-9.
- (290) Puozzo C, Gridelli C. Non-small-cell lung cancer in elderly patients: influence of age on vinorelbine oral pharmacokinetics. *Clin Lung Cancer* 2004 Jan;5(4):237-42.
- (291) de GJ, van Heugen JC, Zorza G, Fahy J, Puozzo C. Metabolism pathway of vinorelbine (Navelbine) in human: characterisation of the metabolites by HPLC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 2008 May 12;47(1):47-58.
- (292) Briasoulis E, Aravantinos G, Kouvatseas G, Pappas P, Biziota E, Sainis I, et al. Dose selection trial of metronomic oral vinorelbine monotherapy in patients with metastatic cancer: a hellenic cooperative oncology group clinical translational study. *BMC Cancer* 2013 May 29;13(1):263.
- (293) Pallis AG, Chandrinos V, Pavlakou G, Xenidis N, Varthalitis I, Vardakis N, et al. A multicenter phase I trial of metronomic oral vinorelbine plus cisplatin in patients with NSCLC. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011 Jun;67(6):1239-45.
- (294) Saloustros E, Kalbakis K, Vardakis N, Kalykaki A, Milaki G, Rovithi M, et al. Metronomic vinorelbine plus bevacizumab as salvage therapy for patients with metastatic breast cancer. *J BUON* 2011 Apr;16(2):215-8.
- (295) Masferrer JL, Koki A, Seibert K. COX-2 inhibitors. A new class of antiangiogenic agents. *Ann N Y Acad Sci* 1999;889:84-6.
- (296) Ma L, Francia G, Vilorio-Petit A, Hicklin DJ, du MJ, Rak J, et al. In vitro procoagulant activity induced in endothelial cells by chemotherapy and antiangiogenic drug combinations: modulation by lower-dose chemotherapy. *Cancer Res* 2005 Jun 15;65(12):5365-73.
- (297) Pappas P, Biziota E, Marselos M, Briasoulis E. Evaluation of antiproliferative and molecular effects of vinorelbine and its active metabolite 4-Odeacetyl-vinorelbine on human endothelial cells in an in vitro simulation model of metronomic chemotherapy. *European Journal Of Cancer* 2008;6:138-9 . 2008.

- (298) Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 2001 Oct 12;276(41):37731-4.
- (299) Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, et al. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 1998 Oct 2;273(40):25573-80.
- (300) Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1999 Mar 26;274(13):9116-21.
- (301) Hau P, Kunz-Schughart L, Bogdahn U, Baumgart U, Hirschmann B, Weimann E, et al. Low-dose chemotherapy in combination with COX-2 inhibitors and PPAR-gamma agonists in recurrent high-grade gliomas - a phase II study. *Oncology* 2007;73(1-2):21-5.
- (302) Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973 Nov;52(11):2745-56.
- (303) Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc* 2007;2(3):481-5.
- (304) Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M, Burnett JP, Jr. The Vinca Alkaloids: A New Class Of Oncolytic Agents. *Cancer Res* 1963 Sep;23:1390-427.
- (305) De Vita VT-Hellman S.- Rosenberg SA. *Cancer.Principles and practice of oncology*. 1993.
- (306) Sfikas A, Batsi C, Tselikou E, Vartholomatos G, Monokrousos N, Pappas P, et al. The canonical NF-kappaB pathway differentially protects normal and human tumor cells from ROS-induced DNA damage. *Cell Signal* 2012 Nov;24(11):2007-23.
- (307) Karlsson JO, Ostwald K, Kabjorn C, Andersson M. A method for protein assay in Laemmli buffer. *Anal Biochem* 1994 May 15;219(1):144-6.
- (308) Lee YS, Choi I, Ning Y, Kim NY, Khatchadourian V, Yang D, et al. Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in the tumour microenvironment promote colon cancer growth, progression and metastasis. *Br J Cancer* 2012 May 22;106(11):1833-41.
- (309) Kontopodis E, Hatzidaki D, Varthalitis I, Kentepozidis N, Giassas S, Pantazopoulos N, et al. A phase II study of metronomic oral vinorelbine

administered in the second line and beyond in non-small cell lung cancer (NSCLC): a phase II study of the Hellenic Oncology Research Group. *J Chemother* 2013 Feb;25(1):49-55.

- (310) Honore S, Pasquier E, Braguer D. Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2005 Dec;62(24):3039-56.
- (311) Vacca A, Iurlaro M, Ribatti D, Minischetti M, Nico B, Ria R, et al. Antiangiogenesis is produced by nontoxic doses of vinblastine. *Blood* 1999 Dec 15;94(12):4143-55.
- (312) Kale S, Raja R, Thorat D, Soundararajan G, Patil TV, Kundu GC. Osteopontin signaling upregulates cyclooxygenase-2 expression in tumor-associated macrophages leading to enhanced angiogenesis and melanoma growth via alpha9beta1 integrin. *Oncogene* 2014 May 1;33(18):2295-306.
- (313) Kaplan J, Cook JA, O'Connor M, Zingarelli B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required for the inhibitory effect of ciglitazone but not 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 on the NFkappaB pathway in human endothelial cells. *Shock* 2007 Dec;28(6):722-6.
- (314) Tsai KL, Chiu TH, Tsai MH, Chen HY, Ou HC. Vinorelbine-induced oxidative injury in human endothelial cells mediated by AMPK/PKC/NADPH/NF-kappaB pathways. *Cell Biochem Biophys* 2012 Apr;62(3):467-79.
- (315) Erl W, Weber C, Zerneck A, Neuzil J, Vosseler CA, Kim HJ, et al. Cyclopentenone prostaglandins induce endothelial cell apoptosis independent of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Eur J Immunol* 2004 Jan;34(1):241-50.
- (316) Liu Y, Dai B, Fu L, Jia J, Mei C. Rosiglitazone inhibits cell proliferation by inducing G1 cell cycle arrest and apoptosis in ADPKD cyst-lining epithelia cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010 Jun;106(6):523-30.
- (317) Artwohl M, Holzenbein T, Furnsinn C, Freudenthaler A, Huttary N, Waldhausl WK, et al. Thiazolidinediones inhibit apoptosis and heat shock protein 60 expression in human vascular endothelial cells. *Thromb Haemost* 2005 May;93(5):810-5.
- (318) Wu J, Lei MX, Xie XY, Liu L, She YM, Mo J, et al. Rosiglitazone inhibits high glucose-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells through the PI3K/Akt/eNOS pathway. *Can J Physiol Pharmacol* 2009 Jul;87(7):549-55.
- (319) Bonofiglio D, Aquila S, Catalano S, Gabriele S, Belmonte M, Middea E, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activates p53 gene promoter binding to the nuclear factor-kappaB sequence in human MCF7 breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2006 Dec;20(12):3083-92.

- (320) Sheu WH, Ou HC, Chou FP, Lin TM, Yang CH. Rosiglitazone inhibits endothelial proliferation and angiogenesis. Life Sci 2006 Feb 23;78(13):1520-8.