

Academiejaar 2012 - 2013

Simmondsines: angiogeneseremmers bekomen uit planten

Merijn RYCKX

Promotor: Prof. Dr. Tom Boterberg

Scriptie voorgedragen in de 2^{de} Master in het kader van de opleiding

MASTER OF MEDICINE IN DE GENEESKUNDE

“De auteur en de promotor geven de toelating dit afstudeerwerk voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit dit afstudeerwerk.”

Datum

(handtekening)

Naam (student)

(promotor)

Voorwoord

Het oorspronkelijk doel van deze masterproef was het opzetten van in vitro en in vivo experimenten in samenwerking met mijn medestudent Ann-Sophie de Craemer. Met haar en onder toezicht van Astrid Foubert, een doctoraatstudent farmaceutische wetenschappen, heb ik in het eerste trimester van de 1^e master enkele experimenten meegevolgd en uitgevoerd. Door een Erasmus in 2^e master is de focus hierna volledig verlegd naar de literatuurstudie.

Graag zou ik in het bijzonder volgende mensen willen bedanken, voor hun bijdrage aan deze masterproef:

Prof. Dr. Tom Boterberg voor de ondersteuning en antwoorden op al mijn vragen.

Astrid Foubert voor het geduldig uitleggen en aanleren van de experimenten.

Ann-Sophie De Craemer voor de vlotte samenwerking en uitwisseling van ideeën

Hilde van Raemdonck voor het nalezen en corrigeren

Inhoudstafel

I. Abstract	1
II. Inleiding	2
1. Simmondsines	2
2. Angiogenese.....	3
3. Angiogeneseremmers.....	5
III. Methodologie	7
1. Literatuuronderzoek simmondsines	7
2. Literatuuronderzoek angiogenese en angiogeneseremming	7
IV. Resultaten	8
1. Simmondsines.....	8
1.1. Het mechanisme van het anorexigeeffect.....	8
1.2. Toxiciteit	10
1.3. Effecten op voortplanting en teratogeniciteit	11
1.4. Verschillen tussen de simmondsinederivaten	13
1.5. Invloed op angiogenese.....	14
2. Angiogenese	20
2.1. Mechanismen van bloedvatvorming	20
2.1.1. Sprouting angiogenese: ‘vertakkende angiogenese’	20
2.1.1.1. Loslating van proteasen uit geactiveerde endotheelcellen en degradatie van de basale membraan, vrijmaken van endotheelcellen.....	21
2.1.1.1.1. De proteolytische afbraak van de basale membraan	22
2.1.1.1.2. Het losmaken van de wandcellen	23
2.1.1.1.3. De complementaire rol van VEGF en angiopoietines:.....	23
2.1.1.2. Laterale inhibitie selecteert de tip-cel en VEGF en DLL4/Notch geven feedback als een vertakkingspatroon generator	24
2.1.1.3. Tip-cel begeleiding.....	26
2.1.1.4. Endotheliale stalk-cel vorming, controle van het stalk-cel gedrag en elongatie	27

2.1.1.5.	Fusie en doorbloeding van bloedvatvertakkingen	28
2.1.1.6.	Bloedvatmaturing, stabilizatie en rust.....	28
2.1.1.6.1.	Rekrutering van murale cellen	29
2.1.1.6.2.	Vorming van celjuncties:	30
2.1.2.	Intussusceptie	30
2.1.3.	Lus angiogene	31
2.1.4.	Endotheel voorlopercellen en hematopoietische stamcellen uit het beenmerg 32	
2.1.5.	Vasculaire nabootsing	33
2.1.6.	Vasculaire co-optie.....	33
2.2.	De rol van angiogenese bij tumoren	34
2.2.1.	Verschillen met fysiologische angiogenese	35
2.2.2.	Gevolgen	37
2.2.2.1.	Therapie	37
2.2.2.2.	Tumorprogressie	37
2.2.2.3.	Angiogeneseremmers en normalisatie van de bloedvaten.....	38
3.	Angiogeneseremmers.....	40
3.1.	Inhibitoren van groeifactoren: VEGF, FGF2	40
3.2.	Inhibitoren van de receptoren van de angiogenetische factoren.....	42
3.3.	Thalidomide en analogen.....	44
3.4.	Inhibitoren van de PI3K/AKT/mTOR signaalweg	45
3.5.	Inhibitoren remodellering van extracellulaire matrix	46
3.6.	Inhibitoren celadhesiemoleculen	46
3.7.	MAPK-farnesyltransferase, Rho- en Ras-inhibitoren.....	46
3.8.	De HIF-sigtaalweg en bindingspartners	47
V.	Discussie.....	49
1.	Simmondsines	49
1.1.	Anorexigene en toxische effecten.....	49
1.2.	Effecten op voortplanting en angiogenese.....	50
2.	Angiogenese en inhibitoren	53
2.1.	Angiogenese	53
2.2.	Angiogeneseremmers	53
2.3.	Conclusie	57

VI. Referentielijst.....	58
---------------------------------	-----------

VII. Bijlagen.....	1
---------------------------	----------

Bijlage 1: Samenstelling van het jojobazaad	1
---	---

Bijlage 2: Experimenten	4
-------------------------------	---

Bijlage 3: Afkortingen	6
------------------------------	---

I. Abstract

Het vormen van een functioneel en geïntegreerd bloedvatnetwerk is noodzakelijk voor homeostase in ons lichaam. De vorming van dit netwerk is afhankelijk van een uitgebalanceerde aanwezigheid van groeifactoren die op een gecoördineerde manier samenwerken. Het belangrijkste proces is de vertakkende angiogenese, maar daarnaast zijn er ook andere mechanismen om bloedvaten te vormen. Deze zijn minder goed bestudeerd maar de kennis over deze processen breidt snel uit.

Met de kennis over deze moleculaire signaalwegen is in het laatste decennium een nieuwe groep geneesmiddelen ontwikkeld, de angiogeneseremmers. Voorlopig is hun gebruik beperkt tot specifieke groepen van patiënten en meestal in combinatie met bestaande chemo- en radiotherapie. Bekende voorbeelden zijn de VEGF-inhibitor bevacizumab en de RTK-inhibitoren sunitinib en sorafenib. De groeiende kennis over het angiogenetisch proces en de toenemende ervaring in de praktijk zou in de toekomst moeten leiden tot een betere toepassing en resultaten van de angiogeneseremmers. Onder andere de identificatie van biologische merkers is noodzakelijk voor de adequate selectie van patiëntengroepen.

Het vooropgestelde doel van deze masterproef is hoofdzakelijk een literatuuronderzoek naar de angiogeneseremmende effecten van simmondsines en hun eventuele toekomstige rol als therapie. Hun anorexigene eigenschappen zijn duidelijk aangetoond. Recent werden ook de angiogeneseremmende effecten bewezen met in vitro en in vivo experimenten. Deze effecten zijn vergelijkbaar met deze van gekende angiogeneseremmers. De kennis over simmondsines en hun effecten staat echter nog in haar kinderschoenen en verder onderzoek is nodig. Hierbij is het gebruik van meer gecompliceerde en beter bij de kliniek aanleunende testmodellen noodzakelijk.

II. Inleiding

1. Simmondsines

Simmondsines zijn niet-cyanogene glycosiden die worden verkregen uit de zaden van de jojobaplant, de *simmondsia chinensis*. Deze plant groeit van nature in de Sonorawoestijn in het Zuid-Westen van de VS (Arizona, California) en in Mexico. Ze wordt echter ook gecultiveerd in streken in het Midden-Oosten en Latijns-Amerika. Zijn geneeskrachtige eigenschappen waren al lang gekend bij de indianen van de Sonorawoestijn. Zij gebruikten plantextracten onder andere in een zalfachtige vorm voor voeding en herstel van huid en haar (1). Deze plant is vooral gekend omwille van de jojoba-olie, chemisch gezien eigenlijk een vloeibare was. Deze was wordt geëxtraheerd uit haar zaden, bevat een rijkdom aan antioxidantia en fytoosterolen en wordt gebruikt in cosmetica, lubricantia en shampoo.

Het product dat overblijft na deze olieproductie kent men onder de term ‘ontvet jojobameel’. Het ontvette jojobameel bevat ongeveer 30 % eiwit (2, 3), voornamelijk albumines (79%) en globulines (21%) (4). Dit meel bevat ook voor ongeveer 15% een bepaalde groep glycosiden, gekend als simmondsines (5). In deze groep heeft men acht glycosiden geïdentificeerd, met name ‘simmondsine’ (2-(cyanomethyleen)-3-hydroxy-4,5-dimethoxycyclohexyl β -D-glycoside) en zeven simmondsinederivaten. (zie bijlage 1: ‘samenstelling van de jojobazaden’)(6). Wanneer dit meel wordt gebruikt als diervoeder wordt een daling van de voedselinname en een hieraan gerelateerde gewichtsdaling geobserveerd bij verschillende diersoorten. Deze anorexigene effecten zijn uitgebreid onderzocht en bewezen bij ratten. Het zijn de simmondsines aanwezig in jojobameel die dit anorexigene effect uitoefenen(7). Het eerste deel van het literatuuronderzoek in deze masterproef gaat over de anorexigene en toxische effecten van jojobameel en simmondsines.

Recent werden ook anti-angiogene eigenschappen toegeschreven aan de simmondsines. Deze molecule zou dus kunnen leiden tot de ontwikkeling van een nieuwe behandeling voor aandoeningen met een ontregelde angiogenese. Hoe ver staat men in het onderzoek naar de anti-angiogene eigenschappen van simmondsines en zouden deze in de toekomst gebruikt

kunnen worden als medicatie? In deze masterproef wordt getracht de beperkte info hierover samen te vatten.

2. Angiogenese

De literatuur over de fysiologische en pathologische vormen van angiogenese is daarentegen zeer uitgebreid. In deze masterproef wordt het angiogeneseproces uitgebreid beschreven en wordt specifiek ingegaan op de neo-angiogenese van tumoren.

Bloedvaten spelen een cruciale rol in ons lichaam. Zonder bloedvaten is er geen adequate zuurstof- en voedselvoorziening en kunnen afvalstoffen niet afgevoerd worden. Ze vormen een complex netwerk over het gehele lichaam en hun vorming staat onder controle van een sterk gereguleerd en gecoördineerd proces.

Vorming van nieuwe bloedvaten is vanzelfsprekend noodzakelijk bij de embryonale ontwikkeling en groei maar blijft ook daarna van belang bij wondheling en in het vrouwelijke voortplantingssysteem. Met name bij de ovulatie, de vorming van het corpus luteum en endometrium na menstruatie, de implantatie van de blastocyst en de verdere ontwikkeling ervan.

Bij de vorming van bloedvaten maakt men het onderscheid tussen vasculogenese en angiogenese. *Vasculogenese* is ‘de novo’ vorming van bloedvaten door hematopoietische stamcellen en endotheelprecursorcellen (angioblasten) afkomstig van het mesoderm. De dorsale aorta en de cardinale venen bij het embryo worden op deze manier gevormd. Bij dit proces prolifereren, migreren en differentiëren precursorcellen uit het mesoderm tot angioblasten. Vervolgens gaan de angioblasten aggregeren, verlengen en vormen ze koordachtige structuren. Deze geïsoleerde vasculaire segmenten gaan zich organiseren in capillair-achtige netwerken (8). Endothelisatie en lumenvorming maken deel uit van dit proces. De vaten zijn initieel nog vrij van gladde spiercellen, pericyten en andere geassocieerde cellen (9).

Het proces van vasculogenese blijft zowel bij de embryologische ontwikkeling als bij de volwassene behouden. Vasculogenese ligt bij het embryo aan de basis van de vorming van de initiële vasculatuur in de ontwikkelende organen. De theorie dat bloedvatvorming bij volwassen beperkt is tot angiogenese werd recent gecounterd. Ook bij volwassenen speelt vasculogenese een rol in de (neo)vascularisatie. Verder onderzoek is echter nodig om te

bepalen wat het belang is van vasculogenese. Is zijn bijdrage eerder beperkt of daarentegen onontbeerlijk?

Vasculogenese is dus verantwoordelijk voor de vorming van de eerste, primitieve vaten in het embryo. Later in de ontwikkeling verloopt zowel de fysiologische als pathologische bloedvatgroei voornamelijk via het proces van *angiogenese* (10). Angiogenese is de vorming van nieuwe bloedvaten uit endotheel van bestaande bloedvaten. De capillaire plexus breidt uit door proliferatie, migratie en vertakking van endotheelcellen, voornamelijk door het mechanisme van vertakkende angiogenese. Dit is belangrijk voor het ontwikkelen van een hiërarchisch netwerk.

Het angiogeneseproces wordt gestart wanneer cellen in zones met weinig of geen bloedvaten een lage zuurstofspanning aanvoelen. Deze respons wordt gemedieerd door de hypoxiegeïnduceerde factor-1 α (HIF-1 α). De activiteit van HIF's wordt geregeld door zuurstofgevoelige sensoren, enzymen met een prolyl-hydroxylase domein (PHD1,2,3). Bij een normale zuurstofspanning gebruiken deze enzymen zuurstof om HIF te hydroxyleren wat leidt tot de proteolytische afbraak ervan. Bij hypoxie worden de zuurstofsensoren inactief en ontsnappen de HIF's aan proteolytische afbraak. Zo kan deze transcriptiefactor bij hypoxie een bepaalde groep genen tot expressie brengen. De belangrijkste zijn de pro-angiogene vasculaire endotheliale groeifactor (VEGF), fibroblast groeifactor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor (IGF), transforming growth factor (TGF- β), angiopoietines (Ang), tumor necrosis factor α (TNF- α) en verschillende chemokines. VEGF werkt meer selectief in op endotheelcellen dan de andere moleculen en is de belangrijkste schakel in de vroege fase van zowel de fysiologische als de pathologische angiogenese (11).

Het angiogenetisch proces is complex en kent een uitgebreide interactie tussen endotheelcellen, omgevende cellen, componenten van de extracellulaire matrix en oplosbare factoren (groeifactoren, chemokines, angiogene enzymen en adhesiemoleculen). Deze interacties dienen strikt gereguleerd te worden in tijd en locatie.

Een ontregelde bloedvatvorming kan leiden tot verscheidene aandoeningen. Voorbeelden zijn onder andere reumatoïde artritis, diabetische retinopathie, psoriasis en juveniele hemangiomen (12). Ook bij tumoren zijn de groei en uitzaaiing afhankelijk van angiogenese. Net zoals normale weefsels heeft een tumor een uitgebreid bloedvatnetwerk nodig om in

zuurstof en voedingstoffen te voorzien. Bovendien voorzien deze nieuwe intratumorale bloedvaten een weg voor tumorcellen om de bloedsomloop te bereiken en te metastaseren.

Na de vorming van het bloedvatnetwerk tijdens de embryologische ontwikkeling zijn de endotheelcellen volledig gedifferentieerd en blijft het merendeel in de G₀-fase van de celcyclus(11). Endotheelcellen zijn bij de langstlevende cellen in ons lichaam met een turnover van jaren en een lage proliferatiegraad vergeleken met vele andere cellen in het lichaam (8). Uitzonderingen zijn wondheling en de vrouwelijke voortplantingscyclus waarbij de angiogene processen tijdelijk actief worden. Deze tijdelijke activatie van angiogenese verschilt duidelijk met de angiogenese in het tumorweefsel waarin een ‘angiogene switch’ plaatsvindt. Deze laatste leidt niet tot een tijdelijke maar tot een continue stimulatie van de angiogenese (13).

De best gekende prototypes van angiogenese-inductoren en –inhibitoren bij tumoren zijn respectievelijk VEGFA en thrombospondine-1 (TSP-1) (13). Het VEGFA-gen is betrokken bij het proces van bloedvatvorming tijdens embryonale en postnatale ontwikkeling, daarna bij de homeostatische overleving van endotheelcellen en bij de volwassene zowel in fysiologische als pathologische situaties van angiogenese (13). Zijn genexpressie kan zowel door de hypoxie in de tumor als door oncogenen opgereguleerd worden en bovendien kunnen VEGF en gerelateerde groeifactoren ook vrijkomen bij de afbraak van de extracellulaire matrix. TSP-1 is een belangrijke inhibitor van de angiogene switch. Zijn productie wordt onder andere deels geregeld door het gen p53 (12). Andere voorbeelden van endogene angiogeneseremmers zijn fragmenten van plasmine (angiostatine) en van type 18 collageen (endostatine). Studies suggereren dat dergelijke endogene angiogeneseremmers onder normale omstandigheden werken als regulatoren van de tijdelijke, fysiologische angiogenese bij remodelering van weefsel en bij wondheling. Zij zouden ook werken als intrinsieke barrières tegen de inductie of persistentie van angiogenese bij beginnende neoplasieën (13).

3. Angiogeneseremmers

Een snel groeiende en voortdurend delende tumorvasculatuur kan men beschouwen als een potentieel doelwit in de behandeling van kanker omdat deze behandeling in theorie weinig invloed zal hebben op de gezonde, niet-delende bloedvaten. Bovendien verschillen de tumorale bloedvaten sterk van de normale bloedvaten. Door de continue stimulans tot bloedvatvorming en een onevenwichtige mengeling van voornamelijk pro-angiogene factoren

zijn de vaten vaak slecht gevormd. Tumorvasculatuur wordt gekenmerkt door vroegtijdige capillaire aftakking, gedraaide en overmatige vertakkingen, misvormde en gedilateerde vaten, een verstoorde bloedflow, microhemorragiën, lekken en een abnormale graad van endotheelcelproliferatie en apoptose.

Judah Folkman was in 1971 de eerste die de strategie voorstelde om de tumor af te sluiten van zijn bloedvoorziening (14). Deze publicatie lag aan de oorsprong van het onderzoek naar hypoxie en angiogenese en de rol hiervan bij tumoren. Ondertussen zijn er een aantal angiogeneseremmers beschikbaar op de markt. De belangrijkste angiogeneseremmers worden besproken in het laatste onderdeel van deze masterproef. Er wordt getracht de link te leggen met de moleculen en signaalwegen die men momenteel als cruciaal beschouwt in het angiogeneseproces.

III. Methodologie

1. Literatuuronderzoek simmondsines

Pubmed en Web of Science werden doorzocht met de termen 'simmondsin' en/of 'jojoba'. De term 'Simmondsin' leverde in Web of Science 73 en in Pubmed 20 zoekresultaten op. De term 'jojoba' leverde in Web of Science 744 en in Pubmed 127 resultaten op. Deze studies behandelden echter voornamelijk de extractiemethoden van de zaden en het gebruik van de olie. Volgende onderwerpen werden uit de selectie van artikels geweerd: artikels in verband met de extractie en bewerking van de zaden, artikels die enkel handelden over cholecystokinine (CCK) en artikels over de jojoba-olie. Na selectie werden 35 artikels behouden over simmondsines en zijn effecten. Deze behandelden hoofdzakelijk de anorexigene effecten met daarnaast ook toxische, reproductieve, hematologische en teratogene effecten.

Verder werd ook een rapport verkregen uit 2008 van A. D'Oosterlynck en S. Raes 'The effect of simmondsin derivatives' waarin onderzoek naar angiogenesremming wordt beschreven.

2. Literatuuronderzoek angiogenese en angiogeneseremming

Er werd gestart met het beschrijven van het angiogenetisch proces. Hiervoor werd op Pubmed en Web of Science gezocht naar recente reviews op vlak van angiogenese. Met de Mesh termen 'Angiogenesis inhibitors' AND 'neoplasias' AND 'neovascularization, pathologic' werden 517 reviews gevonden van de laatste 5 jaar. De studies over specifieke tumoren en therapieën werden geweerd en de algemene reviews over fysiologische en pathologische angiogenese werden geselecteerd. Vanuit de beschrijving van het angiogeneseprocess werd de link gelegd naar de angiogeneseremmers. Voor de stoffen die vernoemd werden in overzichtsstudies werd telkens een onderzoek gedaan naar de recentste studies in verband met de ziekte types waarbij ze gebruikt worden en wat hun plaats er momenteel bij is. Daarnaast werd opgezocht voor welke indicaties hun gebruik is goedgekeurd door de 'food and drug administration'(FDA) in de VS en door het Europees medisch agentschap (EMA).

IV. Resultaten

1. Simmondsines

1.1. Het mechanisme van het anorexigene effect

Het mechanisme van het anorexigene effect van jojobameel werd reeds uitgebreid onderzocht. Om te bewijzen dat jojobameel verzadiging induceert, onderzocht men in 1995 de invloed van vasten op het anorexigene effect van voedsel waaraan jojobameel werd toegevoegd in concentraties van 3%, 5% en 10%. Als de anorexigene componenten van het jojobameel werken via verzadiging, zal de voedselinname minder dalen bij vastende ratten in vergelijking met niet-vastende ratten. Dit verschil tussen beide groepen mag niet aanwezig zijn bij toediening van voedsel met het bittere kinine HCl. Dit is een aversieve factor in tegenstelling tot een verzadigende factor. De resultaten toonden een significant sterkere reductie van voedselinname aan bij de niet-vastende ratten dan bij de vastende ratten. Dit suggereerde een verzadigend effect van ontvet jojobameel (3).

Het verzadigend effect zou (deels) werken via een indirecte interactie met het CCK_A-systeem(15). Flo et al (16) stelden de hypothese dat simmondsines inwerken op de proximale darm, dat ze via die weg de productie en vrijstelling van CCK stimuleren om zo de voedselinname te verminderen. Bij een vergelijking van simmondsine en CCK werd bewezen dat de fysiologische effecten van chronische toediening van simmondsine identiek zijn aan deze gezien bij chronische toediening van CCK. Simmondsine werkt in op het endogene CCK-systeem (16). De inhibitie van voedselinname door dimethylsimmondsine is een gevolg van CCK-stimulatie, wat leidt tot een stimulans van de trypsine productie van de pancreas. Ten gevolge daarvan is de proteolytische degradatie van eiwitten verhoogd en dit veroorzaakt een signaal van verzadiging in de hersenen (17). Dit werd ook bewezen in een studie met devazepine, een CCK_A-receptor-antagonist die het anorexigene effect van CCK in ratten en muizen inhibeert. Devazepine heft het verzadigend effect van simmondsines op (18). Obese ratten zijn gevoeliger voor het effect van CCK en dit verklaart de sterkere daling van de voedselinname door simmondsine bij obese ratten in vergelijking met magere ratten (19).

Verder werd ook een interferentie van simmondsine met schildklierhormonen beschreven wat kan leiden tot een verhoogd energiegebruik (20).

Cokelaere et al gingen dieper in op de eventuele rol van de nervus vagus bij het effect van simmondsines. Een vagotomie reduceerde het effect van simmondsines. Samen met de eerdere onderzoeksresultaten kwam men tot de conclusie dat CCK-receptoren aanwezig op de nervus vagus betrokken zijn bij het anorexigene effect (21).

Een studie van York et al uit 2000 toonde tegenstrijdige resultaten (22). Lorglumide, een CCK-receptor antagonist, blokkeerde het effect van simmondsine niet. Nochtans was de concentratie lorglumide hoog genoeg om het effect van CCK zelf te blokkeren. Na vagotomisatie met capsaïcine vond men ook geen verschil in voedselinname. Men kon de resultaten van andere studies dus niet bevestigen, eventuele redenen hiervoor werden niet vermeld.

In 2003 deed men een onderzoek naar het effect van simmondsines op maaltijdpatronen en keuzegedrag bij ratten (23). Dat er een ander effect moest zijn naast het smaakeffect werd al aangetoond door het feit dat simmondsine de voedselinname ook reduceert na intragastrische intubatie of intraperitoneale injectie (24). Men toonde opnieuw aan dat bij het eerste contact de activiteit van simmondsines analoog werkte met de verzadigende molecule CCK. De voedselinname daalde opnieuw meer bij hongerige, vastende ratten dan bij niet-vastende. Men bewees echter ook dat het anorexigene effect niet enkel werd veroorzaakt door de inductie van verzadiging, maar ook door een aversieve component in het toegediende voedsel. Dit werd aangetoond door het krachtiger effect van de simmondsines bij een tweede blootstelling en met een proef genaamd 'geconditioneerde aversie van voedsel' (CTA). Deze geconditioneerde afkeer van het voedsel wordt veroorzaakt door het eten van voedsel dat nausea of overgeven induceert en is een ingebouwd verdedigingsmechanisme tegen giftig voedsel.

Deze resultaten werden in 2009 bevestigd door Cokelaere et al (25). Simmondsines oefenen hun actie uit door het induceren van verzadiging maar ook door het induceren van abnormale fysiologische effecten, onder andere een onwel gevoel. Dit effect werd aangetoond door onderzoek naar gedragsveranderingen tijdens en na de maaltijd. Voedsel gesupplementeerd met simmondsine werd vergeleken met kinine, een bitter smakende stof, en lithiumchloride (LiCl), een inductor van een onwel gevoel. Waarschijnlijk faciliteren simmondsines een klein natuurlijk proces van verzadiging bij het eerste contact maar creëren ze abnormale

fysiologische effecten resulterend in aversieve reacties vanaf het 2^e contact. Het belang van smaak en aversie stijgt dus naarmate er eerder al blootstelling is geweest.

In 1993 werd het anorexigeeffect van 10% jobameel eveneens bewezen bij jonge kippen (26) en in 1998 evalueerde men het effect van een dieet met 8% jobameel (equivalent van 0.5% simmondsine) op voedselinname en verzadiging bij de hond. Men toonde een reductie van de voedselinname aan maar men kon het verzadigende effect niet aantonen. Men achtte het waarschijnlijker dat een aangeleerde aversie het primair onderliggend mechanisme is voor de daling van de voedselinname bij de honden (27). In 2000 werd de daling van de voedselinname door voedsel met jobameel (8.1%) bij honden opnieuw bewezen. Men observeerde ook een lichte gewichtsdaling die werd toegeschreven aan een daling van de voedselinname maar ook aan een slechtere vertering. Men vermoedt door een hogere secretie van pancreasenzymen, wat overeenkomt met de CCK-hypothese, of door een eventuele rol van het schildklierhormoon en onder andere zijn effect op de vetafbraak(28).

1.2. Toxiciteit

Al in 1974 werd door Booth et al (7) simmondsine aangewezen als toxische factor in jobameel. Benzylcyanidederivaten uit de -CN groep van simmondsines werden als oorzaak van de toxiciteit aangewezen. Dit werd later weerlegd, CN- wordt niet vrijgesteld bij vertering na orale toediening of andere toedieningswegen (29). Ook van andere componenten aanwezig in de jobaperskoek zoals fytinezuur en trypsine-inhiberende polyfenolen (voornamelijk bestaande uit derivaten van paracoumarinezuur) vermoedde men dat ze toxisch waren. Een extractiemethode van deze componenten is gepatenteerd door D'Oosterlynck (17).

In 1992 onderzochten Cokelaere et al (29) de mogelijke toxische bijwerkingen van simmondsines bij toediening aan ratten. Hier werd aangetoond dat bij gematigde dosis simmondsines deze toxiciteit niet kan bewezen worden. Een toediening van 250 mg simmondsine/kg lichaamsgewicht gedurende 5 dagen had geen toxische invloed op lever, pancreas of nieren. Anatomopathologisch onderzoek van verschillende orgaansystemen, onder andere ook teelballen en zaadblaasjes, toonden evenmin pathologische veranderingen.

In een onderzoek van York et al (22) in 2000 werd wel een toxisch effect aangetoond bij ratten bij een chronische toediening van simmondsines in een concentratie van 0.5% in het voedsel. Bij de dode ratten waren de lever en nier verkleind, de stolling was vertraagd en er

was een significante depressie van het beenmerg met ernstige anemie. Dit ging in tegen de resultaten van Cokelaere et al (20) uit 1995. Dat experiment duurde echter maar 28 dagen, terwijl de eerste rat in dit experiment pas op dag 38 doodging. Men kon een eventuele contaminatie van de simmondsines met een ander toxisch element uit jojobameel echter niet uitsluiten. Verder vond men een negatief effect op de hematopoïese van witte en rode bloedcellen, zelfs bij lage, niet-therapeutische dosissen. De consumptie van simmondsines was gerelateerd aan dood, aan falen van bloedstolling, aan een significante depressie van activiteit van het rode beenmerg en van de lymfoïde follikels in de milt, en aan de aanwezigheid van eiwitcilinders in de renale tubuli. Door dit onderzoek ontstond opnieuw bezorgdheid over de mogelijke toxiciteit van simmondsines.

In 2000 onderzocht men verder de hematologische en pathologische effecten van 0.25% gezuiverd simmondsine in groeiende ratten. Na een toediening van simmondsines gedurende 20 weken werd een lichte maar statistische significante, macrocytaire, normochrome anemie vastgesteld die volledig reversibel was. Het gewicht van de interne organen was licht verhoogd maar na stoppen van toediening bleek ook dit reversibel, met uitzondering van de nier die iets zwaarder bleef. Verder vond men geen microscopische of biochemische tekens van toxiciteit (30).

In 2006 werd dit verder onderzocht (2). Men herhaalde de experimenten uit 2000 (22) en breidde deze uit van 4 naar 8 weken. Bovendien deed men nog een extra, 16 weken durend, experiment met obese ratten om de omkeerbaarheid van de effecten van simmondsines te onderzoeken. Het doel van de studie was het bepalen van een aanvaardbare dosis van het anorexigene simmondsine. Zowel bij een concentratie van 0.15% als 0.25% in het voedsel reduceerde simmondsine significant de inname van voedsel en daalde het gewicht van de proefdieren zonder significante bijwerkingen. Bij hogere dosissen dan de therapeutisch toonde men een schadelijk effect aan op de witte en rode bloedcellen. Dit was reversibel maar men heeft verder onderzoek nodig naar deze hematologische effecten gedurende een lange periode. De resultaten van het eerder onderzoek van York et al (22) werden weerlegd.

1.3. Effecten op voortplanting en teratogeniciteit

In 1993 werd door Cokelaere et al (31) het effect op de vruchtbaarheid onderzocht door ratten gedurende elf weken een dieet gesupplementeerd met 3% ontvet jojobameel te geven. Na paring werd dit dieet nog twee weken voortgezet tot de 15^e dag van de zwangerschap. In de

ratten gevoed met jojobameel werd een daling in het aantal corpora lutea en levende foeti vastgesteld. Dit stelde men ook vast in de groep ratten die exact dezelfde hoeveelheid voedsel kreeg toegediend als de ratten gevoed met jojobameel. Dit effect werd dus toegeschreven aan de gedaalde voedselinname in de weken voor de zwangerschap. Bij de groep gevoed met jojobameel werd eveneens een significante daling vastgesteld van het foetale lichaamsgewicht. Dit werd toegeschreven aan een eiwittekort gedurende de zwangerschap met een gerelateerde daling van progestagenen en een stijging van de schildklierhormonen(T3).

In 1998 werd het effect op voortplanting verder onderzocht (32). Hierbij vergeleek men het effect van ontvet jojobameel (3%) met een equivalente hoeveelheid pure simmondsine (0.15%). Het effect van beide op de reductie van voedselinname bleek vergelijkbaar en de groeisnelheid was vergelijkbaar met gelijkmatig gevoede groep. De proefdieren uit het experiment werden verder opgedeeld in een groep gevoed uitsluitend vóór conceptie tegenover een groep met voortzetting van de supplementen tijdens de zwangerschap. Bij de groep met een 8 weken durende toediening voor conceptie stelde men een daling vast van het aantal corpora lutea zoals in eerdere studies. Dit werd gecorreleerd met het lagere gewicht van de moeder op het moment van de paring. De andere voortplantingsparameters vertoonden geen afwijkingen. Bij voortzetting van de toediening tussen de 1^e en de 16^e dag van de zwangerschap induceerde men een vertraagde foetale groei, samenhangend met de lage beschikbaarheid van eiwitten. Dit relatief eiwittekort zou veroorzaakt worden door een hyperstimulatie van de pancreas. Dit veroorzaakt een bijkomstig verlies van pancreatische enzymen in een proefdier dat al weinig voedsel inneemt. Er werd geen effect op de corpora lutea vastgesteld.

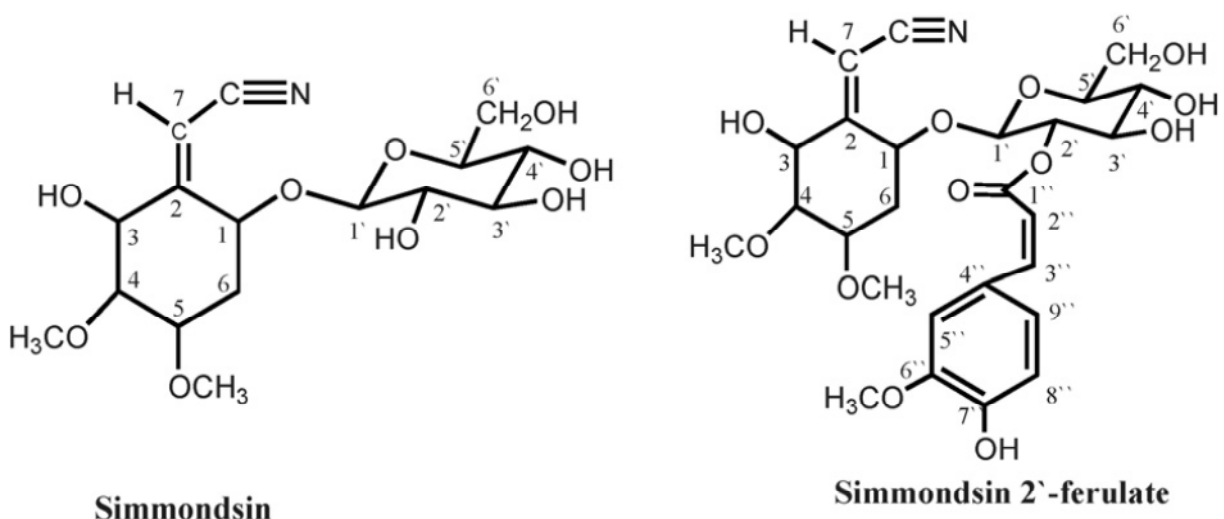
In hetzelfde jaar 1998 werd door Vermaert et al (33) een negatief effect van jojobameel op de ontwikkeling van de eileider in gevogelte ontdekt. Dit ging in tegen het onderzoek van Cokelaere et al (31) uit 1993. In 2000 voerden Cokelaere et al (32) een nieuwe studie uit in verband met de teratogeniciteit. In het eerste deel van het experiment werden de eerdere resultaten bevestigd van het onderzoek uit 1998. Men stelde een daling van het foetale en placentaire gewicht vast die niet volledig te verklaren was door een daling in de voedselinname want in de groep gevoed met jojobameel was de daling groter dan in de groep die de dezelfde hoeveelheid voedsel kreeg. Het achterliggend mechanisme zou een stijging van de concentratie schildklierhormoon zijn. Dit ten gevolge van een daling van de

beschikbaarheid van eiwitten door stimulatie van pancreasenzymen (31, 32). Een andere mogelijke verklaring was het hoger gemiddeld aantal jongen in deze groep. Ook werd gezocht naar de oorzaak van het lager geboortegewicht. Is dit een lager geboortegewicht zonder bijkomstige afwijkingen of bestaat er een teratogeen effect met afwijkingen in de embryonale ontwikkeling? Hiervoor werd de skeletossificatie bepaald. Men vond geen bijkomstige vertraging van de skeletossificatie bij de groep gevoed met jjobalmeel in vergelijking met de groep die evenveel voedsel werd toegediend. Er werd dus geen teratogeen effect aangetoond (34).

In een onderzoek bij jonge kippen werd opnieuw aangetoond dat jjobameel geen onomkeerbaar schadelijk effect heeft op hergroei van de eileiders van volwassen legkippen. Dit in tegenstelling tot groeiende jonge kippen waarbij wel een onomkeerbare verstoring van de ontwikkeling van de eileider werd veroorzaakt en deze kippen geen eieren begonnen te leggen. Dit werd toegeschreven aan factoren in het jjobameel die op dat moment nog ongekend waren(35).

1.4. Verschillen tussen de simmondsinederivaten

In 1998 werd onderzoek gedaan naar het verschil in effect tussen de simmondsinederivaten aanwezig in jjobameel.



Figuur 1: Chemische structuur van glycosiden uit de *simmondsia chinensis* (36)

Van simmondsine was het dosisafhankelijk effect op de voedselinname al beschreven. Uit deze studie kwam naar voor dat simmondsine 2'-transferulaat ook een dosisafhankelijke daling van de voedselinname induceert, maar minder duidelijk dan simmondsine. 4-

demethylsimmondsine en 4,5-didemethylsimmondsine hadden geen anorexigene eigenschappen, evenmin als de metaboliëten hydroxymethoxyphenylacetonitriet (HMPA) en simmondsine-amide (SA). Hieruit werd besloten dat beide methoxy- en de cyanidegroepen vereist zijn voor het anorexigene effect (37).

1.5. Invloed op angiogenese

Een zeer uitgebreid en interessant rapport uit 2008 van D'Oosterlynck en Raes behandelt naast de anorexigene eigenschappen ook de angiogeneseremmende eigenschappen van simmondsines (17). Dit samengesteld rapport beschrijft onderzoeken uitgevoerd aan de universiteiten van Gent en Leiden en beschrijft in 3 rapporten de onderzoeken uitgevoerd door het labo van D'Oosterlynck.

In Gent werd een 'chorioallantoic membrane assay' (CAM-test: zie bijlage 2) uitgevoerd met een polair extract van gezuiverd ontvet jjobameel en met de belangrijkste component hiervan, gezuiverd dimethylsimmondsine. In bijlage 1 worden de componenten van het jjobameel beschreven. Het polair extract is een mengeling van de verschillende simmondsinecomponenten uit de jjobaplant en wordt verkregen door deze componenten uit het jjobameel te extraheren door middel van een polair solvent. Deze twee teststoffen werden vergeleken met een positieve (VEGF) en negatieve (Dulbecco's Modified Eagle Medium of DMEM) controle en met een bestaande angiogenese inhibitor, tangeretine. De resultaten van de CAM-testen met het polair extract en met het gezuiverd dimethylsimmondsine verschilden niet significant van het resultaat met DMEM. Ze verschilden wel significant met de met VEGF behandelde CAM's en hun effect was vergelijkbaar met dat van tangeretine, een bekende angiogenese inhibitor. Het totale extract had hierbij een krachtiger effect dan het gezuiverde simmondsine. Dit kan komen door een synergistisch effect van de verschillende moleculen en/of omdat het totale extract nog andere, krachtigere stoffen bevat. Men concludeerde dat beide toegediende stoffen de angiogene effecten van VEGF inhiberen (17).

In Leiden onderzocht men de mogelijke inhibitie van VEGF-geïnduceerde proliferatie van vasculaire endotheelcellen, een belangrijke stap in het angiogeneseprocess. Hiervoor gebruikte men 'human umbilical vein endothelial cells' (HUVEC) en mat men de incorporatie van ³H-thymidine. Men gebruikte het totale polaire extract en ook enkele specifieke simmondsinederivaten. Uit het onderzoek bleek dat dimethylsimmondsine niet de

belangrijkste component was voor de biologische anti-angiogene activiteit van het totale polaire extract. Desmethyl- en didesmethylsimmondsine remden de VEGF-geïnduceerde proliferatie veel sterker. In tegenstelling tot dimethylsimmondsines had dimethylsimmondsineferulaat wel een vergelijkbaar krachtig effect. Een vergelijkbaar experiment werd uitgevoerd door D'Oosterlynck et al. VEGF-geïnduceerde proliferatie van HUVEC werd gemeten door middel van ^3H -thymidine incorporatie. Men testte hierbij opnieuw zowel het totaal polair extract als verscheidene specifieke componenten. Een hoge concentratie van de testcomponenten (2-5%) veroorzaakte celdood van de HUVEC. De cellen kwamen los van de kweekplaten en de ^3H -thymidine incorporatie was beperkt. Bij een lagere concentratie zag men geen celdood, wel een inhibitie van de VEGF-geïnduceerd HUVEC proliferatie en dit op een concentratie-afhankelijk manier. Zuiver dimethylsimmondsine had als enige testcomponent geen effect op de geïnduceerde proliferatie.

In een Leidens experiment werd de inhibitie van bFGF-geïnduceerde celproliferatie gemeten door middel van celtelling in plaats van ^3H -thymidine incorporatie. Opnieuw gebruikte men HUVEC en werden het totale polaire extract en enkele specifieke simmondsinederivaten getest. Bij inductie van proliferatie zullen de eenlagig geschikte endotheelcellen prolifereren tot 100% vulling van het beschikbare oppervlak en daarna stoppen met prolifereren door contactinhibitie.

De bFGF-geïnduceerde proliferatie van 15% confluenta monolagen van endotheelcellen (dit stelt endotheelcellen voor die de ruimte en de mogelijkheid hebben om te prolifereren en migreren bij een angiogene stimulatie) werd geïnhibeerd door de jobacomponenten. Dit op een manier vergelijkbaar met de inhibitie door de gekende tyrosinekinase inhibitor Tyr A47. De werkingsmechanismes van beide stoffen zijn niet noodzakelijk identiek. De 100% confluenta monolagen van endotheelcellen (dit stelt endotheelcellen in rust voor die niet meer de mogelijkheid hebben om te prolifereren) vertoonden geen significante mortaliteit en hieruit concludeerde men dat de geteste componenten niet cytotoxisch waren. Dit waren het totaal polair extract, een partieel gezuiverd extract met alle componenten zonder hun ferulaten, dimethylsimmondsine en dimethylsimmondsineferulaat. Een partieel gezuiverde fractie (+/- 65%) die voornamelijk simmondsineferulaten bevatte vertoonde wel cytotoxiciteit tegenover de bFGF-gestimuleerde HUVEC onder de gebruikte concentratie (17). In een tweede rapport van D'Oosterlynck et al beschrijft men eveneens het effect van de verschillende simmondsinecomponenten op 15%, en op 100 % confluenta monolagen van endotheelcellen. Men zag een complete inhibitie van de endotheelcelproliferatie bij een langdurige incubatie

met het totale polaire extract, met partieel gezuiverde simmondsines (zonder ferulaten), met een mix van ferulaten (+/- 65%) en met gezuiverd dimethylsimmondsine. Een korte incubatie toonde de cytotoxiciteit aan van de mengeling van ferulaten wat overeenkomt met het onderzoek uit Leiden.

Het totale polaire extract werd verder onderzocht en hierbij zag men een inhibitie van de endotheelcelproliferatie bij een concentratie van 1 %. Deze concentratie inhibeerde ook de bFGF-geïnduceerde bloedvatgroei in matrigelkamers geïmplanteerd in muizen. Matrigel is een mengeling van eiwitten van de extracellulaire matrix en van de basale membraan en wordt verkregen uit sarcoma van de muis. Deze matrix is rijk aan angiogene groeifactoren en dus geschikt voor onderzoek naar angiogeneseremmers (38). In dit experiment werden de kamers, gevuld met matrigel en bFGF, onderhuids ingeplant in beide flanken van de muis. Na 14 dagen werden de implanten verwijderd en werd de bloedvatvorming onderzocht. Men zag een grotere bloedvatgroei bij de controlemuizen dan bij de testgroep die oraal jobameel kreeg toegediend.

Met 3D-fibrinematrices onderzocht men de mogelijke inhibitie van tubevorming door endotheelcellen. Een 3D-fibrinmatrix bestaat uit verschillende lagen fibrinmatrix met daartussen endotheelcellen. Deze matrix laat proliferatie en migratie toe van de endotheelcellen zowel in het horizontale als in het verticale vlak en zo wordt een 3D-netwerk van endotheelbuizen gevormd. Deze test probeert de in vivo situatie zo goed mogelijk na te bootsen. De analyse van de driedimensionale tubevorming is echter moeilijk (38). Bij dit onderzoek gebruikte men humane microvasculaire endotheelcellen (hMVEC). De tubevorming werd geïnhibeerd door zowel het totaal polair extract als door de pure gezuiverde simmondsinecomponenten en dit op een concentratieafhankelijke manier. De sterkste inhibitoren waren desmethylsimmondsine en een mix van simmondsineferulaten (17).

De in vitro angiogenese in een 3D-matrix van hMVEC werd ook onderzocht door D'Oosterlynck et al. Na stimulatie door VEGF en TNF α , een pro-inflammatoire molecule beginnen de hMVEC de matrix binnen te dringen en capillairachtige structuren te vormen. Een hoge concentratie van de testcomponenten (zowel totaal polair extract als de pure gezuiverde simmondsinecomponenten) gaf hier wederom celdood en een lage concentratie inhibeerde de VEGF/TNF α -geïnduceerde tubevorming. Een mix van simmondsineferulaten, gezuiverd +/- 87%, had het meest potente effect maar het concentratievenster waarin een duidelijk effect werd gezien was klein.

In een vierde experiment in Leiden werd gebruikt gemaakt van foetale metatarsalen als ex vivo angiogenese-test. Bij deze test bekijkt men de uitgroei van angiogene bloedvaten van metatarsalen van een muisfoetus. Men testte hierbij het totale polaire extract, gezuiverd 4-desmethylsimmondsine, gezuiverd 5-desmethylsimmondsine en een partieel gezuiverd fractie met voornamelijk de ferulaten. Het totale polair extract was hierbij effectiever in het inhiberen van angiogenese dan marimastat, een MMP inhibitor. Het werkingsmechanisme van beide is echter niet noodzakelijk hetzelfde. Bij de andere 3 testgroepen die werden getest in een concentratie gelijk aan de concentratie in het totale polair extract, werd evenmin neovascularisatie aangetoond, maar de fibroblastmatrix rond de botstructuren was opgelost en het botweefsel was losgemaakt. Hun inhiberend effect lijkt dus minder krachtig te zijn.

Bij muizen werd ook de invloed van simmondsines op de ontwikkeling van ingespoten tumorcellen onderzocht. Men injecteerde deze hiervoor subcutaan met MCF-7/6 borstkankercellen in een matrigel. Een controlegroep van 10 muizen kreeg standaard knaagdiervoedsel, de testgroep van 10 muizen hetzelfde voedsel vermengd met 2.7% ontvet jobameel. De testgroep had een significant lagere gewichtsstijging en een lager tumorvolume in de eerste 2 weken. Na week 3 werden de volumes gelijk of zelfs groter dan in de controlegroep.

Deze opmerkelijke resultaten werden toegeschreven aan de volgende factoren. (i) De muizen waren nog in de groeifase waardoor zowel de anorexigene als de angiogenese-inhiberende eigenschappen van simmondsines de groei konden verstoren. (ii) Verder was het hormonale systeem van de muizen verstoord door een priming in het begin van het experiment met 1 mg estradiol en (iii) de inoculatie met humane kankercellen in genetische gemanipuleerde muizen (immunodeficiënte, naakte nu/nu muis) zou niet relevant zijn om de vergelijking te maken met angiogenese-inhiberende effecten van simmondsines op een natuurlijk ontwikkelende kanker bij mensen of dieren. Men concludeerde dat het ontwikkelingspatroon van de tumoren tussen beide groepen alleszins duidelijk verschilde. Meer onderzoek is nodig met een verbetering van de methoden, onder andere door het uitvoeren van het experiment met volwassen dieren (17).

D'Oosterlynck et al beschrijft ook een experiment met matrigel angioreactors ingeplant bij muizen. Deze angioreactors werden gevuld met een oplossing bestaande uit matrigel, bFGF en heparine. Ze werden ingeplant in de flank van de muis voor 14 dagen en daarna onderzocht. De muizen werden gevoed met een reeks diëten gesupplementeerd met

verschillende simmondsinecomponenten vanaf 14 dagen voor de implantatie tot het einde van het experiment. Men voerde 2 experimenten uit om de effecten van simmondsines te evalueren. In het eerste experiment werd bFGF gebruikt om bloedvatgroei te induceren in angioreactors gevuld met matrigel. Hierbij werden Tie2-GFP muizen gebruikt. Hun endotheelcellen brengen een groen fluorescerend proteïne (GFP) tot expressie in het bloedvat samen met Tie2. De hoeveelheid GFP kan gebruikt worden om de hoeveelheid bloedvaten te kwantificeren. Men zag een duidelijke daling van de bloedvatgroei bij voeding gesupplementeerd met het complete jojobameel of met het angiogenese-inhiberende simmondsine. Bij directe toediening in de angioreactors van didesmethylsimmondsine zag men geen inhibitie van bloedvatgroei wat wijst op een omzetting tot een actieve metabooliet tijdens de opname.

In het tweede experiment deed men een onderzoek naar het effect op de tumor-geïnduceerde angiogenese. De syngene SMF borstkanker cellijn werd gebruikt om tumorvorming te induceren in de melklijst van de muis. Tijdens de groei van de tumor werden eveneens angioreactors geplaatst in de flanken zodat zowel de tumor geïnduceerde bloedvatgroei (GFP in muis) als de bFGF-geïnduceerde bloedvatgroei in de matrigel werd gezien. Hierbij zag men geen effect van de angiogenese-inhiberende simmondsines op de tumorgroei of op de bloedvatgroei. Evenmin vond men een effect op de bFGF-geïnduceerde bloedvatvorming in de angioreactors.

Mogelijke redenen hiervoor kunnen zijn: (i) een daling van de activiteit van de simmondsines door het verwerkings- of bewaringsproces (ii) de angiogeneseremmende simmondsines zijn niet in staat om de tumor-geïnduceerde angiogenese te inhiberen. De tumor zelf produceert al angiogeneseremmende stoffen zoals angiostatine of endostatine en er wordt geen extra effect van de angiogeneseremmers gedetecteerd.

Tot slot zit het onderzoek 'Angiogenesis inhibiting effects of simmondsin on the fertility of mice' ingesloten in dit rapport. Hierbij gebruikt men 9 verschillende diëten met verschillende stoffen uit jojobameel. In het eerste experiment onderzoekt men of de vruchtbaarheid wordt beïnvloed door simmondsine of paracoumarinezuurderivaten (PCAD, aanwezig in de jojobaperskoek). Hieruit bleek dat enkel de groep met het standaarddieet zich voortplantte. De groepen met een dieet met simmondsines of jojobazaad componenten plantten zich niet voort. In een tweede experiment werd bevestigd dat simmondsines verantwoordelijk zijn voor het falen van de voortplanting en niet PCAD. De muizen die een dieet met

simmondsinecomponenten kregen, plantten zich niet voort. Na enige tijd opnieuw standaard voedsel gegeten te hebben, begon een deel zich opnieuw voort te planten. Een deel echter niet en dit kan verklaard worden omdat de muizen nog geen volledige maturiteit hadden bereikt bij het begin van het experiment. De simmondsines hadden een irreversibel effect op de ontwikkeling van de voortplantingsorganen. Dit werd ook eerder al gezien bij onderzoeken naar de toxiciteit van simmondsines. In een derde experiment vergeleek men dimethylsimmondsines, met hun bewezen anorexigene eigenschappen, met desmethyl- of didesmethylsimmondsines en ferulaten. Men wou onderzoeken of de infertiliteit gerelateerd is aan de voedselrestrictie of aan een ander fenomeen zoals angiogeneseremming. Bij de dimethylsimmondsinegroep was er een sterke, voorspelde gewichtsdaling maar ook geen voortplanting. Waarom de muizen zich niet voortplantten is niet duidelijk. Het zou eventueel kunnen komen door de sterke voedseldeprivatie en gewichtsverlies, maar ook door dimethylsimmondsine zelf of een eventuele contaminatie met andere simmondsinecomponenten. Sommige in vitro experimenten uitgevoerd in TNO (Leiden) tonen eveneens vermeende angiogeneseremmende eigenschappen aan van dimethylsimmondsine.

Bij de andere groep (desmethyl- en didesmethylsimmondsines en ferulaten) was er geen gewichtsdaling en geen voortplanting. Na het herinvoeren van een normaal dieet begon een deel van de muizen zich opnieuw voort te planten. Dit is de eerste maal dat een specifieke biologische activiteit zoals angiogeneseremming in vivo kon worden aangetoond voor 4-desmethylsimmondsine, 5-desmethylsimmondsine en didesmethylsimmondsine en ferulaten. Zelfs na behandeling van de muizen met simmondsines gedurende verschillende maanden recupereerde de vruchtbaarheid soms volledig na het stoppen van de simmondsinetoediening. Toch konden enkele vrouwtjesmuizen zich niet meer voortplanten na de behandeling. Dit kan veroorzaakt worden door de te hoge dosis, te lange toediening of een start op een te jonge leeftijd.

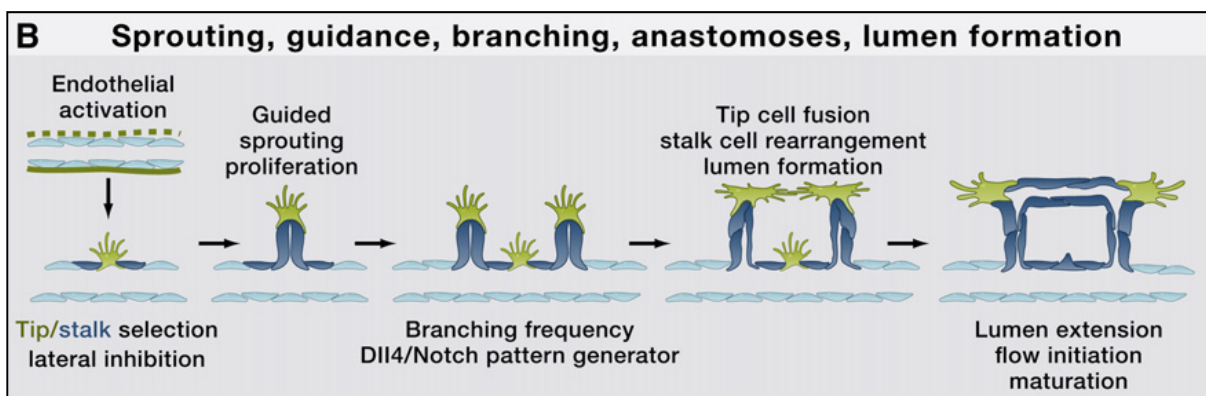
Er werden ook experimenten uitgevoerd om te zien of de anti-reproductieve eigenschappen ook geldig waren voor de mannelijke sekse. Indien beide groepen zouden aangetast zijn, zou het kunnen dat er een meer fundamenteel hormonaal mechanisme een rol speelde zoals het onderdrukken van meiose, inhibitie van angiogenese of suppressie van de VEGF-activiteit. Er werden echter geen significante effecten gevonden bij de mannelijke muis. (17)

2. Angiogenese

2.1. Mechanismen van bloedvatvorming

'*Sprouting*' angiogenese is het belangrijkste mechanisme bij de vorming van bloedvaten. Door proliferatie en migratie van endotheelcellen van bestaande bloedvaten worden vertakkingen gevormd en ontstaan nieuwe bloedvaten. *Intussusceptie* is het splitsen van bloedvaten door een interstitiële weefselmassa. Een derde mechanisme is *lus angiogenese* waarbij vaten door een contraherend weefsel worden 'aangetrokken'. *Vasculaire nabootsing en vasculaire co-optie* zijn twee mechanismen beschreven bij tumoren. Tot slot kan ook vasculogenese een rol spelen wanneer *cellen uit het beenmerg* bijdragen aan de bloedvatvorming. Deze processen worden hieronder apart besproken.

2.1.1. Sprouting angiogenese: 'vertakkende angiogenese'



Figuur 2: vertakkende angiogenese (39)

Aangetrokken en gestimuleerd door pro-angiogene signalen worden endotheelcellen motiel en stulpen filopodia uit. Daarnaast stijgt de permeabiliteit van het bloedvat. Pericyten en vasculaire gladde spiercellen komen los van de endotheelcellen. De endotheelcellen aan de voorkant van het vertakkende bloedvat worden tip-cellen genoemd (genoemd naar hun positie bij de vertakking) en brengen de vasculaire endotheliale groeifactor receptor-2 (VEGFR-2) tot expressie (40).

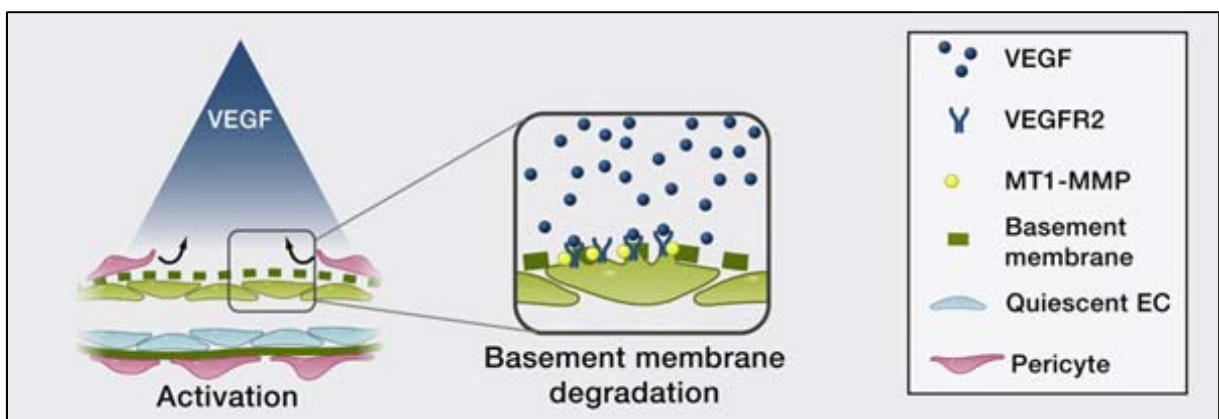
Na proteolytische afbraak van de extracellulaire matrix beginnen ze te migreren door de afgebroken matrix. Zij gaan een 'geleidingsweg' voorbereiden in de richting van regio die gevasculariseerd moet worden. In navolging van tip-cellen vormen zich stalk-cellen(deze

‘stalken’ de tip-cel). Deze hebben minder filopodia maar prolifereren onder invloed van groeifactoren. Een deel van deze groeifactoren wordt geproduceerd door de endotheelcellen en omgevende cellen, een deel komt ook vrij bij de afbraak van de matrix. Deze stalk-cellen vormen een lumen en ondersteunen de groeiende vertakking.

Wanneer de tip-cellen anostomoseran met cellen van naburige vertakkingen wordt een bloedvatlus gevormd. Het doorstromen van bloed, de vorming van een basale membraan en de rekrutering van murale cellen stabiliseren de nieuwgevormde verbindingen. De phalanx-cel is de ruststatus van een endotheelcel wanneer bloedflow tot stand komt en de vaatwand stabiliseert. Het zuurstofgehalte stijgt en men krijgt downregulatie van pro-angiogene factoren en/of stijging van lokale angiogeneseremmers. De verschillende stappen in dit proces worden in detail besproken.

2.1.1.1. Loslating van proteasen uit geactiveerde endotheelcellen en degradatie van de basale membraan, vrijmaken van endotheelcellen

De endotheelcellen, pericyten en gladde spiercellen delen een basale membraan. Deze bestaat uit extracellulaire matrix eiwitten en vormt een huls omheen de endotheelbuizen. Deze huls, samen met de omringing van het endotheel door wandcellen, voorkomt dat de endotheelcellen hun positie zouden verlaten (39). Om vertakking mogelijk te maken moeten de endotheelcellen zich losmaken van de wandcellen (adhesieve contacten), de basale membraan afbreken en gaan indringen in het onderliggende stroma.



Figuur 3: Als antwoord op VEGF gaan endotheelcellen de basale membraan degraderen en pericyten gaan zich losmaken (39)

2.1.1.1.1. De proteolytische afbraak van de basale membraan

De afbraak van de basale membraan wordt gemedieerd door proteolytische enzymen, met name het plasminogeen activator (PA-)systeem en de matrix metalloproteïnases (MMP's). Bijvoorbeeld MT-MMP1 wordt tot expressie gebracht door tip-cellen en door pericyten (39, 41).

uPA's en tPA's zijn serine proteasen en zetten plasminogeen om in plasmine. In het bloed vindt men vooral tPA, in de weefsels vooral uPA. Via het gevormde plasmine zorgt uPA voor de afbraak van verschillende elementen van de extracellulaire matrix en activeert het verschillende MMP's (MMP-1, MMP-3, MMP-9) (12). uPA heeft ook een invloed op de adhesiemoleculen (via vitronectine) en induceert via zijn celoppervlakte receptor uPAR chemotaxis en celmigratie. Dit laatste geldt niet alleen in endotheelcellen maar ook in geactiveerde leukocyten, macrofagen, fibroblasten, vasculaire gladde spiercellen en kankercellen (42).

MMP's zijn een groep oplosbare, gesecreteerde endopeptidasen. Een uitzondering is de MT-MMP groep die transmembranair verankerd zitten aan het celoppervlak.

Door de afbraak van de extracellulaire matrix komen nog meer pro-angiogene factoren vrij die hierin gesekwestreerd zaten. uPA's en MMP's genereren echter ook anti-angiogene factoren door het splitsen van plasmaeiwitten, matrixmoleculen of proteasen zelf. Zo wordt een gebalanceerd systeem gecreëerd dat de afbraak reguleert. Controle van de proteasen is essentieel want bij een overmatige afbraak van de extracellulaire matrix (ECM) wordt het proces van vertakking slecht ondersteund. Deze controle gebeurt op 3 niveaus. Ten eerste regelen angiogene factoren en cytokines hun expressie. Ten tweede worden ze gesecreteerd in een inactieve pro-vorm (pro-MMP en pro-uPA) en moeten ze door proteolyse geactiveerd worden. Tot slot wordt hun activiteit strikt gereguleerd door inhibitoren. De activiteit van MMP's door TIMP's, van plasmine door $\alpha 2$ -antiplasmine en van uPA door PAI's. Vaak worden de enzymen gesecreteerd samen met deze inhibitoren.

Uit onderzoek is gebleken dat deze regeling verstoord is bij tumorgroei en metastase. Overmatige activiteit van MMP's is aangetoond in tumoren van colon en rectum, long, borst, maag, baarmoederhals, blaas, prostaat en in glioblastoom. Verder werd in een aantal van deze

studies ook een duidelijke correlatie gevonden tussen de hoeveelheid MMP's en de agressie en/of het invasief vermogen (12). Inhibitoren van MMP's zouden als doelwit kunnen dienen voor de behandeling van kanker (43) (Zie verder 'angiogeneseremmers', bijvoorbeeld marimastat en batimastat).

2.1.1.1.2. Het losmaken van de wandcellen

Bepaalde angiogene factoren zijn verantwoordelijk voor de communicatie tussen de verschillende celtypes in de bloedvatwand. Een belangrijke rol wordt hierbij gespeeld door de angiopoietines. Angiopoietines werken in op de endotheelspecifieke receptoren Tie1 en Tie2 en spelen een belangrijke rol bij de angiogene switch van de tumor (13).

Tie2 wordt tot expressie gebracht in endotheelcellen terwijl zijn ligand Ang1 geproduceerd wordt door pericyten. Deze signalisatie via Ang1/Tie2 zorgt in normale omstandigheden voor maturatie en stabilisatie van het bloedvat. Ang1 behoudt de bloedvatintegriteit door associatie van pericyten (9), doet de permeabiliteit dalen en houdt de bloedvaten in een ruststatus (8).

Het losmaken van de wandcellen wordt gestimuleerd door Angiopoietine 2 (Ang2). Ang2 wordt, in tegenstelling tot Ang1, geproduceerd door geactiveerde endotheelcellen en is een natuurlijke antagonist van Ang1 (12). Het induceert een verhoogde vasculaire permeabiliteit, veroorzaakt het losmaken van pericyten door het losmaken van de celjuncties en bereidt de endotheelcel voor op angiogene stimuli. Ang2 speelt dus een belangrijke rol bij angiogenese. Door Ang2 wordt de endotheelcel wel afhankelijker van VEGF en gaat de cel sneller in apoptose als deze VEGF-stimulus ontbreekt (44).

Hierbij moet opgemerkt worden dat men de tegengestelde effecten van Ang1 en Ang2 niet volledig als zwart-wit mag beschouwen. Hun effecten kunnen overlappen en zullen afhangen van het moment in het angiogenesep proces waarop ze tot expressie komen.

2.1.1.1.3. De complementaire rol van VEGF en angiopoietines:

Tijdens de embryogenese promoot VEGF differentiatie en proliferatie van endotheelcellen en zo de vorming van immature vaten. Angiopoietine-1 induceert via Tie-2 receptoren de remodelering en stabilisatie van de bloedvaten, onder andere door interactie met de ECM. In een normaal matuur bloedvat is Ang1 geassocieerd met Tie-2 om het bloedvat in een stabiele staat te houden (12). Opregulatie van Ang2 door hypoxie of VEGF verstoort deze interactie en resulteert in destabilisatie van de bloedvaten. De endotheelcellen maken zich los van de

pericyten en de ECM, worden gevoelig voor angiogene signalen en in aanwezigheid van VEGF wordt de angiogenese gestimuleerd (12). De afwezigheid van stimulerende signalen zal regressie van het bloedvat veroorzaken. VEGFR-2 blokkade kan leiden tot de opregulering van Ang-1 wat leidt tot verhoogde bedekking van het bloedvat door pericyten. Ang-2 speelt een belangrijkere rol in neo-angiogenese dan in normale angiogenese. Als een antagonist voor Ang-1 is het verantwoordelijk voor de destabilisatie van de vasculatuur rondom de tumor (45).

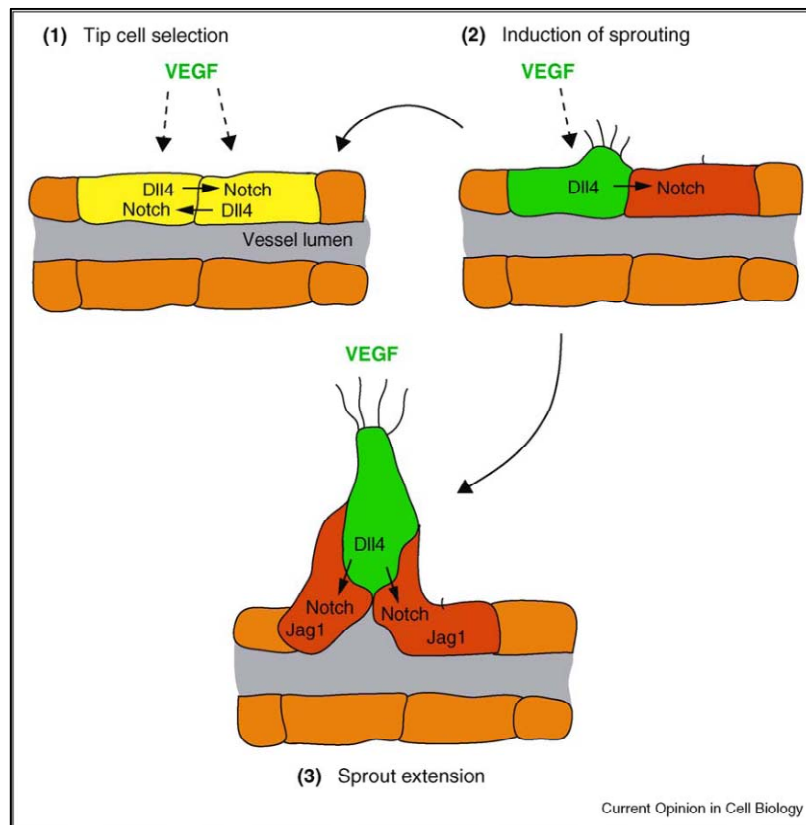
2.1.1.2. Laterale inhibitie selecteert de tip-cel en VEGF en DLL4/Notch geven feedback als een vertakkingspatroon generator

VEGF en Notch werken samen in een geïntegreerde intercellulaire feedback. Deze zorgt voor een correct vertakkingspatroon van de bloedvaten door controle van de differentiatie van endotheelcellen in tip- en stalk-cellen (figuur 4) (10).

Aan de voorkant van de vertakking concurreren de endotheelcellen voor de tip-positie. VEGF(-A) induceert via VEGF-2 de expressie van het delta-like ligand 4 (Dll4) in de endotheelcellen. (zie figuur 4 deel 1) De endotheelcellen die dit sneller en in een hogere concentratie doen, zullen de Notch signalisatie in de naburige cellen sterker activeren. Dll4 gemedieerde activatie van Notch in deze naburige 'stalk'-cellen (figuur 4 deel 2) leidt tot inhibitie van expressie van VEGFR2, VEGFR3 en NRP1 receptoren in deze stalk-cellen en opregulatie van VEGFR1 (39). Tip-cellen verkrijgen door hun sterke VEGF/VEGFR-2 signalisatie een motiel, invasief en vertakkend fenotype met filopodia. Ze gaan de vertakking van het bloedvat leiden door met hun filopodia de hypoxische signalen te volgen in de richting van de avasculaire regio. Tip-cellen brengen verder ook VEGFR3 tot expressie. De rol van VEGFR3 werd aangetoond door het feit dat de inhibitie ervan de vertakking doet verminderen.

In de naburige stalk-cellen onderdrukt Notch-activatie de pro-angiogene respons (9). Door onder andere de onderdrukking van de receptoren van VEGF vermindert de respons op VEGF. Bovendien wordt Jagged1 (Jag1), een ander Notch ligand, tot expressie gebracht. Jag1 activeert Notch1 minder goed, maar helpt bij de differentiatie van tip- en stalk-cellen door de signalen via DLL4 naar de tip-cellen te inhiberen (39). Ook VEGFR1 komt voornamelijk tot expressie in stalk-cellen en zou een rol spelen in de begeleiding en limitering van tip-cel vorming. VEGFR1 zou functioneren als een VEGF val en het effect hiervan inhiberen. De

stalk-cellen prolifereren, verlengen en vormen het lumen van de groeiende vertakking. In vergelijking met tip-cellen hebben ze minder filopodia. Verder vormen ze ook juncties met naburige cellen en produceren ze componenten van de basale membraan.



Figuur 4: Selectie van tip- en stalk-cellen (10)

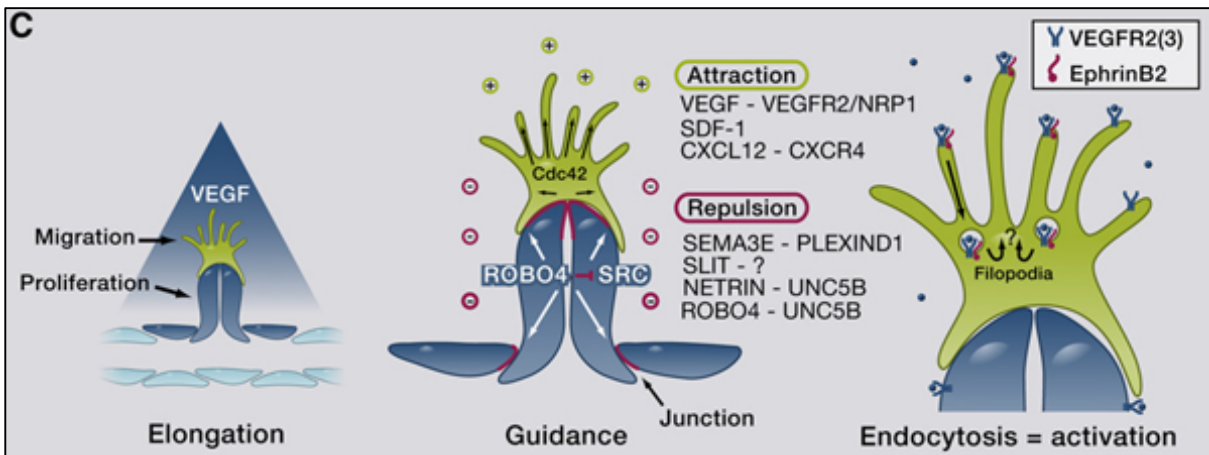
Notch signalisatie verzorgt dus een evenwichtig patroon van tip- en stalk-cellen, coördineert op deze manier de bloedvatontwikkeling en voorkomt overmatige vertakking. Het belang van het evenwicht tussen tip- en stalk-cellen wordt het best aangetoond door de paradoxale effecten van experimentele genactivatie van DLL4 of Notch1 in het endotheel. Ten gevolge hiervan worden er meer bloedvaten gevormd maar deze zijn slecht doorbloed en disfunctioneel (39).

In tumoren geeft een blokkade van Notch of DLL4 een groter aantal filopodia en vertakkingen als gevolg van een overmatige tip-cel vorming (39). Deze vertakkende vaten functioneren echter slecht wat leidt tot verhoogde hypoxie, slechte perfusie en gedaalde tumorgroei (9).

Naast de centrale rol van DLL4 en Notch bij de differentiatie van endotheelcellen spelen ook andere signaalwegen zoals Wnt/ β -catenine. Bovendien is de expressie van DLL4 dynamisch geregeld zodat de positie van de tip-cel regelmatig wijzigt tijdens het proces van vertakking(39).

2.1.1.3. Tip-cel begeleiding

Zoals bij neuronen moet ook de vasculatuur een bepaald patroon volgen voor een optimale zuurstofvoorziening van de weefsels. Vaten gebruiken tip-cellen om hun vertakkingen correct te begeleiden. De structuur en de vorm van tip-cellen lijken op die van axonale groeikegels (39) en beide gebruiken gelijkaardige aantrekkende en afstotende factoren om de begeleiding te controleren. Bijvoorbeeld de klasse 3 semaforines spelen bij beide processen een rol (9).



Figuur 5: Filopodia gidsen de tip-cellen door het aanvoelen van aantrekkende en afstotende signalen(39)

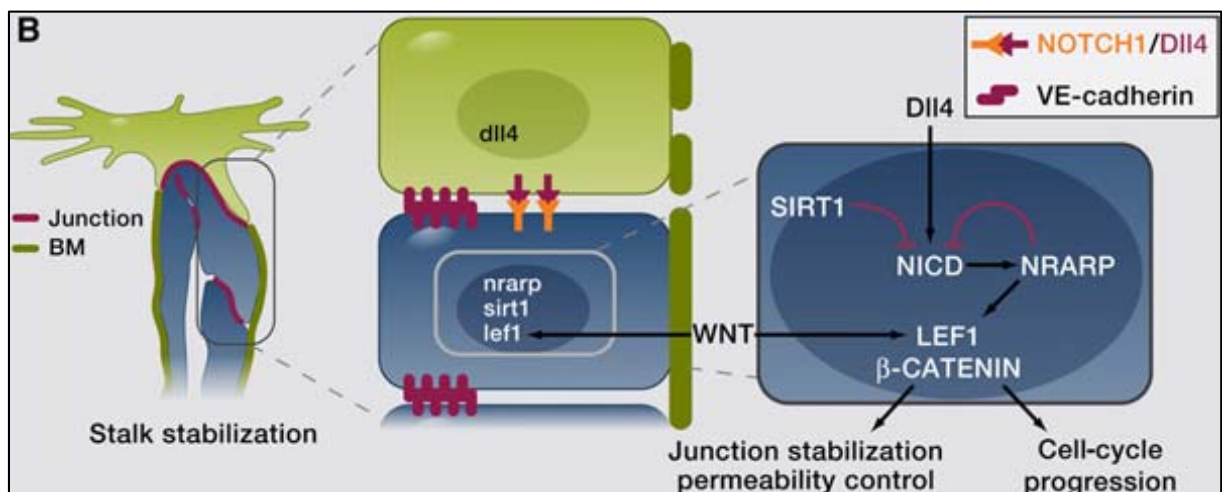
De kennis over de moleculaire mechanismen die de filopodia van de tip-cel sturen, is beperkt. Een voorbeeld van geleidingsreceptoren de neurofilines(NRP1 en 2) (39). Een belangrijke chemotaxische stof is VEGF. Deze vormt een concentratiegradiënt en functioneert als een chemoattractief signaal voor de filopodia (9). De groeiende vasculaire takken genereren zelf ook een concentratiegradiënt van platelet-derived growth factor B (PDGFB). Een hoge concentratie PDGFB promoot de rekrutering van pericyten. Deze rekrutering zorgt ervoor dat het endotheel van de groeiende bloedvaten voldoende wordt ondersteund.

2.1.1.4. Endotheliale stalk-cel vorming, controle van het stalk-cel gedrag en elongatie

Zoals eerder uitgelegd zorgt Notch voor de balans tussen tip- en stalk-cellen. Activatie van Notch houdt de splitsing in van Notch receptoren met de loslating van hun intracellulaire domein (NICD). Dit vormt een complex met transcriptiefactoren om zo bepaalde genen tot expressie te brengen. Dit complex promoot naast transcriptie ook zijn eigen afbraak om continue Notch activatie tegen te gaan.

De stalk-cel stabilisatie hangt af van de Notch activiteit en deze wordt nauwkeurig gereguleerd door het Notch-regulerende ankyrin repeat protein (NRARP) en Sirtuin 1 (SIRT1). NRARP ontbindt het Notch-coactivator complex en promoot NICD degradatie, het heeft dus een negatieve invloed op de Notch signalisatie. NRARP laat zo stalk cellen toe om te prolifereren. NRARP verhoogt verder ook de Lef1/ β -catenine signalisatie om de stabiliteit van de beginnende bloedvatconnecties te verhogen.

Een andere regulator van de Notch signalisatie is de acetylatie van NICD door SIRT1. Dit verhindert de NICD1 turnover en verhoogt zo het antwoord op Notch. Deacetylatie door SIRT1 verstoort de NICD1 stabilisatie en limiteert zo de Notch activiteit (39).



Figuur 6: De regulatie van de Notch activiteit die zorgt voor de stabilisatie van de stalk-cel(39)

Om het bloedvatnetwerk uit te breiden, ondergaan endotheelcellen doorlopende cycli van ontkieming, vertakking en tubulogenese. Dit vereist dynamische overgangen tussen tip- en stalk- cel fenotypes. Zoals eerder vermeld is de expressie van DLL4 dynamisch geregeld. De nauwkeurige afstelling van de Notch signalisatie (in amplitude en duur) door NRARP en

SIRT1 zou kunnen dienen om de timing van de overgang tussen de verschillende fenotypes dynamisch te beïnvloeden en hiermee de frequentie van bloedvatvertakkingen aan te passen (39).

2.1.1.5. Fusie en doorbloeding van bloedvatvertakkingen

Om de vertakkingen om te vormen tot functionele bloedvaten zijn nog verdere stappen nodig. Tip-cellen maken contact met andere endotheelcellen om nieuwe vaatcircuits te vormen. Bij het tegenkomen van bestaande capillairen of tip-cellen van andere vertakkingen moeten tip-cellen hun motiel, exploratief gedrag onderdrukken en vasculaire connecties vormen. Adhesieve en junctionele contacten worden hierbij gevormd en VE-cadherine-bevattende juncties gaan het contact consolideren. Macrofagen kunnen bloedvatanastomosen ondersteunen door zich op te hopen op plekken van anastomosen en door te interageren met filopodia van naburige tip-cellen.

Naast deze connecties moet ook een vasculair lumen gevormd worden. Vroeger dacht men dat endotheelcellen een lumen vormden door middel van het samensmelten van intracellulaire vacuoles van naburige cellen. Recente studies suggereren echter dat endotheelcellen de vorm van hun cytoskelet veranderen en hun juncties herschikken om zo een lumen te openen. Via VEGF en Rho-geassocieerd proteïne kinase (ROCK) wordt de vorm van de endotheelcel verder aangepast en breidt het lumen uit (39).

2.1.1.6. Bloedvatmaturing, stabilisatie en rust

Op het einde van het proces moeten endotheel en vaatwand nog matureren. Dit is de stapsgewijze overgang van een actief groeiend vasculair bed naar een rustend en functioneel netwerk. Dit omvat de onderdrukking van endotheelcelproliferatie, de rekrutering van murale cellen, de depositie van extracellulaire matrix en cellulaire differentiatieprocessen zoals de vorming van kleppen, fenestraties en zonulae occludentes (9). De bloedvatmaturing is deels afhankelijk van de TGF β signalisatie. Die stimuleert de differentiatie en proliferatie van murale cellen en de productie van extracellulaire matrix (39).

Het begin van bloeddorstrooming in het gevormde lumen veroorzaakt een stijging van de zuurstofspanning en nutriëntenvoorziening. Dit geeft een daling van de VEGF-expressie en de endotheliale O₂-sensoren worden geïnactiveerd, vooral PHD2 hierbij speelt een belangrijke

rol. Dit alles maakt dat de endotheelcel in een ruststatus wordt gebracht, gekend onder de term phalanx-cel (39). Het kassei-achtig uitzicht van de rustende endotheelcel leidde tot de term phalanx omwille van de gelijkenis met de Griekse militaire formatie.

De perfusie remodelleert de bloedvatconnecties en door de kracht die de bloedstroom op de bloedvatwand uitoefent wordt de transcriptiefactor Krüppel-like factor 2 (KLF2) geactiveerd. Deze is van belang voor de overleving van de endotheelcel. Het voortbestaan van de endotheelcel is namelijk noodzakelijk om de integriteit van het bloedvat te bewaren. Autocriene en paracriene overlevingssignalen van endotheel- en ondersteuningscellen beschermen het bloedvat tegen stress uit de omgeving. Voorbeelden van dergelijke signalen zijn VEGF (activeert PI3K/AKT overlevingssignaalweg), FGF (verstevigt onder andere adherens juncties), Notch, Ang1/Tie2 en de bloedflow zelf (schuifspanning inhibeert apoptose) (39).

Tot op dit moment in het groeiproces, en dus ook in de eerdere stappen, kan een verandering in de balans tussen pro- en anti-angiogene factoren leiden tot de eliminatie ('pruning') van de nieuwgevormde vaatconnecties door endotheelcelretractie of apoptose.

Experimentele behandeling van tumoren met VEGFA-inhibitoren heeft aangetoond dat de lege hulzen van basale membraan met geassocieerde pericyten blijven bestaan wanneer de immature bloedvaten worden geëlimineerd. Omdat deze structuren een snelle hergroei van bloedvaten toelaten bij een heropflakking van het VEGF-sigitaal, zou het elimineren van deze matrixhulzen een potentieel doelwit kunnen zijn bij de angiogeneseremming (9).

2.1.1.6.1. Rekrutering van murale cellen

Pericyten maken direct cel-cel contact met endotheelcellen in capillairen en in immature vaten en zijn noodzakelijk voor de stabilisatie van het bloedvat (41). Vasculaire gladde spiercellen bedekken mature en grotere vaten, zoals arteriën en venen, gescheiden van de endotheelcellen door een basale membraan (9). Beide celtypes delen een mesenchymale, fibroblastachtige morfologie en hun fenotypes zijn mogelijk interconverteerbaar alhoewel dit niet formeel werd aangetoond.

Bij de rekrutering van murale cellen spelen verschillende controlemechanismen een rol (39). PDGF β (endotheel) stimuleert via PDFGR β (murale cel) de migratie en proliferatie van de murale cel en stabiliseert zo het nieuwgevormde bloedvat (11). Sphingosine-1-phosphate

(S1P) (endotheel) veroorzaakt via S1P-receptors veranderingen van het cytoskelet en van de juncties. ANG1 (murale cel) stabiliseert via TIE2 (endotheelcelreceptor) de bloedvaten door het promoten van adhesie van pericyten en door het versterken van de endotheliale juncties.

Verder controleert Notch de maturatie en arteriële differentiatie van vasculaire gladde spiercellen en zorgt EphrinB2 voor de adhesie ervan aan endotheelcellen. De schuifspanning van de bloeddorstrooming en de hemodynamische krachten spelen tot slot ook een niet te onderschatten rol (11).

2.1.1.6.2. Vorming van celjuncties:

Rustende endotheelcellen vormen barrières tussen bloed en de omliggende weefsels. Essentieel hiervoor zijn de cel-cel adhesies tussen de endotheelcellen onderling en met de omgevende cellen. Dit gebeurt door middel van transmembraan-adhesieve eiwitten zoals VE-cadherine en N-cadherine bij zonulae adherentes en occludines en claudines bij zonulae occludentes.

Integrines zijn de primaire adhesiemoleculen tussen de cel en de omgevende matrix. Zij integreren signalen tussen de ECM en de intracellulaire signalisatiewegen. Eens een verbinding tot stand komt met een specifiek matrixeiwit gaat de integrine-gemedieerde signalering zorgen voor de communicatie tussen integrines en specifieke geactiveerde cytokine- of groeifactorreceptoren (46). De matrix-cel signalering leert de cel of ze zich in een gepaste omgeving bevindt en heeft zo invloed op overleving, migratie en invasie.

Antagonisten van integrines vormen een mogelijk medicijn bij de behandeling van kanker door selectief de integrine-signalering te blokkeren en apoptose te veroorzaken. Een voorbeeld hiervan is de $\alpha_v\beta_3$ -blokkade die wordt vernoemd bij de bespreking van de angiogeneseremmers.

2.1.2. Intussusceptie

Intussusceptie is een alternatief mechanisme om bloedvaten te vormen. Een interstitiële weefselmassa oefent lokale druk uit op de bloedvatwand. Deze massa verlengt en splitst het bloedvat in twee dochtervaten. In dit proces is er dus geen uitgebreide endotheelcelproliferatie. Dit mechanisme helpt bij de expansie en verhoging van de complexiteit van het capillaire netwerk en is betrokken bij de scheiding van de perifere arteriële en veneuze takken van de capillaire lagen(47).

Waarom een organisme intussusceptieve angiogenese zou gebruiken in plaats van vertakkende angiogenese en waarom dit mechanisme ook in het volwassen leven van belang blijft is het gevolg van enkele voordelen. Ten eerste gaat dit proces sneller dan vertakking. Ten tweede lijkt het energetisch voordeliger. Er is geen uitgebreide celproliferatie, degradatie van de basale membraan of invasie van het omliggende weefsel. Ten derde blijven de bloedvaten tijdens het omvormingsproces deels permeabel voor de bloeddorstrooming wat essentieel is voor de weefsel- en orgaanfunctie(47).

Er werd aangetoond dat intussusceptie een wijdverspreid fenomeen is en zowel pre- als postnataal een rol speelt bij groei en remodelering van bloedvaten in herstellende weefsels en bij carcinogenese (47). Tumoren gebruiken dit mechanisme om hun vasculatuur te remodeleren en het wordt beschouwd als een tumorale strategie om aan anti-angiogene therapie te ontsnappen. Over de moleculaire regulatie van de intussusceptieve angiogenese is weinig gekend. VEGF, PDGFB en erythropoietine spelen vermoedelijk een rol, net als de transcriptiefactor HoxB5 en de verhoogde bloeddorstrooming (8).

2.1.3. Lus angiogenese

Lus angiogenese of 'looping angiogenese' werd voor het eerst beschreven tijdens wondheling (48). Eerder dacht men dat nieuwe vaten in granulatieweefsel enkel door vertakkende angiogenese werden gevormd. Door middel van CAM-testen en testen met de cornea van muizen werd aangetoond dat geactiveerde fibroblasten of myofibroblasten gaan contraheren. Door deze wondcontractie wordt naburige vasculatuur aangetrokken en dit vormt een netwerk van lussen in de remodelerende zone. Dit gebeurt dus zonder angiogene expansie en de vaten hebben meteen een functionele circulatie.

Experimenten met een blokkade van VEGFR-2 inhieerde dit mechanisme niet en bevestigde dat enkel biomechanische krachten nodig waren. Dit model verantwoordt de snelle verschijning van grote, functionele bloedvaten in granulatieweefsel bij wondheling (48). Wat de rol hiervan is bij tumorale angiogenese moet nog verder onderzocht worden.

2.1.4. Endotheel voorlopercellen en hematopoietische stamcellen uit het beenmerg

Circulerende voorlopers van endotheelcellen (EPC's) uit het beenmerg zouden gerekruteerd kunnen worden door groeiende endotheliale vertakkingen en deze vorm van vasculogenese draagt zo bij aan het angiogeneseproces.

Door Lyden et al (49) werd voor het eerst bewezen dat zowel angiogenese als vasculogenese een rol spelen bij de bloedvatvorming bij kanker. De verstoring van de rekrutering van endotheelcellen uit het beenmerg en hematopoietische precursorcellen kon de neo-angiogenese en tumorgroei blokkeren. De oplosbare factoren VEGF, FGF, GM-CSF en osteopontine, gesecreteerd door groeiende tumoren, wijzigen het rustende beenmerg in een pro-angiogeen/pro-tumorigeen beenmerg. Dit resulteert in een mobilisatie van cellen afkomstig uit het beenmerg (BMDC's) die gerekruteerd worden naar de primaire tumor of naar metastasen. Tot deze cellen behoren cellen van het aangeboren immuunsysteem, in het bijzonder macrofagen, neutrofielen, mastcellen en myeloïde voorlopercellen. Die infiltreren in premaligne lesies en in meer gevorderde tumoren en hopen zich op aan de randen hiervan(13).

De meerderheid van deze BMDC's wordt niet fysisch geïncorporeerd in de vaatwand maar blijft in de nabijheid en ondersteunt de angiogenese door loslating van cytokines, een proces vergelijkbaar met inflammatie. Verschillende hematopoietische cellijnen beïnvloeden de angiogenese (39). Monocyten die Tie2 tot expressie brengen (TEM's) bevinden zich dichtbij groeiende tumorbloedvaten, laten pro-angiogene moleculen los en kunnen snel differentiëren in tumor-geassocieerde macrofagen. Tumor-geassocieerde macrofagen, voornamelijk het pro-angiogene M2-like fenotype, stimuleren angiogenese door loslating van de placentaire groeifactor (PlGF). Mastcellen stimuleren angiogenese door secretie van proteasen en bepaalde neutrofielen laten de pro-angiogene factor Bv8 los.

In tegenstelling tot de BMDCs kunnen EPC's actief in de vaatwand incorporeren. De identiteit en functie van de EPC's blijven echter controversieel, voornamelijk omwille van hun lage aantal dat men aantreft in de tumorvasculatuur (9). De bescheiden incorporatie van EPC's in de bloedvatwand zou toch cruciaal kunnen zijn voor tumorgroei doordat tumor-gerekruteerde EPC's ook pro-angiogene factoren kunnen loslaten die een paracrine invloed hebben op endotheelcel migratie en proliferatie.

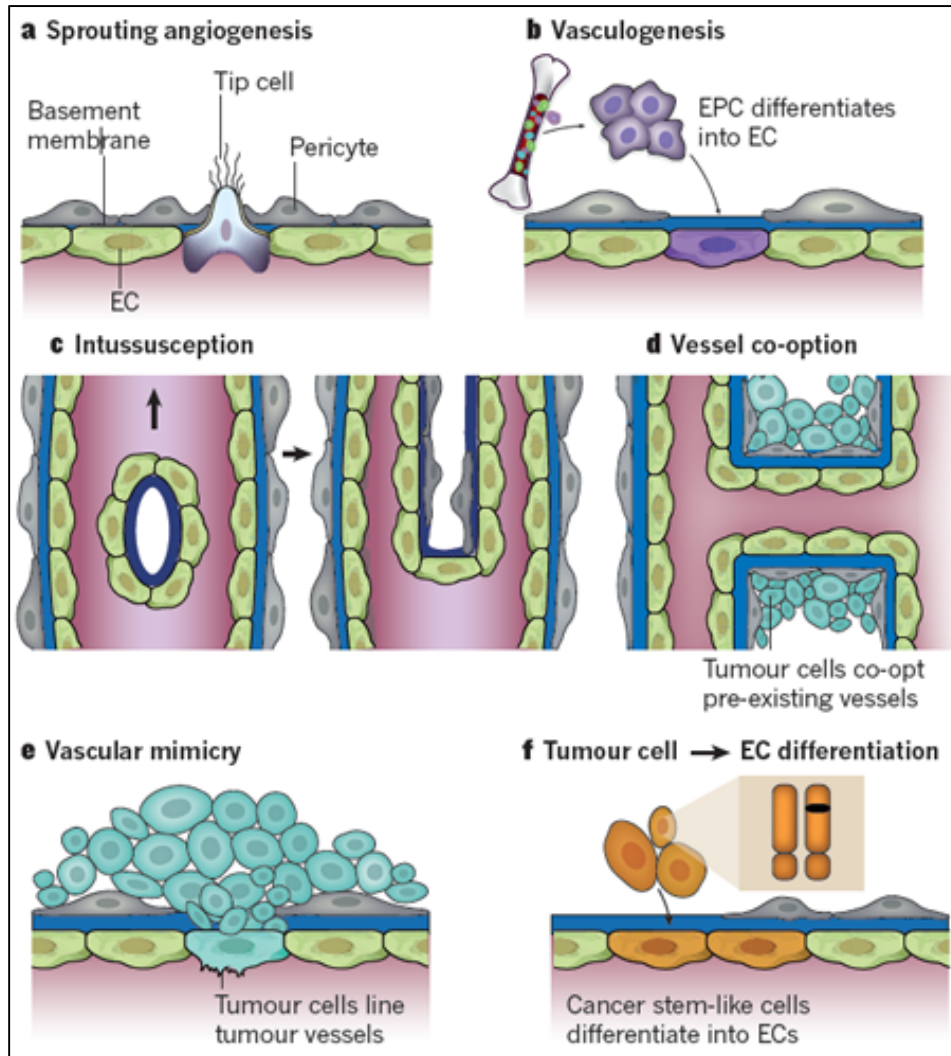
2.1.5. Vasculaire nabootsing ('vascular mimicry')

Dit is een bloedvatvormingsproces beschreven bij tumoren. Bij orgaanschade gaan stamcellen die in dit weefsel aanwezig zijn, deelnemen aan het herstel door te differentiëren in endotheelcellen. In tumoren zou een gelijksoortig proces plaatsvinden (8). Tumorcellen wijzigen hun genexpressie naar een ongedifferentieerd fenotype en verkrijgen de mogelijkheid om vaatachtige structuren te vormen. Ze gaan dus zelf de bloedvaten aflijnen en brengen hierbij ook bepaalde endotheliale merkers en vasculogenese-gerelateerde moleculen tot expressie (VE-cadherine, CD34, CD105) (11). Deze kanalen kunnen tumoren voorzien van een alternatief of complementair vaatsysteem waarvan men in studies al bewezen heeft dat ze verbonden zijn met de bloedvaten die met normaal endotheel zijn afgelijnd(50).

Alhoewel een groot aantal recente studies de betrokkenheid van tumorstamcellen in dit proces hebben naar voor gebracht, blijft het bestaan en het functioneel belang van dit mechanisme controversieel (46).

2.1.6. Vasculaire co-optie

Vasculaire co-optie betekent het groeien langsheen bestaande vaten. Dit proces is voornamelijk geobserveerd in goed-gevasculariseerde weefsels zoals hersenen en longen. In vroege stadia hebben hersentumoren al een hoge vasculaire dichtheid, met bloedvaten gelijkend op die van de hersenen. Bij vasculaire co-optie vormen tumorcellen groepen die zich samen verplaatsen, genaamd collectieve migratie. Ze dringen perivascuair binnen in omliggend weefsel. In dit stadium van het proces is het VEGF-niveau laag en worden geen vertakkingen geobserveerd. Als de tumor verder evolueert, gaan deze gecoöpteerde endotheelcellen Ang2 produceren wat loslating van murale cellen en endotheelcelapoptose uitlokt. Ang2 medieert vaatdestabilisatie en regressie met als gevolg een verstoring van de zuurstofvoorziening van de tumor. Tumorcellen in hypoxische regio's gaan VEGF meer tot expressie brengen en hierdoor start angiogenese, vooral in de periferie van de tumor (8).



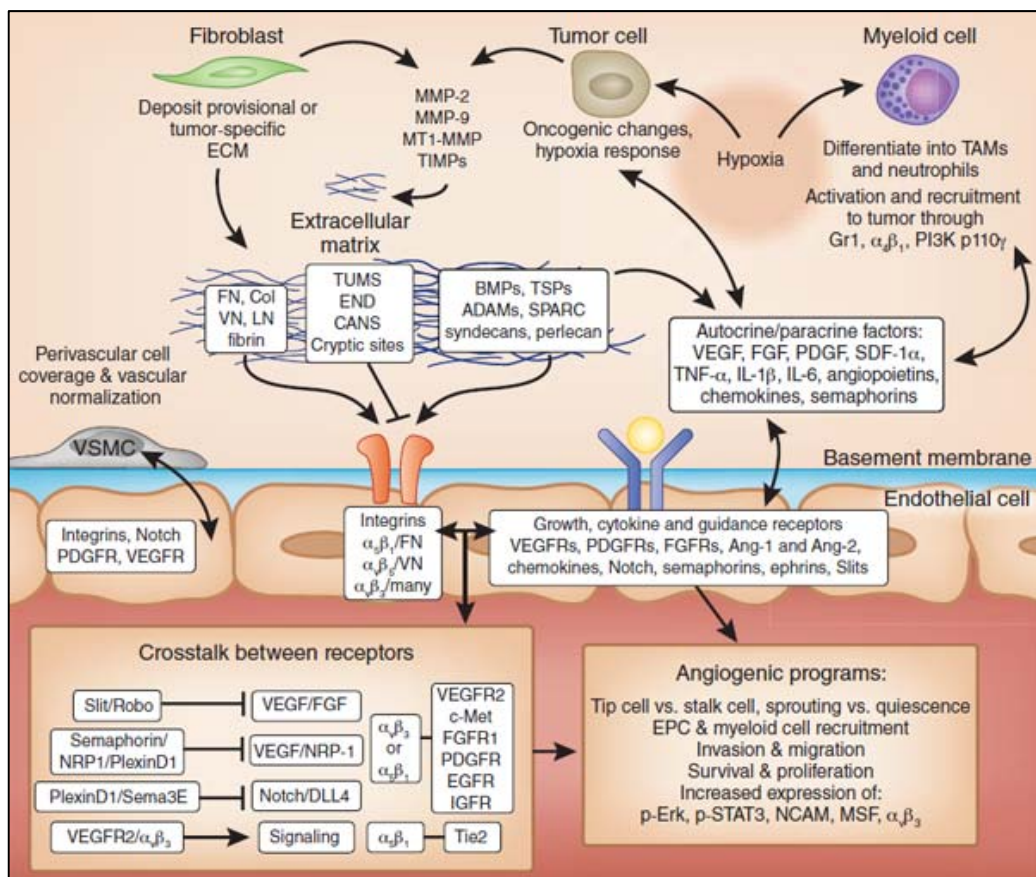
Figuur 7: Mechanismen van bloedvatvorming (51): Normale weefsels maken gebruik van vertakkende angiogenese, vasculogenese en intussusceptie. Tumoren gebruiken alle verschillende mogelijk mechanismen. Lus angiogenese wordt in deze figuur niet weergegeven. (f) wordt niet beschreven in de bovenstaande tekst maar is vergelijkbaar met (e), bij vasculaire nabootsing gaan tumorcellen zelf de vaten aflijnen. Bij (e) gaan tumorstamcellen zich omvormen tot endotheelcellen die de bloedvaten gaan aflijnen.

2.2. De rol van angiogenese bij tumoren

De groei van bloedvaten in de tumor wordt beschouwd als één van de grote stappen in de stapsgewijze evolutie van kanker (13). Initieel groeien de meeste tumoren avasculair tot er een evenwicht is bereikt tussen proliferatie van cellen aan de buitenkant en celdood in het centrum door tekort aan nutriënten en zuurstof. Zonder bloedvatvorming kan een tumor tot ongeveer een miljoen cellen groeien, dit komt overeen met een bol met diameter 2 mm. Na maanden of jaren in een stabiele fase met een evenwicht tussen proliferatie en celdood gaan

de meeste tumoren de vorming van bloedvaten induceren. Dit noemt men de ‘angiogene switch’. Onder invloed van hypoxie, nutriëntentekort en oncogenen (v-ras, K-ras, v-raf, src, fos, v-yes)(12) (8) begint de tumor cytokines en groeifactoren te secreteren in zijn micro-omgeving en activeert zo normale, rustende cellen. De tumor begint capillairen te vormen en start de invasie van het omringende weefsel. Hypoxie is de belangrijkste stuwende factor bij de initiatie van dit angiogenetisch proces. Via HIF-1 α induceert het de expressie van VEGF en trekt ook macrofagen aan.

In het verleden dacht men dat neo-angiogenese enkel van belang was bij snelgroeibende, macroscopische tumoren. Meer recente data suggereren echter dat neo-angiogenese al bijdraagt tot de microscopische, premaligne fase van de neoplastische progressie(13).



Figuur 8: Mediatoren van endotheelactivatie en de tumor angiogenese respons(46)

2.2.1. Verschillen met fysiologische angiogenese

De bloedvatgroei bij tumorprogressie heractiveert verscheidene mechanismen die ook werkzaam zijn tijdens fysiologische bloedvatgroei. Naast deze mechanismen gebruiken tumoren ook een heel arsenaal bijkomende strategieën om bloedvaten te doen groeien en hun

overleving te verzekeren. Voorbeelden hiervan zijn de vasculaire nabootsing en vasculair co-optie.

Het grote verschil met de fysiologische bloedvatvorming is dat het normaalgezien strikt gecoördineerde angiogeneseproces ongecontroleerd verloopt. Door de inductie van angiogenese zullen initieel meer zuurstof en nutriënten de tumor bereiken, toch blijft deze winst in bloedtoevoer beperkt doordat de continu gestimuleerde tumorvasculatuur een heterogeen en ongeorganiseerd netwerk vormt (8). Rijk gevasculariseerde gebieden wisselen minder gevasculariseerde gebieden af. Bovendien variëren ook de bloedvaten zelf van abnormaal wijd, onregelmatig en tortueus tot smal en samengedrukt. De arterioveneuze identiteit is slecht gedefinieerd en shunts verstoren de normale bloeddorstrooming (52).

De componenten van de bloedvatwand functioneren slecht: *Endotheelcellen* hebben een abnormale vorm en zijn slecht met elkaar en met de omgeving verbonden. De moleculaire profielen van tumorendotheelcellen werden vergeleken met normale endotheelcellen. Bepaalde angiogenese gerelateerde moleculen zoals VEGFR en PDGFR worden significant sterker tot expressie gebracht. Deze moleculen zouden kunnen dienen als target voor anti-angiogene therapie. Deze moleculen zijn echter niet volledig specifiek voor tumorendotheelcellen en komen bijvoorbeeld ook tot expressie bij embryogenese en bepaalde inflammatoire ziektes(11). De *basale membraan* is onregelmatig in dikte en samenstelling. Hij wordt door vasculaire lekken ook voortdurend blootgesteld aan verscheidene factoren uit het bloed wat leidt tot het rekruteren en activeren van plaatjes. Deze gaan op hun beurt cytokines secreteren(vb. PDGF). De *murale cellen* zijn minder aanwezig dan bij normale bloedvaten en ze zijn minder goed verbonden met het onderliggend endotheel. Bovendien hebben ze een abnormale morfologie en zijn ze hypocontractiel. Door dit falen van rekrutering van perivasculaire cellen komt de verwachte maturatie en stabilisatie van het bloedvat niet tot stand. Verder worden ook tumor-geassocieerde fibroblasten gerekruteerd die angiogene factoren loslaten en een abnormale *extracellulaire matrix* neerzetten en. MMP's splitsen en remodelleren deze ECM en hierbij komen fragmenten vrij die functioneren als endogene inhibitoren van angiogenese. Bv. tumstatin of endostatin. Tot slot worden ook *inflammatoire cellen* aangetrokken.

Samengevat leidt dit alles tot functionele storingen van zuurstofvoorziening, hypoxie van de tumor, en dus nog meer expressie van pro-angiogene factoren. Zo ontstaat een vicieuze cirkel.

2.2.2. Gevolgen

2.2.2.1. Therapie

De tumorvasculatuur funcioneert slecht en dit verstoort de aflevering van zuurstof, nutriënten en medicatie. Het lekken van de bloedvaten, de groeiende tumormassa en de afwezigheid van lymfevaten verhoogt de interstitiële druk en verstoort verder de bloedtoevoer. Door de slechte doorbloeding dringt de chemotherapie minder goed door in de tumor en door de lagere zuurstofconcentratie daalt het effect van de radiotherapie (39).

2.2.2.2. Tumorprogressie

Neo-angiogenese van een primaire tumor verhoogt het risico dat kankercellen de bloedsomloop binnendringen en zich verspreiden naar andere organen. Dit proces wordt vergemakkelijkt door de lekken in de bloedvaten. De verhoogde interstitiële vloeistofdruk in de tumor verhoogt ook de vloeistofflow van de tumor naar de omgeving en kan uitzaaiing verder vergemakkelijken.

Ernstige hypoxie induceert invasieve en metastatische programma's in de tumorcellen die aan de vijandige hypoxische en acidotische micro-omgeving willen ontsnappen (8). Men vermoedt dat dit leidt tot een selectie van meer kwaadaardige cellijnen en tot het stimuleren van verspreiding van de tumorcel. Intratumorale hypoxie is een onafhankelijke indicator van een slechte prognose en het bewijs groeit dat hypoxie een rol speelt bij de ontwikkeling van metastases. Studies suggereren dat het verwerven van het metastatische fenotype niet louter het resultaat is van een ontregelde signaaltransductie, maar dat dit een stapsgewijs selectieproces is, gedreven door hypoxie (53).

Hypoxie heeft invloed op een aantal belangrijke moleculaire mechanismen. Het vergemakkelijkt de verstoring van de weefselintegriteit door repressie van E-cadherine en een opregulatie van N-cadherine. Dit laat de cellen toe te ontsnappen aan anoikis, een vorm van apoptose. Door opregulatie van uPAR expressie verhoogt hypoxie de proteolytische activiteit en verandert het de interacties tussen integrines en de ECM. Zo vergemakkelijkt de cellulaire invasie doorheen de basale membraan en het onderliggende stroma. De eerder vernoemde hypoxie-geïnduceerde activiteit van VEGF speelt ook een kritische rol in de dynamische interacties tussen tumor en stroma. VEGF promoot de vorming van bloed- en lymfevaten in de primaire tumor en voorziet zo de noodzakelijke wegen voor verspreiding.

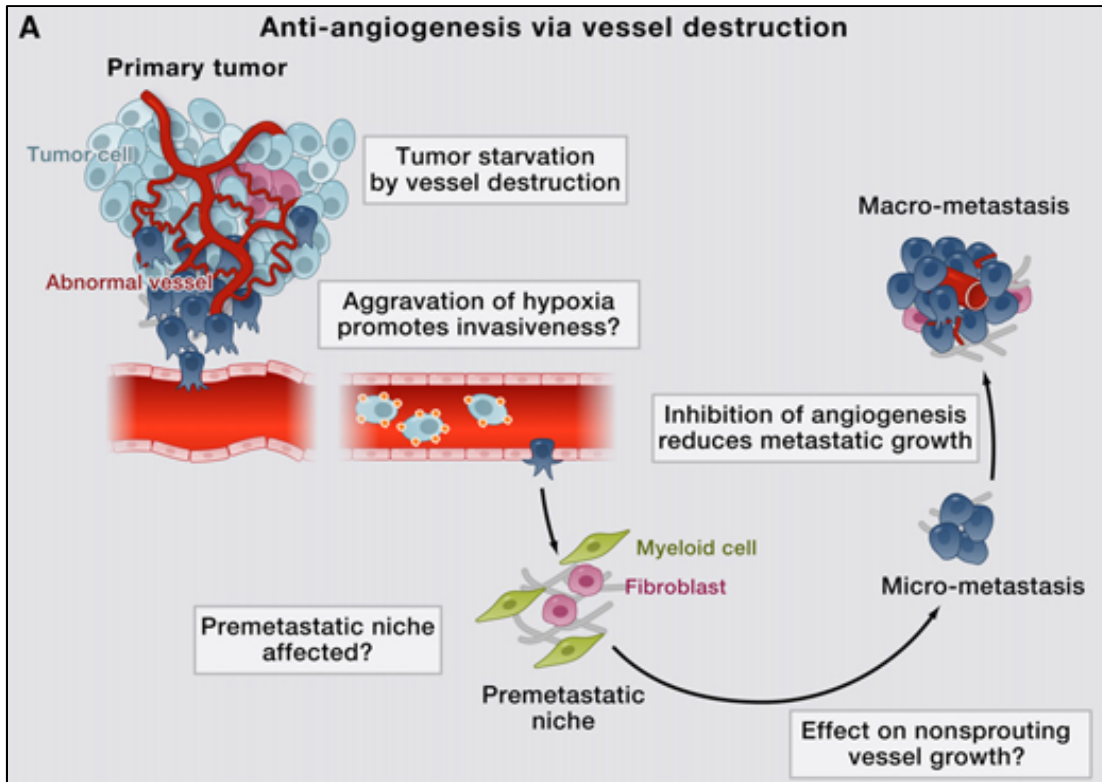
Uit experimenten in het lewis longcarcinoom is gebleken dat het verwijderen van de primaire tumor een rol kan spelen bij de verdere ontwikkeling van metastasen omdat de primaire tumor een angiogenese inhibitor loslaat: angiostatine (12, 54). De primaire tumor houdt de metastasen onder controle door systemische suppressie van angiogenese. Resectie van de primaire tumor leidt tot een daling van deze inhibitor, een vascularisatie van de micrometastasen en een plotse groei van deze micrometastasen tot macrometastasen.

2.2.2.3. Angiogeneseremmers en normalisatie van de bloedvaten

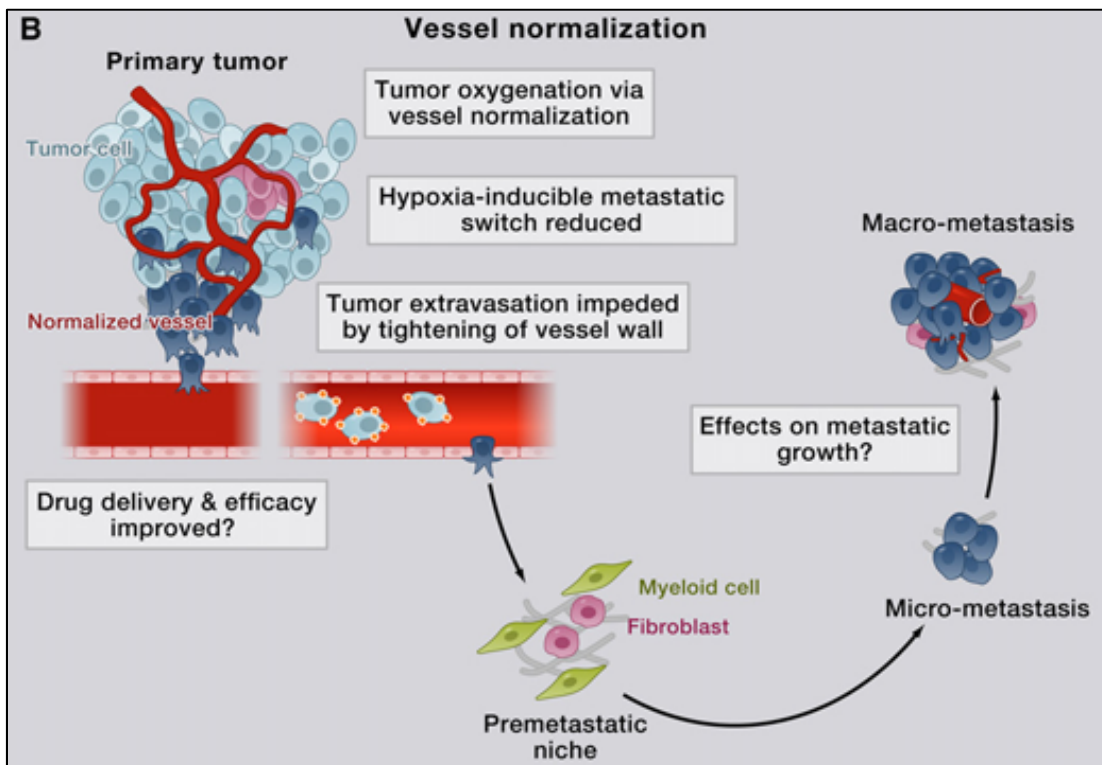
Men heeft bewezen dat angiogeneseremmers tegen de VEGF-siginaalweg de ziekteprogressie in bepaalde patiënten vertragen. Dit leidde tot een voordeel in progressievrije overleving (PFS: tijd vanaf het begin van de behandeling tot progressie of dood) en tot een betere overlevingsgraad ('overall survival' of 'survival rate': het percentage proefpersonen die een bepaalde tijd hebben overleefd, meestal de tijd sinds diagnose of start van de behandeling). Toch zijn de resultaten minder spectaculair dan voorspeld door de meeste preklinische testen en de toename in PFS gaat vaak niet gepaard met een betere overlevingsgraad. Men moet zich ook afvragen of het natuurlijk ziekteverloop na anti-angiogene therapie verschilt van dat na de klassieke cytotoxische therapie. De anti-angiogene therapie zou kunnen leiden tot meer invasief en metastatisch gedrag. (figuur 9 deel A)

Het concept van normalisatie van tumorvaten werd geïntroduceerd door Rakesh Jain in 2001(55) (figuur 9 deel B). De herinstelling van het evenwicht tussen pro- en anti-angiogene factoren kan de tumorvasculatuur normaliseren en de werking ervan verbeteren. VEGF-inhibitie zou de functie van de bloedvatvasculatuur tijdelijk normaliseren met een daling van de vasculaire permeabiliteit en een herstel van de interstitiële drukgradiënten. De normalisatie zorgt voor een betere perfusie van de tumor. Dit leidt tot een verhoogde respons op bestraling, immunotherapie en chemotherapie en voorkomt eveneens de evolutie naar maligniteit en metastase (56). Bij bepaalde tumoren is het aangetoond dat een combinatie van cytotoxische therapie en anti-angiogene therapie een synergistisch effect heeft (39, 56). Een aantal studies hebben de waarde en de klinische voordelen van angiogeneseremming bewezen bij verschillende vormen van kanker.

De normalisatie van tumorbloedvaten door anti-VEGF antilichamen is echter niet altijd voordelig. In het geval van hersentumoren zou het normalisatieproces de bloed-hersenbarrière opnieuw functioneel maken en zo het afleveren van chemotherapie verstoren (45).



Figuur 9 - Hypothese A: Angiogeneseremmers vernietigen de abnormale tumorvaten en kunnen zo de intratumorale hypoxie verergeren. Dit kan een prometastatische switch veroorzaken bij de tumorcellen.



Figuur 9 – Hypothese B - Normalisatie: Angiogeneseremmers normaliseren de tumorvaten en verbeteren de doorbloeding. Door hypoxie te vermijden en de bloedvatwand te normaliseren zou invasie en metastase worden vermeden. Chemo- en radiotherapie kunnen hun werking beter uitoefenen (39).

3. Angiogeneseremmers

Aangezien angiogenese essentieel is voor tumorgroei en metastase, is dit een veelbelovend therapeutisch doelwit in de controle van tumorprogressie. De angiogeneseremmers zijn een relatief recente groep van medicijnen. Meer dan 30 jaar na de hypothese van J. Folkman kwam bevacizumab als eerste angiogenese-inhibitor op de markt in 2004. Sindsdien is de lijst van inhibitoren aangegroeid en op dit moment zijn er talloze klinische trials in uitvoering. Een volledig overzicht hiervan zou het doel van deze masterproef voorbijstreven. Met dit overzicht wordt geprobeerd de grote groepen weer te geven met telkens hun belangrijkste angiogeneseremmers momenteel op de markt of in ontwikkeling.

3.1. Inhibitoren van groeifactoren: VEGF, FGF2

Bevacizumab (Avastin) is een van de meest bestudeerde angiogeneseremmers. Het is een gehumaniseerd recombinant monoklonaal antilichaam dat VEGFA bindt en de binding met zijn receptor verhindert (57). In 2004 was het de eerste angiogenese-inhibitor die goedgekeurd werd door de FDA (U.S. Food and Drug Administration) voor commercieel gebruik, met name voor de behandeling van gevorderd carcinoom van colon en rectum in combinatie met 5-fluorouracil (58). Door het Europees agentschap voor medicatie (EMA) is zijn gebruik goedgekeurd bij gemetastaseerd carcinoom van colon of rectum in combinatie met 5-fluorouracil, bij gemetastaseerde borstkanker in combinatie met paclitaxel of capecitabine, bij gevorderd, gemetastaseerd of recurrent niet-kleincellig longcarcinoom (NSCLC) in combinatie met platinum-chemotherapie, bij gevorderde of gemetastaseerde nierkanker in combinatie met interferon alfa-2a en bij gevorderde epitheelkanker van ovarium, eileider of peritoneum in combinatie met carboplatinum en paclitaxel (59-61).

Het bewijs voor gebruik in deze indicaties is niet altijd even eenduidig en significant. In 2008 keurde de FDA zijn gebruik goed voor gemetastaseerde HER2-negatieve borstkanker in combinatie met paclitaxel. Deze indicatie is opnieuw ingetrokken bij gebrek aan voldoende bewijs (62). In Europa werd de goedkeuring voor de combinatie met docetaxel in 2010 ingetrokken.

Monotherapie met bevacizumab is in het algemeen niet effectief. Een mogelijke uitzondering hierop is zijn gebruik bij recurrent glioblastoma (63), hoewel dit sterk ter discussie staat. EMA heeft overigens geen goedkeuring gegeven in deze indicatie.

Bij de bovenstaande indicaties vindt men vooral een klinisch significant effect in combinatie met bestaande chemotherapie. Dit synergistisch effect kan echter ook leiden tot meer nevenwerkingen en men moet een balans zoeken tussen de therapeutische winst en de toegenomen toxiciteit, bijvoorbeeld trombo-embolie of bloeding. Bv. bij NSCLC met belangrijke comorbiditeit is het belang van toxiciteit groter dan de therapeutische winst (64).

Interferon- α (IntronA) is voornamelijk bekend omwille van zijn immunologische, antivirale effecten bij hepatitis. Het endogene cytokine inhibeert echter ook de bFGF-expressie en VEGF-transcriptie (57). Lage dosissen IFN- α verlagen de expressie van FGF in kankercellen en dit is mogelijk een van de mechanismen van de antiangiogene activiteit. Zijn effectiviteit is voornamelijk aangetoond bij hematologische maligniteiten. IFN- α werd voor het eerste gebruikt als therapie bij hemangioendothelioma. Het is goedgekeurd door de FDA en EMA voor gebruik bij haarcelleukemie, bij maligne melanoma in adjuvante setting bij chirurgie en bij agressief folliculair lymfoom in combinatie met anthracycline chemotherapie. Bij EMA geeft men verder nog de indicaties multipel myeloom, carcinoïde tumoren en chronische myeloïde leukemie in combinatie met cytarabine (61). Een groot deel van deze indicaties is intussen evenwel achterhaald. Het relatief belang van de immunologische dan wel anti-angiogene effecten van IFN- α is minder goed gekend(62).

Aflibercept (Eylea, Zaltrap) is een oplosbaar fusieproteïne bestaande uit het extracellulaire domein van VEGFR1 en VEGFR2 en het Fc deel van IgG. Het bindt zowel VEGFA (VEGF-trap) als PlGF met een hogere affiniteit dan de monoklonale antilichamen(59). Eylea wordt gebruikt voor de behandeling van neovasculaire (exsudatieve) leeftijdsgebonden maculaire degeneratie (62). Zaltrap voor gemetastaseerde kanker van colon en rectum in combinatie met FOLFIRI (irinotecan, 5-fluorouracil en folinezuur) (61).

Ranibizumab (Lucentis) is een monoklonaal AL tegen VEGFA en **pegaptanib (Macugen)** is een enkelstrengig nucleïnezuur aptameer dat het heparinebindend domein van VEGFA165 bindt (58). Beide zijn goedgekeurd voor gebruik bij neovasculaire leeftijdsgebonden maculaire degeneratie (61, 62).

Verder vinden we in deze groep ook **ramucirumab, suramine, suradiste etc.**

3.2. Inhibitoren van de receptoren van de angiogenetische factoren

Inhibitoren van receptor tyrosine kinases (RTK's) hebben een tweevoudige inhibitie. Zowel de oncogene signaaltransductie als de downstream angiogene processen worden geblokkeerd. Vaak hebben ze meerdere doelreceptoren en beïnvloeden ze zowel endotheelcellen als tumorcellen omdat beide vaak dezelfde receptoren tot expressie brengen (59). (Voor afkortingen zie bijlage 3: afkortingen)

Sorafenib (Nexavar) is een kleine molecule die verschillende RTK's inhibeert zoals c-KIT, Flt3, RET, VEGFR1, 2 en 3 (65) en PDGFR β (62). Daarnaast heeft het ook een effect op het intracellulaire Raf-kinase met invloed op de MAPK of Raf/MEK/ERK signaalwegen (64). Zijn gebruik is goedgekeurd voor niet reseceerbaar hepatocellulair carcinoom (66) en voor gevorderd niercelcarcinoom (RCC) (39, 61). **Sunitinib (Sutent)** inhibeert eveneens verschillende moleculen, met name VEGFR, PDGFR, Flt-3, c-kit, RET en CSF-1R (65). Zijn gebruik is goedgekeurd bij gastrointestinale stromale tumoren (GIST) na falen van imatinib, bij gevorderd RCC en bij goed gedifferentieerde pancreatische neuroendocriene tumoren (pNET) (39, 61, 62). Bij pancreaskanker wordt momenteel ook onderzoek gedaan naar de combinatie van deze multikinase inhibitoren met inhibitoren van de PI3K/mTOR-signalweg zoals everolimus(67, 68). In een fase III klinisch trial werd een significant voordeel gezien van sunitinib ten opzichte van IFN- α bij de behandeling van gemetastaseerd RCC (69). In een meta-analyse van multikinase inhibitoren bij gemetastaseerd RCC werd dit bevestigd. Men vond een beperkt klinisch voordeel van sunitinib ten opzichte van sorafenib en pazopanib op vlak van PFS. Voor de bevestiging hiervan zijn echter meer RCT's nodig (70). Sorafenib en sunitinib kunnen oraal worden toegediend en kennen als voornaamste bijwerkingen hypertensie, hand-voet syndroom, toxische effecten huid en lymfopenie. Ook cardiovasculaire- en levertoxiciteit zijn belangrijke bijwerkingen van de inhibitoren van de tyrosinekinases en vereisen een strikte opvolging (71, 72).

Pazopanib (Votrient) is geïndiceerd bij gevorderd RCC (39) en zacht weefsel sarcoom in 2^e lijn (61, 62, 73). Voor de behandeling van RCC loopt momenteel een vergelijkende studie met sunitinib. **Vandetanib (Caprelsa)** is actief tegen EFGR, VEGFR, RET, BRK, TIE2 en leden van de EPH-receptor kinase families en Src tyrosinekinase families. Het wordt gebruikt

bij patiënten met medullaire schildklierkanker waarbij resectie niet meer mogelijk is omwille van lokale uitgebreidheid of metastasen. Het effect van vandetanib zou minder significant zijn in tumoren zonder mutatie in het RET-gen. Deze mutatie is een belangrijke predictieve factor voor de werking van vandetanib (39, 61, 62). **Axitinib (Inlyta)** is een inhibitor van VEGFR (65). In een gerandomiseerd fase III onderzoek bij RCC toonde het een significant langere progressievrije overleving (PFS) in vergelijking met sorafenib (74) en het werd goedgekeurd voor de 2^e lijnsbehandeling van gevorderd RCC (61, 62). **Cabozantinib** is een kleine molecule met inhibitie van de tyrosine kinases RET, c-Met en VEGFR2. Zijn gebruik is door de FDA goedgekeurd voor de behandeling van medullaire schildklierkanker (62) en verder onderzoek naar andere indicaties zoals glioblastoma of prostaatkanker is in uitvoering. In Europa is zijn gebruik nog niet goedgekeurd. **Regorafenib (Stivarga)** inhibeert de kinasen VEGFR, KIT, PDGFR, FGFR en TIE2. Zijn gebruik is door de FDA goedgekeurd voor uitgezaaide kanker van colon of rectum na falen van fluoropyrimidine-, oxaliplatine-, irinotecan-gebaseerde chemotherapie, een anti-VEGF- en een anti-EGFR therapie (62).

Imatinib (Gleevec of Glivec) wordt ook bij deze groep angiogeneseremmers onderverdeeld. Naast zijn activiteit tegen het Bcr-Abl eiwit bij chronische myeloïde leukemie inhibeert het ook PDGFR en c-kit. Gleevec wordt gebruikt bij patiënten met kit(CD117)-positieve niet-reseceerbare en/of gemetastaseerde GIST. Voor deze indicatie zijn er echter nog geen RCT's die een klinisch voordeel aantonen(62). Verder is zijn gebruik ook goedgekeurd bij myelodysplastische en myeloproliferatieve ziekten met afwijkingen in de PDGFR, bij dermatofibrosarcoma protuberans indien chirurgie niet mogelijk is en tot slot ook bij het gevorderd hypereosinofiel syndroom of chronische eosinofiele leukemie met afwijkingen in de genen FIP1L1 en PDGFR (61).

Ook de EGFR inhibitoren remmen de angiogenese. Studies hebben aangetoond dat EGF/EGFR inhibitoren eerder een reductie teweegbrengen van pro-angiogene cytokines dan dat ze de angiogenese op een directe manier inhiberen(59). De intracellulaire signaalwegen van EGFR en VEGFR convergeren wat deels de oorzaak is van het angiogene effect van EGF(58). **Cetuximab (Erbix)** is een chimeer monoklonaal AL tegen EGFR. Zijn gebruik is goedgekeurd door de EMA en FDA bij spinocellulaire carcinomen in het hoofd- en halsgebied. Afhankelijk van type en stadium van de tumor in combinatie met radiotherapie, platinumgebaseerde chemotherapie of 5-FU (62). Ook bij uitgezaaide kanker van colon of rectum is cetuximab geïndiceerd in combinatie met irinotecan of met het volledige FOLFIRI-

regime (61, 62). **Panitumumab (Vectibix)** is eveneens een monoklonaal AL tegen EGFR. Het wordt gebruikt bij gemetastaseerd colorectaal carcinoom in combinatie met de FOLFIRI of FOLFOX chemotherapie, na falen van fluoropyrimidine, oxaliplatine en irinotecan chemotherapie (58) (75). Panitumumab werkt niet indien de tumor een KRAS-mutatie heeft. De stimulatie van de tumorgroei wordt dan niet geblokkeerd door blokkade van EGFR(61). **Erlotinib (Tarceva)** is een kleine molecule die EGFR/HER1 inhibeert. Zijn antitumoraal effect zou op zijn minst deels veroorzaakt worden door de inhibitie van de expressie van proangiogene factoren. Het wordt gebruikt in combinatie met gemcitabine bij niet-reseceerbare of uitgezaaide pancreaskanker. Bij NSCLC staat zijn gebruik ter discussie. De EMA heeft het gebruik goedgekeurd bij gemetastaseerd NSCLC met een mutatie in het EGFR-gen of bij patiënten die stabiel blijven na 4 cycli van de standaard chemotherapie met platinum (61, 62). **Lapatinib (tyverb)** wordt gebruikt bij borstkanker met een overexpressie van HER2 (ErbB2), enkel als 2^e lijnsterapie in combinatie met capecitabine of in combinatie met een aromatase inhibitor bij postmenopauzale vrouwen waarbij hormoontherapie is geïndiceerd (61, 62). **Gefitinib (Iressa)** is ook een inhibitor van EGFR. Deze molecule was geïndiceerd als monotherapie voor de behandeling van lokaal uitgebreid of gemetastaseerd NSCLC na falen van platinum- en docetaxelgebaseerde chemotherapie. Grote RCTs hebben echter geen klinisch significant voordeel kunnen aantonen en in 2005 heeft de FDA aangeraden gefitinib enkel nog te gebruiken bij patiënten die het al genomen hebben en waarvan de arts denkt dat het helpt (62). In Europa is het gebruik bij NSCLC nog steeds goedgekeurd (61).

Trastuzumab (Herceptin) is een gehumaniseerd monoklonaal AL tegen HER2 en de inhibitie hiervan geeft indirect een daling van EGFR aan het celoppervlak. Zijn effect is voornamelijk gebaseerd op het stoppen van de celcyclus door blokkade van HER2 maar daarnaast heeft trastuzumab ook een onderdrukkend effect op de angiogenese. Zijn gebruik is geïndiceerd bij tumoren die HER2 overmatig tot expressie brengen, met name borstkanker en gemetastaseerd adenocarcinoom van de maag of gastro-oesofageale junctie (61, 62).

3.3. Thalidomide en analogen

Thalidomide is berucht omwille van zijn teratogene effecten. Zijn werkingsmechanisme is niet exact gekend. Het inhibeert TNF- α in monocytten, microglia en Langerhanscellen en deze anti-inflammatoire activiteit zou bijdragen tot zijn antiangiogene effecten. Thalidomide wordt toegepast bij verscheidene aandoeningen, onder andere bij multipel myeloom in combinatie

met dexamethasone (61) en voor de acute en chronische behandeling van erythema nodosum leprosum (58, 62). Zijn gebruik bij multipel myeloom werd geïnitieerd na de vaststelling dat een hogere densiteit van bloedvaten in multipel myeloom gerelateerd is met een kortere overlevingsduur(76). **Lenalidomide (Revlimid)** is een meer potent analoog van thalidomide. Het wordt eveneens gebruikt bij multipel myeloom (59) en bij myelodysplastische syndromen geassocieerd met een 5q deletie (61, 62). Verder is zijn gebruik ook versneld goedgekeurd via het 'orphan designation' programma van de EMA voor chronische myeloïde leukemie, diffuus groot B-cellymfoom en mantelcellymfoom. **Pomalidomide (Pomalyst)** is ook een analoog van thalidomide. Zijn gebruik is goedgekeurd voor multipel myeloom na minstens 2 voorgaande therapieën met lenalidomide en bortezomib (62). Zijn gebruik is via het 'orphan designation' programma ook goedgekeurd bij myelofibrose en systemische sclerose. Deze goedkeuring met het 'orphan designation' programma is geen toestemming tot commercialisering. Deze zogenaamde weesgeneesmiddelen zijn producten die nog steeds in onderzoek zijn. Voor deze categorie geneesmiddelen worden extra middelen vrijgemaakt om hun ontwikkeling te versnellen en het op de markt brengen aantrekkelijker te maken voor de farmaceutische industrie. Bij deze groep moleculen, verwant met thalidomide, moet men vooral waakzaam zijn voor veneuze thromboembolen, teratogene en hematologische bijwerkingen(62).

3.4. Inhibitoren van de PI3K/AKT/mTOR signaalweg

Opregulatie van deze signaalweg stimuleert angiogenese via verschillende mechanismen, onder andere door een verhoogde expressie van HIF-1 α . **Temsirolimus (Torisel)** is een kleine molecule die 'mammalian target of rapamycin' (mTOR) inhibeert. Dit is een serine-threonine kinase dat een rol speelt bij de controle van celdeling. Temsirolimus wordt gebruikt bij gevorderd RCC (58, 62). Door Europa is zijn gebruik ook goedgekeurd bij mantelcellymfoom in 2^e lijn(61). **Everolimus (Afinitor, Votubia)** is een analoog van temsirolimus. Zijn gebruik is goedgekeurd bij HER2-negatieve, hormoonreceptor-positieve borsttumoren in combinatie met exemestane (77), bij niet-reseceerbare of uitgezaaide neuroendocriene tumoren van pancreatische origine (pNET), bij RCC na falen van therapie met sunitinib of sorafenib (78) en tot slot ook bij patienten met het tubereuze sclerosecomplex in geval van een renaal angiomyolipoma of een subependymaal reuzencel astrocytoom (61, 62).

Naast de twee bovenstaande zijn ook in deze groep vele moleculen in onderzoek. Onder andere bij borstkanker, pancreaskanker en mantelcellymfoom zouden deze onderzoeken in de toekomst moeten leiden tot een beter, geïndividualiseerd gebruik van de mTOR-inhibitoren (59, 79-81).

3.5. Inhibitoren remodellering van extracellulaire matrix

De MMPI's waren een veelbelovende groep angiogeneseremmers maar tot nu toe is hun toepassingsveld beperkt. Hun effectiviteit is nog niet bevestigd en meer onderzoek is nodig. Voor **batimastat** zijn de klinische studies opgeschort door zijn onoplosbaarheid en daardoor lage orale biobeschikbaarheid (12). **Marimastat** is gerelateerd aan batimastat en kent een gelijkaardig spectrum met een beter farmacologisch profiel (12). In deze groep kent men verder nog Salimatat, Prinomastat, Tanomastat etc.

3.6. Inhibitoren celadhesiemoleculen

Alfa_vbeta₃-integrine is een belangrijke adhesiereceptor tussen de endotheelcel en de extracellulaire matrix. Deze wordt bijna uitsluitend tot expressie gebracht door geactiveerde endotheelcellen en is dus een aantrekkelijk target voor anti-angiogene therapie. **LM609** is een monoklonaal AL tegen alfa_vbeta₃. **Vitaxine** is de gehumaniseerde vorm van LM609. **Cilengitide** is een cyclisch peptide dat zowel alfa_vbeta₃ en alfa_vbeta₅-integrines als doelwit heeft. Het werd getest bij glioblastoma en vertoonde hierbij een hoopgevende activiteit zowel in monotherapie als in associatie met radiotherapie en temozolomide (60, 82). De therapeutische opties in de behandeling van glioblastoma zijn nog steeds beperkt en hopelijk kan men met cilengitide en het eerder vermelde bevacizumab de behandelingsmogelijkheden uitbreiden.

3.7. MAPK-farnesyltransferase, Rho- en Ras-inhibitoren

Bij activatie van Ras wordt een farnesylgroep getransfereerd op een cysteïne residu wat ervoor zorgt dat Ras kan interageren met intracellulaire membranen. Zonder farnesylatie gebeurt deze interactie niet en wordt de MAPK-signaalweg niet geactiveerd. Ras is ook betrokken bij de stabilisatie van HIF-1alfa en het inhiberen van Ras vermindert de transcriptionele activiteit van HIF. Sorafenib, hierboven vermeld, werkt ook in op de MAPK-

signaalweg door inhibitie van Raf. **Tipifarnib** is de best gekende farnesyltransferase inhibitor. Zijn gebruik is via het weesgeneesmiddelenprogramma voorlopig goedgekeurd voor het gebruik bij acute myeloïde leukemie(61). Ook bij andere hematologische maligniteiten zoals chronische myeloïde leukemie of multipel myeloom zijn klinische trials in uitvoering. De selectie van patiënten door middel van biologische merkers is ook hier, net als bij alle angiogeneseremmers, zeer belangrijk voor het bekomen van goede resultaten(83).

3.8. De HIF-signalweg en bindingspartners

Omwille van de belangrijke rol van HIF bij het opstarten van het angiogenetisch proces is er onderzoek gedaan naar moleculen die hierop inwerken. In deze groep bestaan evenmin stoffen die op de markt beschikbaar zijn.. **Echinomycine** bindt een regio in de HRE (HIF-responsive element)-DNA-sequentie en blokkeert zo de transcriptie van HIF. Dit werd in vitro bewezen maar de klinische trials tot nu toe zijn teleurstellend. **Chetomine** verhindert de binding van p300 aan HIF maar heeft te veel toxische bijwerkingen zoals coagulatieve necrose op de plaats van injectie. **2-methoxyestradiol (2ME2)** is een humane metaboliet van estradiol en inhibeert de polymerisatie van tubuline. Dit veroorzaakt een stop van de celcyclus. Men heeft ook ontdekt dat 2ME2 het HIF-1alfa niveau verlaagt door inhibitie van translatie of door een stijging in de proteasomale degradatie. Zijn anti-angiogene eigenschappen lijken veroorzaakt te worden door zowel direct inhibitie van endotheelcellen als door inhibitie van HIF-1alfa.

Stofnaam	Werkingsmechanisme	Goedgekeurd gebruik
Bevacizumab	Recombinant monoklonaal AL tegen VEGF	Colorectaal carcinoom, borstkanker, NSCLC, nierkanker, epitheelkanker van ovarium, eileider of peritoneum
Interferon alfa	Inhibitie van productie van angiogene factoren Inhibitie expressie van bFGF	Haarcelleukemie, chronische myeloïde leukemie, multipel myeloom, folliculair lymfoom, carcinoïde tumor, maligne melanoma
Aflibercept	Fusieproteïne tegen VEGFA en PlGF	neovasculaire exsudatieve leeftijdsgerelateerde maculaire degeneratie, colorectaal carcinoom
Ranizumab	Monoklonaal AL anti-VEGFA	Exsudatieve leeftijdsgerelateerde maculaire degeneratie
Pegaptanib	Enkelstrengig nucleïnezuur aptameer tegen heparinebindend domein van VEGFA165	Exsudatieve leeftijdsgerelateerde maculaire degeneratie
Sorafenib	Kleine molecule inhibitor van c-kit, FLT3, RET, VEGFR1, 2 en 3, PDGFRbeta	Hepatocellulair carcinoma, RCC
Sunitinib	TKI: VEGFR, PDGFR, Flt-3, c-kit, RET en (CSF)-1R	Gastrointestinale stromale tumor (GIST), RCC, pancreatische neuroendocriene tumoren(pNET)
Pazopanib	TKI: VEGFR, PDGFR, c-kit	RCC, zacht weefsel sarcoom
Vandetanib	TKI: HER2	Medullaire schildklierkanker
Axitinib	TKI: VEGF	RCC
Cabozantinib	TKI: RET, c-Met, VEGFR2	Medullaire schildklierkanker
Regorafenib	TKI: VEGFR, kit, PDGFR, FGFR, Tie2	Colorectaal carcinoom
Imatinib	TKI: Bcr/Abl, c-kit, PDGFR	GIST, myelodysplastische en myeloproliferatieve, dermatofibrosarcoma protuberans, gevorderd hypereosinofiel syndroom of chronische eosinofiele leukemie
Cetuximab	Monoklonaal AL tegen EGFR	Hoofd- en halskanker, colorectaal kanker
Panitumumab	Monoklonaal AL anti-EGFR (TKI??)	Colorectaal carcinoom
Erlotinib	TKI:EGFR	NSCLC, pancreaskanker
Lapatinib	Kinase inhibitor	Borstkanker met overexpressie van HER2
Gefitinib	TKI: EGFR	Lokaal uitgebreid of uitgezaaide NSCLC
Trastuzumab	Indirecte daling EGFR via inhibitie HER2	HER2-positieve borstkanker en adenocarcinoom van de maag of gastro-esofagale junctie
Thalidomide	Niet-VEGF gebaseerde anti-angiogenese, ook anti-inflammatoir en immunomodulatoir	Multipel myeloom
Lenalidomide	Analoog van thalidomide	Multipel myeloom
Pomalidomide	Analoog van thalidomide	Multipel myeloom
Temsirolimus	Inhibitor mTOR	RCC
Everolimus	Analoog van temsirolimus	Borstkanker, neuroendocriene tumoren van pancreatische oorsprong, RCC, tubereus sclerose complex
Tipifanib	Inhibitor farnesyltransferase	Acute myeloïde leukemie

Tabel 1: Door de ‘European medicines agency’ goedgekeurde moleculen, hun mechanisme en hun indicaties(62) met een ‘European public assessment report’. De indicaties worden meer gedetailleerd beschreven in de tekst

V. Discussie

1. Simmondsines

1.1. Anorexigene en toxische effecten

Over het dosisgerelateerde anorexigene effect bij ratten en het mechanisme hierachter zijn de meeste auteurs het eens. Van de verschillende simmondsines heeft dimethylsimmondsine het krachtigste anorexigene effect. De rol van CCK en de nervus vagus is herhaaldelijk aangetoond met uitzondering van een studie van York et al (22). Recentere studies tonen echter ook het belang van smaak en aversie aan als oorzaak van de daling van de voedselinname. Bijvoorbeeld in de studie bij honden, gevoed met jojobameel, beschouwde men een aversief effect als primair mechanisme. Dit limiteert de toepassing van jojobameel als dieet voor gewichtscontrole bij honden, met uitbreiding naar andere diersoorten.

Over de mogelijke toxische effecten lopen de studies meer uiteen. In recente onderzoeken wordt de toxiciteit uit oudere onderzoeken toegeschreven aan onzuiverheden in de simmondsines en werd het belang naar voor gebracht van goede zuiverings- en extractiemethodes. Zuivere simmondsines zouden in een lage dosis geen significante neveneffecten hebben. Het onderdrukkend effect van een hoge dosis simmondsine op de aanmaak van rode en witte bloedcellen in het beenmerg moet echter nog verder onderzocht worden. Men concludeerde dat het bij ratten mogelijk is een concentratie te bepalen met een anorexigene effect zonder significante neveneffecten op lange termijn (2). Dimethylsimmondsine, en in mindere mate dimethylsimmondsineferulaat, zouden gebruikt kunnen worden als niet-toxische inhibitor van de voedselinname, op voorwaarde dat hun gebruik beperkt blijft tot de volwassen dieren (17). Toch moeten we opletten bij het maken van dergelijke conclusies. Men moet waakzaam blijven bij het gebruik van simmondsines als vermageringsproduct voor humane consumptie aangezien commerciële preparaten niet garanderen dat ze geen andere simmondsines bevatten dan dimethylsimmondsine. En zelfs als de formule 100% dimethylsimmondsine zou bevatten, zou het bijwerkingen kunnen hebben

door zijn inhiberende effecten op angiogenese, met vooral risico's voor zwangere vrouwen en kinderen (17).

1.2. Effecten op voortplanting en angiogenese

Bij ratten werden geen effecten op voortplanting aangetoond en een teratogeen effect op de botontwikkeling werd evenmin aangetoond (34). Bij onderzoek naar de anorexigene effecten bij jonge, groeiende kippen hadden simmondsines wel een irreversibele inhibitie op de ontwikkeling van de eileiders. Dit schreef men toe aan andere factoren aanwezig in het jojobameel. De latere ontdekking van de anti-angiogene eigenschappen van simmondsines gaf hier een verklaring voor. De experimenten uitgevoerd door D'Oosterlynck et al, beschreven in het rapport uit 2008 toonden aan dat simmondsines en niet de PCAD uit het jojobameel verantwoordelijk waren voor het falen van de voortplanting. Dit falen kwam bovendien door de angiogeneseremmende effecten en niet door de anorexigene effecten van simmondsines. Het negatief effect op de voortplanting toont dus duidelijk de angiogeneseremmende effecten aan van simmondsines en toont ook aan dat deze krachtig genoeg zijn om invloed te hebben op proefdieren.

De onderzoeken naar de angiogenese-inhiberende eigenschappen vertonen duidelijke overeenkomsten. In een CAM-assay wordt aangetoond dat zowel het totale polaire extract als het zuiver dimethylsimmondsine de VEGF-geïnduceerde angiogenese inhiberen. Het totale polaire extract deed dit echter krachtiger, wat suggereerde dat andere simmondsinecomponenten een krachtiger of synergistisch effect zouden hebben ten opzichte van zuiver dimethylsimmondsine. De resultaten van de in vitro VEGF-geïnduceerde proliferatie van endotheelcellen (HUVEC) lagen op dezelfde lijn. Desmethyl- en didesmethylsimmondsine vertoonden een significant sterkere inhibitie van proliferatie dan dimethylsimmondsine. Dimethylsimmondsineferulaat toonde een gelijkaardig krachtig inhiberend effect. De reden voor het verschil in effect tussen dimethylsimmondsine en zijn ferulaat zijn niet gekend. Door D'Oosterlynck et al werden deze resultaten bevestigd. In hun experiment hadden dimethylsimmondsines geen enkel effect op de VEGF-geïnduceerde HUVEC proliferatie.

Bij onderzoeken met HUVEC moet men wel opmerken dat dit endotheelcellen zijn uit de umbilicale vene, dus macrovasculatuur, terwijl angiogenese voornamelijk plaatsvindt ter hoogte van de microvasculatuur. Deze endotheelcellen kunnen dus andere eigenschappen

hebben en anders reageren op bepaalde testmoleculen (38). Een tekortkoming van de meetmethode met ^3H -thymidine incorporatie is het onduidelijke onderscheid tussen inhibitie van proliferatie of celdood (17).

Uit de experimenten uitgevoerd met HUVEC eenlagig verdeeld op het celoppervlak werd ook de inhibitie van bFGF-geïnduceerde proliferatie bewezen. Belangrijk was dat de niet-delende cellen na continue behandeling met de verschillende simmondsinemoleculen niet afstierven. Omdat deze stoffen invloed hadden op de bFGF-geïnduceerde celproliferatie maar niet op niet-delende cellen zijn ze interessant voor de behandeling van kanker. Dit impliceert dat dit product niet negatief interfereert met de normale, bestaande bloedvaten. Een uitzondering hierop was een partieel gezuiverde fractie (+/- 65%) met voornamelijk simmondsineferulaten, die wel cytotoxisch bleken.

Ook in het experimenteel onderzoek met 3D-fibrinematrices, die het voordeel hebben dat zij de in vivo situatie al meer nabootsen, werd tubevorming geïnhibeerd door alle simmondsinesderivaten en dit op een concentratieafhankelijke wijze. De sterkste inhibitoren waren desmethylsimmondsine en een mix van simmondsineferulaten, maar ook dimethylsimmondsine inhibeerde de tubevorming.

Dimethylsimmondsine vertoont bij deze onderzoeken een interessant potentieel door geen effect te hebben op de HUVEC-proliferatie maar wel de tubevorming te inhiberen. Dit suggereert een ander werkingsmechanisme dan de overige simmondsinecomponenten. Deze andere componenten inhiberen zowel de endotheelcelproliferatie als de tubevorming. Meer in vitro en vivo experimenten met verschillende testen zijn nodig om het exacte werkingsmechanisme achter deze remming te achterhalen.

In tegenstelling tot het anorexigene effect waarbij dimethylsimmondsine de krachtigste effecten heeft, spelen bij het angiogeneseremmende effect andere simmondsines een belangrijke rol. Desmethyl-, didesmethylsimmondsine en bepaalde ferulaten vertonen de meest potente inhiberende eigenschappen. Van de mix van ferulaten werd echter ook de cytotoxiciteit in een lage concentratie aangetoond. Men zou verder onderzoek moeten doen om exact uit te zoeken wat de krachtigste inhibitoren zijn onder de simmondsinecomponenten. Deze kan men dan zuiver gaan onderzoeken om eventuele bijwerkingen van andere simmondsines of jojobameelcomponenten te vermijden. Het kan

echter ook zijn dat de simmondsinecomponenten juist krachtig werken door synergie met elkaar.

Bij meer gecompliceerde testen waren de resultaten minder duidelijk en minder hoopgevend. De in vivo test met de matrigelkamers bevestigde de eerdere experimenten. Jojobameel inhibeert de bloedvatgroei. Hoewel met een matrigel een natuurlijke omgeving wordt nagebootst moet men bij de extrapolatie van resultaten echter nog steeds voorzichtig blijven door onder andere de aanwezigheid van groeifactoren en cytokines (ook in een groeifactorgereduceerde matrigel)(38). Het onderzoek met de matrigelkamers uitgevoerd door D'Oosterlynck et al had bovendien nog een belangrijke tekortkoming. Men gebruikte slechts een beperkt aantal proefdieren, 2 keer 2 muizen. Bij het onderzoek met matrigelangioreactors waarin tumorvorming werd geïnduceerd kon de remming van tumor-geïnduceerde bloedvatgroei echter niet worden aangetoond.

Het experiment met de fetale metatarsalen benadert beter het ware angiogeneseproces omdat ook de omgevende cellen, zoals gladde spiercellen en pericyten, en de micro-omgeving een rol spelen. Het model is echter niet volledig representatief voor de micro-omgeving van een tumor. Een groot aantal factoren vrijgesteld door tumoren en de tumorcellen zelf zijn niet aanwezig (38). De resultaten van deze experimenten waren eveneens minder eenduidig, het totale polaire extract oefende een krachtig anti-angiogenetisch effect uit, maar de afzonderlijke componenten niet.

Het onderzoek uit Gent met waarin men muizen met tumorcellen injecteerde vertoonde een gebrekkige opzet en design, onder andere door te jonge muizen te gebruiken. Door de subcutane implantatie van tumorcellen kan men de groei en het gewicht makkelijk meten. Deze tumorcellen worden echter heterotoop ingeplant en men weet niet of tumoren hetzelfde gaan reageren op een bepaalde stof op verschillende anatomische locaties. Het belang van de micro-omgeving is bij angiogenese duidelijk aangetoond(13, 38). Een ander nadeel van dit tumormodel is dat de tumoren uitgroeien op enkele weken, dit in tegenstelling tot een menselijke kanker die zich ontwikkelt op maanden tot jaren (38). Men toonde aan dat de tumoren van de controlegroep en van de de groep gevoed met jojobameel alleszins duidelijk verschillend evolueerden en dit wijst op een belangrijk effect. De vermelde beperkingen van het onderzoek zouden de opmerkelijke resultaten kunnen verklaren.

Uit al deze studies kan men besluiten dat simmondsines duidelijk een invloed hebben op de angiogenese. In in vitro en eenvoudige ex vivo of in vivo experimenten werden de angiogeneseremmende eigenschappen bewezen. In meer complexe experimenten met tumor-geïnduceerde endotheelcelproliferatie konden deze effecten nog niet aangetoond worden. De reden hiervoor kan zijn dat de simmondsines simpelweg toch niet krachtig genoeg zouden zijn. Het niet kunnen aantonen van de angiogeneseremmende effecten zou echter ook kunnen komen door de gebrekkige opzet van studies en fouten in de uitvoering ervan. Het onderzoek naar de angiogenetische eigenschappen van simmondsines is zeer recent gestart en nog te beperkt om dergelijke conclusies te trekken. Verder onderzoek is noodzakelijk.

2. Angiogenese en inhibitoren

2.1. Angiogenese

De kennis over het angiogenetisch proces is zeer uitgebreid en blijft groeien. Regelmatig worden nieuwe factoren ontdekt die een invloed hebben op de bloedvatvorming. Het angiogeen proces dat in deze masterproef wordt beschreven, is een vereenvoudiging en heeft niet als doel alle mogelijke factoren en invloeden weer te geven. Er bestaan nog andere, voorlopig minder goed gekende pathways. Deze verschillende signaleringscascades werken bovendien niet onafhankelijk van elkaar maar zijn vaak met elkaar gelinkt en beïnvloeden elkaar. Een voorbeeld is het Slit ligand dat bindt op de vaatspecifieke receptor ROBO4 en hierbij de signalisatie van VEGF en FGF inhibeert (46). Verder onderzoek moet uiteindelijk leiden tot een algemeen, samenhangend model. De huidige snelle groei van de informatie omtrent angiogenese is veelbelovend. Om het angiogeneseproces beter te kunnen manipuleren is ook een beter begrip nodig van de alternatieve bloedvatvormingsmechanismen zoals vasculogenese, intussusceptie en lus angiogenese. Hoe zitten deze processen moleculair in elkaar en wat is hun bijdrage tot de vorming van bloedvaten? De mechanismen van neo-angiogenese bij tumoren zijn echter zeer gecompliceerd en bovendien vertoont elke tumor unieke kenmerken afhankelijk van zijn weefselspecificiteit, micro-omgeving, stadium.

2.2. Angiogeneseremmers

Het aantal angiogeneseremmers in onderzoek is enorm en hun toepassingsveld breidt jaarlijks uit. In 2004 werd de eerste angiogeneseremmer goedgekeurd en momenteel zijn een groot

aantal klinische studies in uitvoering. In theorie en ook in de preklinische studies waren hun resultaten veelbelovend. Toch heeft het klinische gebruik van angiogeneseremmers niet altijd de verwachte resultaten gebracht. De goedgekeurde stoffen vertonen een klinisch voordeel in bepaalde categorieën van patiënten maar de klinische studies zijn niet altijd even eenduidig en overtuigend. De verschillen die bestaan tussen de medicatie goedgekeurd door de FDA en door het Europese medisch agentschap tonen dit aan.

Bij het ontwikkelen van angiogeneseremmers mag men bovendien de rol van de farmaceutische industrie niet uit het oog verliezen. Een opmerkelijk voorbeeld hiervan is het debat over de behandeling van leeftijdsgebonden maculaire degeneratie. Ranibizumab is hiervoor goedgekeurd maar is een duur medicijn. Bevacizumab zou een gelijkwaardige effectiviteit en veiligheid hebben en minder kosten(84, 85). Als behandeling van maculaire degeneratie is het echter niet goedgekeurd. De farmaceutische industrie zou deze goedkeuring afremmen uit winstbejag. Beide moleculen werden ontwikkeld door Genentech. Door een eventuele goedkeuring zouden zij veel geld mislopen uit de verkoop van ranibizumab. Voor de patiënt en de staat is deze medicatie echter vaak niet betaalbaar. In Griekenland bijvoorbeeld moet men de keuze maken tussen het niet behandelen of een niet-legale behandeling met bevacizumab.

De angiogeneseremmers worden soms in monotherapie, maar in het algemeen vaak met conventionele chemo- en/of radiotherapie gebruikt omwille van hun synergistische effect. Uit ervaring in de klinische praktijk is deze synergie duidelijk bewezen. Men geeft hier enkele theoretische verklaringen voor (i) Een gestegen VEGF-expressie zou tumorcellen beschermen tegen apoptose door stijging van Bcl2 en survivine, (ii) het effect van de normalisatie van de vasculatuur werd hierboven al beschreven en (iii) VEGF zou circulerende EPC's mobiliseren na cytotoxische therapie (64). Dit synergistische effect is echter niet steeds positief maar sterk afhankelijk van type tumor, stadium en het therapeutische regime. Een studie wees uit dat bij een uitgezaaid carcinoom van colon en rectum de combinatie cetuximab, capecitabine en oxaliplatine zonder bevacizumab een betere overlevingsgraad had dan met bevacizumab.

Angiogeneseremmers mogen dan wel moleculair gerichte behandelingen zijn waarvan men theoretisch weinig bijwerkingen verwacht, men mag de toxiciteit echter niet uit het oog verliezen. De signaalwegen gerelateerd met angiogenese spelen ook een rol bij de

hematopoïese, de myelopoïese en de endotheelceloverleving (57) met als belangrijke bijwerkingen bloedingen, thrombose, hypertensie, vermoeidheid, gastro-intestinale perforatie, proteïnurie/oedeem, leukopenie/lymfopenie, nausea, diarree en huid- en haartoxiciteit. Bij de TKI's is ook duidelijk de toxiciteit aangetoond van enkele vitale organen zoals hart en lever. Bovendien zijn de effecten op lange termijn nog niet gekend aangezien deze medicatie nog niet lang op de markt is.

Een belangrijke prioriteit die in de meeste klinische studies wordt vermeld is de nood aan biologische merkers. Angiogeneseremmers zijn moleculair gerichte moleculen dus patiëntselectie is noodzakelijk. Eerder werd al enkele keren vermeld dat de resultaten van de angiogeneseremmers sterk afhankelijk zijn van factoren zoals het type tumor, het stadium en de combinatie met andere therapieën. Met biologische merkers kunnen we de reactie van tumoren op de therapie voorspellen en zo de therapie beter te gaan individualiseren. Mogelijke biologische merkers zijn: (i) de analyse van circulerende angiogene factoren, (ii) arrays voor genexpressie (86), (iii) immunohistochemisch onderzoek van tumorweefsel naar vasculaire densiteit en proliferatie en (iiii) functionele beeldvorming van bloedstroom in de tumor en permeabiliteit van de bloedvaten (87). Het aantal merkers goedgekeurd voor dagdagelijks gebruik in de praktijk is beperkt. Een voorbeeld is het opsporen van K-RAS mutaties bij gebruik van panitumumab. Bij bevacizumab onderzoekt men momenteel het gebruik als merker van de concentratie circulerende VEGFA-isovormen, de expressie van neuropilin-1 en VEGFR1 in tumoren en plasma, en genetische varianten van VEGFA of zijn receptoren (88). De identificatie en implementering van dergelijke meetbare parameters in de kliniek zou de resultaten van de behandeling significant kunnen verbeteren.

Een ander belangrijk probleem is de ontwikkeling van resistentie tegen angiogeneseremmers. Bovendien heeft men aangetoond dat in bepaalde gevallen de recidieven na een anti-angiogene behandeling een hogere maligniteitsgraad hebben. Men had gehoopt dat endotheelcellen veel minder snel resistent zouden worden tegen deze doelgerichte therapie. Men beschouwde ze als een genetisch stabiele populatie van cellen in tegenstelling tot de snel muterende tumorcellen(12). Dit alles heeft vragen opgeroepen over de mechanismen achter de ontwikkeling van resistentie. Door Bergers en Hanahan (89) worden twee resistentiemodellen beschreven.

Eenzijds kent men adaptieve evasie. Het angiogenesesysteem bestaat uit verschillende

signaalwegen met verscheidene families van receptoren die door elkaar lopen. Een van deze wegen blokkeren leidt tot een verschuiving in de balans met een opregulatie van de andere signaalwegen, de rekrutering van proangiogene cellen in het beenmerg, een gestegen pericytrekrutering en een gestegen capaciteit van tumorcellen om de normale bloedvatvasculatuur te gaan invaderen. Men heeft aangetoond dat een anti-VEGF therapie onder andere leidde tot een toegenomen tumorinvasie door een stijging van de pro-angiogene MMP's (60). Ook ziet men bij herval meer diffuse verspreiding van hersentumoren na angiogeneseremmende therapie.

In dit artikel wordt ook een tweede model van resistentie beschreven. Wanneer angiogeneseremmers al van bij de start van de behandeling geen invloed hebben op de tumor spreekt men van 'intrinsic non-responsiveness'. Het angiogeen systeem heeft dus reeds eerder in zijn ontwikkeling al een resistentie ontwikkeld tegen deze bepaalde angiogeneseremmer. Een combinatie van verschillende angiogenese inhibitoren zou het ontstaan van resistentie kunnen vermijden en kunnen leiden tot een betere controle van de tumor. De huidige therapieën richten zich vooralsnog op de groeifactoren VEGF en EGF en hun RTK's. Dit is logisch omdat deze signaalwegen ook het best bestudeerd zijn.

Men heeft dus enerzijds de synergie van chemo- en radiotherapie met de angiogeneseremmers, en anderzijds de combinatie van verschillende angiogeneseremmers om het angiogenesesysteem volledig te kunnen platleggen. Vooral dit laatste is tot op dit moment nog hypothetisch en er is nog veel klinisch onderzoek nodig. Bij dit preklinisch en klinisch onderzoek kent men eveneens problemen. De resultaten in preklinische studies met geïsoleerde systemen en duidelijk afgelijnde moleculaire doelwitten zijn vaak niet vergelijkbaar met resultaten in de praktijk. De preklinische modellen kennen belangrijke limiteringen waarvan er eerder enkele werden beschreven. Vele stappen van het angiogenetisch proces kunnen geanalyseerd worden in vitro, zoals endotheelcelproliferatie, migratie en differentiatie. Simmondsines vertonen hierbij een significante remming van de angiogenese. Bij verdere evaluatie van de sterkte en voor het potentieel gebruik van een molecule zijn experimenten met in vivo modellen nodig. Klassieke testen voor angiogenese zijn de CAM-test, testen op cornea's, het implanten van matrigelkamers en conventionele tumormodellen(12). Bij deze meer gecompliceerde modellen zijn de angiogeneseremmende eigenschappen van simmondsines minder duidelijk of zelf afwezig. Men mag simmondsines

echter nog niet afschrijven als mogelijke toekomstige behandeling bij een ontregelde angiogenese.

2.3. Conclusie

De kennis over angiogenese is de laatste decennia enorm uitgebreid en groeit nog steeds. Uit deze kennis heeft men verschillende anti-angiogene doelwitten kunnen afleiden. Dit heeft geleid tot de ontwikkeling van een groot aantal angiogeneseremmers in de preklinische fase, zo ook de simmondsines. De weg naar een eventuele commercialisatie is lang, maar de resultaten zijn hoopgevend. Onder andere door hun recente ontwikkeling is het aantal beschikbare angiogeneseremmers nog beperkt.

Bij het gebruik van de angiogeneseremmers staan er enkele belangrijke problemen hoog op de agenda. Als we deze kunnen oplossen staan we weer een stap verder in de strijd tegen kanker. Ten eerste is het belangrijk voorspellende biologische merkers te identificeren. Daarnaast moeten uit de theorie maar vooral uit de klinische praktijk een optimale dosis, tijdsduur en combinatie met andere therapieën afgeleid worden. Verder is ook de ontwikkeling van anti-angiogene moleculen die onafhankelijk van VEGF werken van belang om de resistentie tegen te gaan. Tot slot moet men verder onderzoek doen naar het effect van normalisatie van de tumorvasculatuur.

De angiogeneseremmers zullen hun plaats op de markt de komende jaren alvast behouden en met meer onderzoek en ervaring vermoedelijk uitgroeien tot een onmisbaar deel van de kankertherapie.

VI. Referentielijst

1. Ranzato E, Martinotti S, Burlando B. Wound healing properties of jojoba liquid wax: an in vitro study. *Journal of ethnopharmacology*. 2011 Mar 24;134(2):443-9.
2. Boozer CN, Herron AJ. Simmondsin for weight loss in rats. *International journal of obesity*. 2006 Jul;30(7):1143-8.
3. Cokelaere M, Flo G, Decuypere E, Vermaut S, Daenens P, Vanboven M. EVIDENCES FOR A SATIATING EFFECT OF DEFATTED JOJOBA MEAL. *Industrial Crops and Products*. 1995 Jul;4(2):91-6.
4. Shrestha MK, Peri I, Smirnoff P, Birk Y, Golan-Goldhirsh A. Jojoba seed meal proteins associated with proteolytic and protease inhibitory activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002 Sep 25;50(20):5670-5.
5. Van Boven M, Holser R, Cokelaere M, Flo G, Decuypere E. Gas chromatographic analysis of simmondsins and simmondsin ferulates in jojoba meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000 Sep;48(9):4083-6.
6. Bellirou A, Bouali A, Bouammali B, Boukhatem N, Elmtili BN, Hamal A, et al. Extraction of simmondsin and oil in one step from jojoba seeds. *Industrial Crops and Products*. 2005 Mar;21(2):229-33.
7. Chertov OY, Krasnoselskii AL, Lukanidin EM, Sashchenko LN, Gnuchev NV, Kirillova MV, et al. Isolation of a Cyto-Toxic Factor from Blood-Serum of Nude Rats. *B Exp Biol Med+*. 1989 Mar;107(3):362-4.
8. Leite de Oliveira R, Hamm A, Mazzone M. Growing tumor vessels: more than one way to skin a cat - implications for angiogenesis targeted cancer therapies. *Molecular aspects of medicine*. 2011 Apr;32(2):71-87.
9. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 2007 Jun;8(6):464-78.
10. Eilken HM, Adams RH. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Oct;22(5):617-25.
11. Furuya M, Nishiyama M, Kasuya Y, Kimura S, Ishikura H. Pathophysiology of tumor neovascularization. *Vascular health and risk management*. 2005;1(4):277-90.
12. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical pharmacology*. 2001 Feb 1;61(3):253-70.
13. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
14. Folkman J, Bach M, Rowe JW, Davidoff F, Lambert P, Hirsch C, et al. Tumor Angiogenesis - Therapeutic Implications. *New Engl J Med*. 1971;285(21):1182-&.
15. Cokelaere MM, Dangreau HD, Arnouts S, Kuhn ER, Decuypere EMP. INFLUENCE OF PURE SIMMONDSIN ON THE FOOD-INTAKE IN RATS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1992 Oct;40(10):1839-42.
16. Flo G, Vermaut S, Van Boven M, Daenens P, Buyse J, Decuypere E, et al. Comparison of the effects of simmondsin and cholecystokinin on metabolism, brown adipose tissue and the pancreas in food-restricted rats. *Hormone and Metabolic Research*. 1998 Aug;30(8):504-8.
17. D'Oosterlynck A RS. The effect of simmondsin derivatives. 2008.
18. Cokelaere MM, Busselen P, Flo G, Daenens P, Decuypere E, Kuhn E, et al. DEVAZEPIDE REVERSES THE ANOREXIC EFFECT OF SIMMONDSIN IN THE RAT. *Journal of Endocrinology*. 1995 Dec;147(3):473-7.
19. Flo G, Vermaut S, Darras VM, Van Boven M, Decuypere E, Kuhn ER, et al. Effects of simmondsin on food intake, growth, and metabolic variables in lean (+/?) and obese(fa/fa) Zucker rats. *British Journal of Nutrition*. 1999 Feb;81(2):159-67.
20. Cokelaere M, Daenens P, Vanboven M, Kuhn ER, Decuypere E, Darras V. INFLUENCE OF LONG-TERM SIMMONDSIN ADMINISTRATION ON THYROID-HORMONE LEVELS IN ADULT-RATS. *Hormone and Metabolic Research*. 1995 Jul;27(7):318-21.
21. Flo G, Van Boven M, Vermaut S, Daenens P, Decuypere E, Cokelaere M. The vagus nerve is involved in the anorexigenic effect of simmondsin in the rat. *Appetite*. 2000 Apr;34(2):147-51.
22. York DA, Singer L, Oliver J, Abbott TP, Bray GA. The detrimental effect of simmondsin on food intake and body weight of rats. *Industrial Crops and Products*. 2000 Oct;12(3):183-92.
23. Lievens S, Flo G, Decuypere E, Van Boven M, Cokelaere M. Simmondsin: effects on meal patterns and choice behavior in rats. *Physiology & Behavior*. 2003 Apr;78(4-5):669-77.

24. Flo G, Daenens P, VanBoven M, Vermaut S, Decuypere E, Cokelaere MM. Absorption and excretion of simmondsin after different administration routes in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997 Jan;45(1):185-8.
25. Lievens S, Verbaeys I, Flo G, Briers R, Decuypere E, Cokelaere M. Disruption of the behavioral satiety sequence by simmondsin. *Appetite*. 2009 Jun;52(3):703-10.
26. Arnouts S, Buyse J, Cokelaere MM, Decuypere E. JOJOBA MEAL (SIMMONDSIA-CHINENSIS) IN THE DIET OF BROILER BREEDER PULLETS - PHYSIOLOGICAL AND ENDOCRINOLOGIC EFFECTS. *Poultry science*. 1993 Sep;72(9):1714-21.
27. Hawthorne AJ, Butterwick RF. The satiating effect of a diet containing jojoba meal (*Simmondsia chinensis*) in dogs. *The Journal of nutrition*. 1998 Dec;128(12 Suppl):2669S-70S.
28. Ham R, Vermaut S, Flo G, Cokelaere M, Decuypere E. Digestive performance of dogs fed a jojoba meal supplemented diet. *Industrial Crops and Products*. 2000 Oct;12(3):159-63.
29. Cokelaere MM, Dangreau HD, Daenens P, Bruneel N, Arnouts S, Decuypere EMP, et al. INVESTIGATION OF POSSIBLE TOXICOLOGICAL INFLUENCES OF SIMMONDSIN AFTER SUBACUTE ADMINISTRATION IN THE RAT. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1992 Dec;40(12):2443-5.
30. Cokelaere M, Cauwelier B, Cokelaere K, Flo G, Houache N, Lievens S, et al. Hematological and pathological effects of 0.25% purified simmondsin in growing rats. *Industrial Crops and Products*. 2000 Oct;12(3):165-71.
31. Cokelaere MM, Buyse J, Daenens P, Decuypere E, Kuhn E, Vanboven M. FERTILITY IN RATS AFTER LONG-TERM JOJOBA MEAL SUPPLEMENTATION. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1993 Sep;41(9):1449-51.
32. Cokelaere M, Daenens P, Decuypere E, Flo G, Kuhn E, Van Boven M, et al. Reproductive performance of rats treated with defatted jojoba meal or simmondsin before or during gestation. *Food and Chemical Toxicology*. 1998 Jan;36(1):13-9.
33. Vermaut S, Onagbesan O, Bruggeman V, Verhoeven G, Berghman L, Flo G, et al. Unidentified factors in jojoba meal prevent oviduct development in broiler breeder females. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998 Jan;46(1):194-201.
34. Cokelaere M, Flo G, Lievens S, Van Boven M, Vermaut S, Decuypere E. Teratological studies in defatted jojoba meal-supplemented rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2001 Mar;39(3):247-52.
35. Vermaut S, De Coninck K, Onagbesan O, Flo G, Cokelaere M, Decuypere E. A jojoba-rich diet as a new forced molting method in poultry. *Journal of Applied Poultry Research*. 1998 Fal;7(3):239-46.
36. Abbassy MA, Abdelgaleil SAM, Belal A-SH, Rasoul MAAA. Insecticidal, antifeedant and antifungal activities of two glucosides isolated from the seeds of *Simmondsia chinensis*. *Industrial Crops and Products*. 2007 Oct;26(3):345-50.
37. Flo G, Van Boven M, Vermaut S, Decuypere E, Daenens P, Cokelaere M. Effect of simmondsin derivatives on food intake: Dose-response curves in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998 May;46(5):1910-3.
38. Staton CA, Reed MW, Brown NJ. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International journal of experimental pathology*. 2009 Jun;90(3):195-221.
39. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell*. 2011 Sep 16;146(6):873-87.
40. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 2003 Jun 23;161(6):1163-77.
41. Raza A, Franklin MJ, Dudek AZ. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol*. 2010 Aug;85(8):593-8.
42. Blasi F. uPA, uPAR, PAI-I: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunol Today*. 1997 Sep;18(9):415-7.
43. Rasmussen HS, McCann PP. Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: A review with special focus on batimastat and marimastat. *Pharmacol Therapeut*. 1997;75(1):69-75.
44. Huang HH, Bhat A, Woodnutt G, Lappe R. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nat Rev Cancer*. 2010 Aug;10(8):575-85.
45. Ribatti D. Vascular normalization: a real benefit? *Cancer Chemoth Pharm*. 2011 Aug;68(2):275-8.
46. Weis SM, Cheresch DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*. 2011 Nov;17(11):1359-70.
47. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dynam*. 2004 Nov;231(3):474-88.
48. Kilarski WW, Samolov B, Petersson L, Kvanta A, Gerwins P. Biomechanical regulation of blood vessel growth during tissue vascularization. *Nat Med*. 2009 Jun;15(6):657-U145.

49. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 2001 Nov;7(11):1194-201.
50. Maniotis AJ, Chen X, Garcia C, DeChristopher PJ, Wu D, Pe'er J, et al. Control of melanoma morphogenesis, endothelial survival, and perfusion by extracellular matrix. *Lab Invest.* 2002 Aug;82(8):1031-43.
51. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011 May 19;473(7347):298-307.
52. Nagy JA, Dvorak HF. Heterogeneity of the tumor vasculature: the need for new tumor blood vessel type-specific targets. *Clin Exp Metastas.* 2012 Oct;29(7):657-62.
53. Sullivan R, Graham CH. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metast Rev.* 2007 Jun;26(2):319-31.
54. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin - a Novel Angiogenesis Inhibitor That Mediates the Suppression of Metastases by a Lewis Lung-Carcinoma. *Cell.* 1994 Oct 21;79(2):315-28.
55. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy. *Nat Med.* 2001 Sep;7(9):987-9.
56. Fukumura D, Jain RK. Tumor microvasculature and microenvironment: Targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvascular research.* 2007 Sep-Nov;74(2-3):72-84.
57. Mauriz JL, Gonzalez-Gallego J. Antiangiogenic drugs: current knowledge and new approaches to cancer therapy. *Journal of pharmaceutical sciences.* 2008 Oct;97(10):4129-54.
58. Oklu R, Walker TG, Wicky S, Hesketh R. Angiogenesis and Current Antiangiogenic Strategies for the Treatment of Cancer. *J Vasc Interv Radiol.* 2010 Dec;21(12):1791-805.
59. Cook KM, Figg WD. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2010 Jul-Aug;60(4):222-43.
60. Kunnakkat S, Mathew M, Narayana A. Antiangiogenic therapy in the management of brain tumors: a clinical overview. *Cancer Chemoth Pharm.* 2012 Sep;70(3):353-63.
61. EMA. European medicine agency [updated 04/2013]. Available from: <http://www.ema.europa.eu/ema/>.
62. FDA. FDA USA food and drug administration [updated 04/2013]. Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/default.htm>.
63. Rahmathulla G, Hovey EJ, Hashemi-Sadraei N, Ahluwalia MS. Bevacizumab in high-grade gliomas: a review of its uses, toxicity assessment, and future treatment challenges. *OncoTargets and therapy.* 2013;6:371-89.
64. Boere IA, Hamberg P, Sleijfer S. It takes two to tango: Combinations of conventional cytotoxics with compounds targeting the vascular endothelial growth factor-vascular endothelial growth factor receptor pathway in patients with solid malignancies. *Cancer Sci.* 2010 Jan;101(1):7-15.
65. Linkous AG, Yazlovitskaya EM. Novel Therapeutic Approaches for Targeting Tumor Angiogenesis. *Anticancer Res.* 2012 Jan;32(1):1-12.
66. Finn RS. Emerging targeted strategies in advanced hepatocellular carcinoma. *Seminars in liver disease.* 2013 Feb;33 Suppl 1:S11-9.
67. Yun SM, Jung KH, Lee H, Son MK, Seo JH, Yan HH, et al. Synergistic anticancer activity of HS-173, a novel PI3K inhibitor in combination with Sorafenib against pancreatic cancer cells. *Cancer letters.* 2013 May 1;331(2):250-61.
68. Pawaskar DK, Straubinger RM, Fetterly GJ, Hylander BH, Repasky EA, Ma WW, et al. Synergistic interactions between sorafenib and everolimus in pancreatic cancer xenografts in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013 May;71(5):1231-40.
69. Verhagen PC. Re: Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *European urology.* 2007 May;51(5):1444.
70. Leung HW, Chan AL. Multikinase inhibitors in metastatic renal cell carcinoma: indirect comparison meta-analysis. *Clinical therapeutics.* 2011 Jun;33(6):708-16.
71. Shah RR, Morganroth J, Shah DR. Cardiovascular Safety of Tyrosine Kinase Inhibitors: With a Special Focus on Cardiac Repolarisation (QT Interval). *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience.* 2013 Apr 26.
72. Teo YL, Ho HK, Chan A. Risk of tyrosine kinase inhibitors-induced hepatotoxicity in cancer patients: a meta-analysis. *Cancer treatment reviews.* 2013 Apr;39(2):199-206.
73. Rajendra R, Jones RL, Pollack SM. Targeted treatment for advanced soft tissue sarcoma: profile of pazopanib. *OncoTargets and therapy.* 2013;6:217-22.
74. Rini BI, Escudier B, Tomczak P, Kaprin A, Szczylik C, Hutson TE, et al. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *Lancet.* 2011 Dec 3;378(9807):1931-9.

75. Price TJ, Segelov E, Burge M, Haller DG, Ackland SP, Tebbutt NC, et al. Current opinion on optimal treatment for colorectal cancer. *Expert review of anticancer therapy*. 2013 May;13(5):597-611.
76. Suzuki K. Current therapeutic strategy for multiple myeloma. *Japanese journal of clinical oncology*. 2013 Feb;43(2):116-24.
77. Zagouri F, Sergentanis TN, Chrysikos D, Filipits M, Bartsch R. mTOR inhibitors in breast cancer: a systematic review. *Gynecologic oncology*. 2012 Dec;127(3):662-72.
78. Serova M, de Gramont A, Tijeras-Raballand A, Dos Santos C, Riveiro ME, Slimane K, et al. Benchmarking effects of mTOR, PI3K, and dual PI3K/mTOR inhibitors in hepatocellular and renal cell carcinoma models developing resistance to sunitinib and sorafenib. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013 May;71(5):1297-307.
79. Kulke MH. Systemic therapy for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *Seminars in oncology*. 2013 Feb;40(1):75-83.
80. Smith SM. Targeting mTOR in mantle cell lymphoma: current and future directions. *Best practice & research Clinical haematology*. 2012 Jun;25(2):175-83.
81. Vinayak S, Carlson RW. mTOR inhibitors in the treatment of breast cancer. *Oncology*. 2013 Jan;27(1):38-44, 6, 8 passim.
82. Scaringi C, Minniti G, Caporello P, Enrici RM. Integrin inhibitor cilengitide for the treatment of glioblastoma: a brief overview of current clinical results. *Anticancer research*. 2012 Oct;32(10):4213-23.
83. Tsimberidou AM, Chandhasin C, Kurzrock R. Farnesyltransferase inhibitors: where are we now? *Expert opinion on investigational drugs*. 2010 Dec;19(12):1569-80.
84. Stefanini FR, Arevalo JF, Maia M. Bevacizumab for the management of diabetic macular edema. *World journal of diabetes*. 2013 Apr 15;4(2):19-26.
85. Banfi R, Attanasio F, Palazzi N, Colombini S, Falai T, Cecchi M, et al. Bevacizumab versus ranibizumab: why are we not playing the joker? *International journal of clinical pharmacy*. 2013 Apr 28.
86. Erdem L, Giovannetti E, Leon LG, Honeywell R, Peters GJ. Polymorphisms to predict outcome to the tyrosine kinase inhibitors gefitinib, erlotinib, sorafenib and sunitinib. *Current topics in medicinal chemistry*. 2012;12(15):1649-59.
87. Linkous AG, Yazlovitskaya EM. Novel therapeutic approaches for targeting tumor angiogenesis. *Anticancer research*. 2012 Jan;32(1):1-12.
88. Lambrechts D, Lenz HJ, de Haas S, Carmeliet P, Scherer SJ. Markers of response for the antiangiogenic agent bevacizumab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013 Mar 20;31(9):1219-30.
89. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008 Aug;8(8):592-603.

VII. Bijlagen

Bijlage 1: Samenstelling van het jojobazaad

Wanneer men het jojobazaad gaat uitpersen verkrijgt men **jojobaolie** (50-55% van het zaad). Dit is eigenlijk een vloeibare wax (mono-ester) maar er wordt meestal naar verwezen onder de naam 'olie'. Maximum 70-80% van de olie kan verkregen worden door koude pressie.

Wat overblijft na het uitpersen van de jojobazaden is de **perskoek (press cake of PC)**. Dit bevat nog tot 15% jojoba-olie en ongeveer 20 % fragmenten van het zaadomhulsel. Beide fracties moeten verwijderd worden om een bruikbare en commercieel interessante jojobabloem te verkrijgen als bron van simmondsines.

De olie in de overblijvende perskoek kan gerecupereerd worden door solventextractie. Zo verkrijgt men **ontvette perskoek** (de-oiled press cake).

Jojoba meel (meal) is niet- of deels-ontvette en meestal niet-geraffineerde gemalen perskoek met als doel gebruik als diervoeder (puur of gemengd met ander meel).

Jojoba bloem (flour) is volledig ontvet en geraffineerd jojoba meel.

Samenstelling:

- 50% suikers (3 hexoses en 2 pentoses)
- 30 % eiwitten (lage hoeveelheid methionine)
- 10% vocht
- tot 12% massa simmondsine (11 moleculen)
 - 55% dimethylsimmondsine en zijn ferulaat
 - 45% mineure simmondsines en hun ferulaten

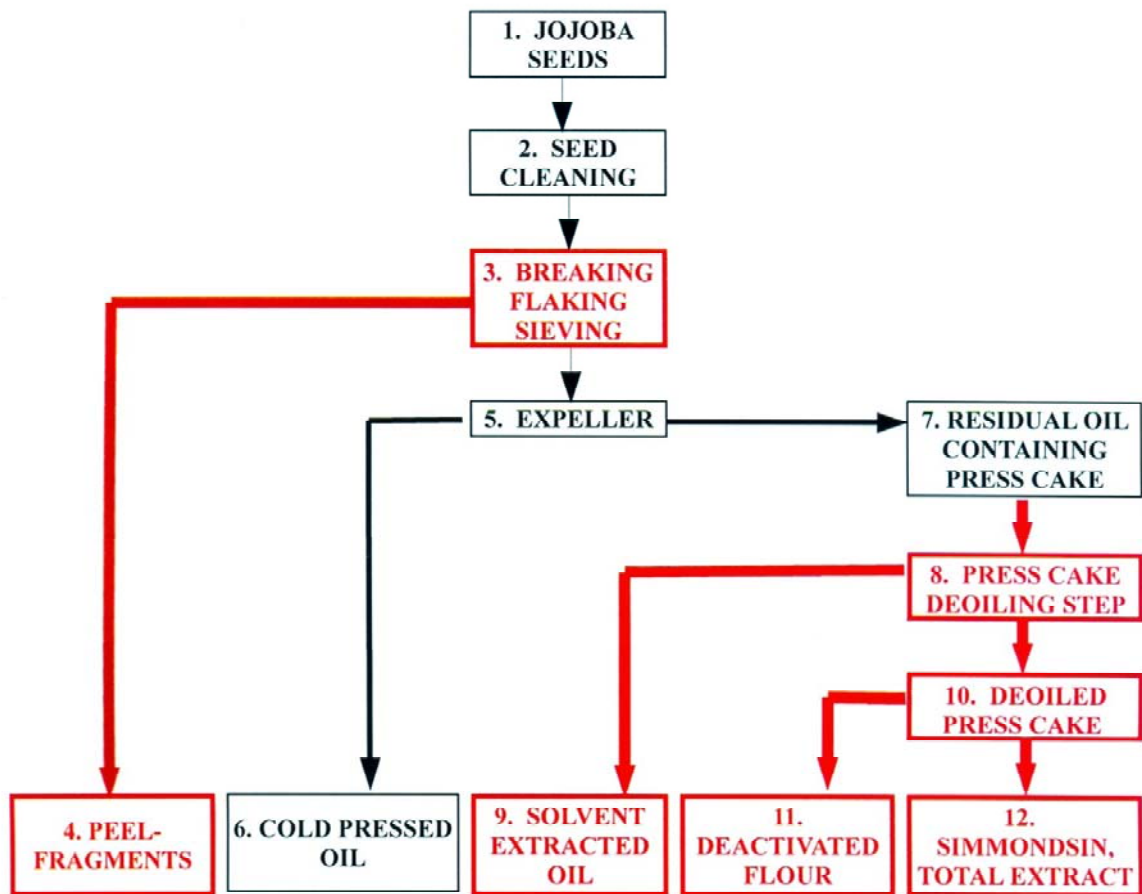
VII. Bijlagen

Deze simmondsines kunnen dmv een polair solvent eenvoudig geëxtraheerd worden. Dit geeft de volgende simmondsinesmoleculen (de percentages zijn niet exact). Het totale polaire extract bevat dus vnl dimethylsimmondsine.

Simmondsine glycosiden	Simmondsine glycoside ferulaten
dimethylsimmondsine 40% 4,5-didesmethylsimmondsine 16% 5-desmethylsimmondsine 13% 4-desmethylsimmondsine 10%	dimethylsimmondsineferulaat 16% 4-desmethyl-, 5-desmethyl- en 4,5-didesmethylsimmondsineferulaten 8%

Wanneer de term ‘dimethylsimmondsines’ wordt gebruikt, bedoelt men ook alle natuurlijke derivaten zoals ferulaten (in cis-/transvorm). Zoniet gebruikt men de term ‘zuiver dimethylsimmondsine’.



Schema technische realisatie extractie simmondsines (en andere nuttige componenten) uit de zaden

Zwart is de klassieke manier.

Rood is de voorgesteld manier in het rapport van D'Oosterlynck en Raes. Door het zeven van de gebroken en gevlokte zaden (stap 3) kan men de volgende stappen op een economisch voordeligere manier uitvoeren. Deze stap 3 laat ons toe de 'peel fragments' te verwijderen van de rest van het zaad. Deze bevatten paracoumarinezuur esters en vormen samen met ferulaat- en coffeinezuur-esters de zogenaamde antitrypsine factoren met sterke bacteriostatische eigenschappen. Het invoeren van deze stap laat ons toe simmondsines te produceren in een bijna zuivere vorm.

Bron bijlage 1:

- D'Oosterlynck A RS. The effect of simmondsin derivates. 2008.

Bijlage 2: Experimenten

Er werd gestart met het aanleren van celcultuurtechnieken. Daarna werden MTT- en SRB-testen uitgevoerd. Hierbij werden verschillende celconcentraties en serumconcentraties gebruikt om te onderzoeken onder welke omstandigheden de invloed van simmondsines best kan onderzocht worden.

MTT-test

Een MTT-test meet de activiteit van de mitochondriën met als doel het inschatten van het aantal levende cellen. Hiermee kan men de invloed van een bepaalde stof op de celproliferatie of celdood onderzoeken. Actieve mitochondriën zorgen voor de volgende omzetting:
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (geel) → formazan (paars)

Na oplossing van de formazankristallen door DMSO wordt met spectrofotometrie de kleurverandering gemeten en wordt de correlerende hoeveelheid levende cellen berekend.

Hierbij moet opgemerkt worden dat sommige agentia invloed hebben op de MTT-test zonder de overleving van de endotheelcel te verstoren.

SRB-test

De sulforhodamine B (SRB)-test wordt gebruikt voor het berekenen van de celdensiteit. Deze berekening is gebaseerd op de proteïne-inhoud van de cel. Wij gebruikten deze test om de toxiciteit van simmondsine na te gaan. Verschillende concentraties werden uitgezet in een '96 well plaat'. Na een incubatieperiode worden de cellen gefixeerd met trichloorazijnzuur. De proteïne-bindende kleurstof wordt in oplossing gebracht en in aan de well plaat toegevoegd. Na wegspoeling van het teveel aan kleurstof wordt door middel van fluorometrie de proteïne-inhoud en de gecorreleerde celdensiteit berekend.

CAM-test

Met deze test gaat men de angiogenese in een ei onderzoeken. De chorioallantoïsche membraan van de kip is een toegankelijke en relatief eenvoudige manier om in vivo angiogenese te bestuderen. Een testvloeistof kan geplaatst worden op de CAM door een venster te maken in de eierschaal. Deze testvloeistof zit in ofwel traag loslatende polymeer

bolletjes, in gelatine sponzen of op filterplaten. Dan laat men voor meestal 3 dagen of langer het angiogenesep proces doorgaan. De meting gebeurt door de verwijdering van de test-zone en dan microscopisch onderzocht. Men kijkt naar het aantal bloedvaten, vertakkingspunten en geeft een score op een semi-kwantitatieve schaal.

Bronnen bijlage 2:

- Goodwin AM. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvascular research*. 2007 Sep-Nov;74(2-3):172-83. PubMed PMID: 17631914. Pubmed Central PMCID: 2692317. Epub 2007/07/17.
- Staton CA, Reed MW, Brown NJ. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International journal of experimental pathology*. 2009 Jun;90(3):195-221. PubMed PMID: 19563606. Epub 2009/07/01.
- Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1112-6. PubMed PMID: WOS:000251155400005. English.

Bijlage 3: Afkortingen

Tabel met gebruikte afkortingen

2ME2	2-methoxyestradiol
ANG	Angiopoietine
BMDC	Bone-marrow derived cell
BRK	Breast tumor kinase
CAM	Chorioallantoic membrane
CCK	Cholecystokinine
CD	Cluster of differentiation
CTA	Conditioned taste aversion
DLL	Delta-like ligand
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ECM	Extracellulaire matrix
EMA	European medicine agency
EPC	Endotheel progenitor cel
EPH	Ephrine
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FDA	Food and drug administration
FGF	Fibroblast groeifactor
FIP	Factor interacting with PAP
FOLFIRI	Folinic acid, fluorouracil, irinotecan
FOLFOX	Folinic acid, fluorouracil, oxaliplatin
FOS	Feline osteosarcoma virus
FLT	Fms-like tyrosine kinase
GFP	Groen fluorescerend proteïne
GIST	Gastro-intestinale stromale tumoren
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HGF	Hepatocyt groeifactor
HIF	Hypoxie-geïnduceerde factor
HMPA	Hydroxymethoxyphenylacetonitriet
hMVEC	Humane microvasculaire endotheelcellen
HOX	Homeobox
HRE	HIF-responsive element
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IGF	Insuline-like growth factor
JAG	Jagged
JAM	Junctional adhesion molecules
KLF	Krüppel-like factor
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (MEK)
MCF	Michigan Cancer Foundation
MMP	Matrix metalloproteinase
MTOR	Mammalian target of rapamycin
NICD	Intracellular domain of Notch
NSCLC	Non-small cellular lung cancer
NRARP	Notch-regulating ankyrin repeat protein
OS	Overall survival
PA	Plasminogeen activator
PCAD	Paracoumarinederivaten

VII.Bijlagen

PDGF	Platelet-derived growth factor
PFS	Progression-free survival
PHD	Prolyl hydroxylase domain
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinase
PIGF	Placental growth factor
PNET	Pancreatic neuroendocrine tumor
RAS	Rat sarcoma
RCC	Renal cell carcinoma
RET	Re-arranged during transfection
ROCK	Rho-geassocieerd proteïne kinase
RTK	Receptor tyrosinekinase
S1D	Sphingosine-1-phosphate
SA	Simmondsine-amide
SIRT	Sirtuin
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TSP	Thrombospondine
VEGF	Vasculaire endotheliale groeifactor
V-YES	Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog