Áhrif resveratróls á lyfjanæmi frumna úr illkynja stjarnfrumuæxlum (Glioblastoma multiforme)

Sigurrós Jónsdóttir

Leiðbeinendur:
Ingvar Hákon Ólafsson
Finnbogi Rútur Þormóðsson
Helgi Sigurðsson

Lokaverkefni til BS-gráðu
Læknadeild Háskóla Íslands
1. júní 2012

HÁSKÓLI ÍSLANDS

Áhrif resveratróls á lyfjanæmi frumna úr illkynja stjarnfrumuæxlum (Glioblastoma multiforme)

Sigurrós Jónsdóttir

Lokaverkefni til BS-gráðu í Læknisfræði

Leiðbeinendur: Ingvar Hákon Ólafsson, Finnbogi Rútur Þormóðsson og Helgi Sigurðsson

Læknadeild
Menntavísindasvið Háskóla Íslands
Júní 2012

Ritgerð þessi er lokaverkefni til BS gráðu í Læknisfræði og er óheimilt að afrita ritgerðina á nokkurn hátt nema með leyfi rétthafa.

© Sigurrós Jónsdóttir 2012

Reykjavík, Ísland 2012

Let food be thy medicine and let medicine be thy food. –Hippocrates

Efnisyfirlit

1 Ágrip 2

2 Listi yfir skammstafanir 3

3 Inngangur 5

3.1 Saga resveratróls og fyrri rannsóknir 5

3.2 Frásog og stöðugleiki resveratróls 7

3.3 Sameindaskotmörk resveratróls 10

3.4 Glioblastoma heilaæxli 12

3.5 Krabbameinslyfin Cisplatín og Temósólómíð 14

3.6 Lyfjanæmispróf á heilaæxlum og klínisk þýðing þeirra 15

3.7 YKL-40 og krabbamein 16

3.8 Markmið rannsóknarinnar 17

4 Efniviður og aðferðir 18

4.1 Efni og áhöld 18

4.2 Rannsóknarsnið og framkvæmd 19

4.2.1 Undirbúningur U87 frumulínu 19

4.2.2 Undirbúningur glioblastoma frumna sjúklings 19

4.2.3 Undirbúningur resveratróls og krabbameinslyfja 19

4.2.4 Prófun resveratróls og krabbameinslyfja 20

4.2.5 Mat á lífvænleika með ATP-Lúsiferasa, PrestoBlue og Crystal violet prófum 21

4.2.6 Mæling á YKL-40 tjáningu U87 frumulínu með ELISA aðferð 21

4.2.7 Prófun á áhrifum YKL-40 á U87 frumulínu 22

4.3 Úrvinnsla 22

5 Niðurstöður 23

5.1 Resveratról sýnir tíma- og styrkháða hindrun á vexti U87 frumulínu 23

5.2 Resveratról eykur næmi U87 frumulínu fyrir Temósólómíð 26

5.3 Resveratról eykur næmi U87 frumulínu fyrir Cisplatín í hærri styrkjum 27

5.4 Resveratról bælir YKL-40 tjáningu U87 frumulínu 28

5.5 YKL-40 snýr ekki við lyfjanæmisaukandi áhrifum resveratróls á U87 frumulínu 29

5.6 Samanburður ATP-Lúsiferasa, PrestoBlue og Crystal violet prófa 30

5.7 Áhrif resveratróls á glioblastoma frumur sjúklings 31

6 Umræður og ályktanir 32

6.1 Helstu niðurstöður 32

6.2 Túlkun niðurstaða 32

6.3 Næstu skref 35

6.4 Lokaorð 35

7 Þakkarorð 36

8 Heimildaskrá 37

1 Ágrip

ÁHRIF RESVERATRÓL Á LYFJANÆMI FRUMNA ÚR ILLKYNJA STJARNFRUMUÆXLUM (GLIOBLASTOMA MULTIFORME)

Sigurrós Jónsdóttir

Inngangur: Stóraukinn áhugi er fyrir náttúruefnum úr jurtum til lækninga sem tengist m.a. meðferðum við krabbameini. Eitt þessara efna, resveratról, skipar stóran sess í fornri lækningasögu Asíu. Fjölmargar rannsóknir hafa verið gerðar á virkni resveratról varðandi efnaskipti og sjúkdóma. Hins vegar hefur hlutverk resveratról við að auka lyfjanæmi illkynja stjarnfrumuæxla (e. glioblastoma multiforme, GBM) lítið verið rannsakað. GBM er á meðal illvígustu æxlissjúkdóma. Aukin tjáning þeirra á YKL-40 hefur verið tengd við þróun æxlis og verri horfur sjúklings. Markmið þessarar rannsóknar var að meðhöndla U87 glioblastoma frumulínu með resveratról og meta síðan YKL-40 tjáningu hennar og næmi fyrir hefðbundnum krabbameinslyfjum. Þá var einnig reynt að snúa áhrifunum af resveratról við með því að baða frumurnar í YKL-40. Hluti rannsóknarinnar var endurtekinn á GBM frumum frá sjúklingi.

Efniviður og aðferðir: GBM frumur frá sjúklingi voru einangraðar úr heilaæxli frá Landspítala. Þær, ásamt U87, voru ræktaðar og var 20.000 frumum sáð í hvern brunn á 96 holu ræktunarbökkum. Þá voru frumurnar baðaðar með raðþynningum af resveratról, hefðbundnum krabbameinslyfjum og loks YKL-40. Eftir 24, 48 og 72 klukkustundir í rækt var frumulifun metin með þremur mismunandi aðferðum: (i) ATP-Lúsiferasa, (ii) PrestoBlue og (iii) Crystal violet. YKL-40 tjáning var metin með ELISA aðferð.

Niðurstöður: Resveratról sýndi tíma- og styrkháð frumudráp hjá U87 frumulínu. Þá jók resveratról næmi U87 fyrir krabbameinslyfjunum Temósólómíð og Cisplatín. Hjá GBM frumum sjúklings sýndi resveratról styrkháð frumudráp en ekki tókst að sýna fram á aukið næmi fyrir Temósólómíð með marktækum hætti. Resveratról bældi YKL-40 tjáningu U87 en þegar frumurnar voru baðaðar í YKL-40 snerust áhrif resveratról ekki við.

Ályktanir: Resveratról er talið grípa inn í boðefnaferla frumna og draga úr krabbameinssvipgerð þeirra sem m.a. endurspeglast í YKL-40 tjáningu. Í kjölfarið verður aukning á lyfjanæmi U87. Í þessari rannsókn tókst að staðfesta tíma- og styrkháð frumudráp resveratról á U87 frumulínu og GBM frumur sjúklings. Resveratról bældi YKL-40 tjáningu U87 en YKL-40 breytti ekki áhrifum resveratról sem bendir til þess að áhrifum resveratról sé ekki miðlað í gegnum YKL-40. Samanburður á ATP-Lúsiferasa, PrestoBlue og Crystal violet prófum kveikti þá spurningu hvort resveratról miðli áhrifum sínum með bælingu á efnaskiptum og í kjölfarið lífvænleika U87 frumulínunnar.

2 Listi yfir skammstafanir

ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosine-5'-triphosphate (adenósín-5'-þrífosfat)
BBB	Blood brain barrier (blóð-heila hindri)
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (sýklín háður kínasa hindri 2A)
CIS	Cisplatin (Cisplatín)
COX-1	Cyclo-oxygenase-1
COX-2	Cyclo-oxygenase-2
CYP3A4	Cytochrome P_{450} 3A4
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium (Eagle æti umbreytt af Dulbecco)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EAC	Ehrlich ascites carcinoma (kviðarholsvökva æxlismódel)
EGFR	Epidermal growth factor receptor (vaxtarþáttaviðtaki þekjufrumna)
ERK	Extracellular signal-regulated kinase (kínasi stýrður af utanfrumuboðum)
FBS	Fetal bovine serum (nautgripafósturssermi)
HC gp-39	Human cartilage glycoprotein-39 (mannabrjósks sykruprótín 39)
Hsp90α	Heat shock protein 90α (siðgæðisprótín 90α)
IC	Inhibitory concentration (heftistyrkur)
IC50	Half maximal inhibitory concentration (hálfur heftistyrkur)
IDH	Isocitrate dehydrogenase
MDM2	Murine double minute 2
MDR	Multi drug resistance (fjöllyfjaónæmi)
MGMT	O^6-methylguanine-DNA-methyltransferase
MI	Maximum inhibition
MO	No inhibition control
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

NOS	Nitric oxide synthase
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug (bólgueyðandi gigtarlyf)
OD	Optical density (gleypnigildi)
PBS	Phosphate buffer saline (fosfat-salt-jafnalausn)
PDGF	Platelet derived growth factor (blóðflögu vaxtarþáttur)
PDGFRα	Platelet derived growth factor receptor α (blóðflöguvaxtarþáttarviðtaki α)
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKM2	Pyruvate kinase muscle isozyme 2
PTEN	Phosphatase and tensin homolog (fosfatasa og tensín samstæða)
ROS	Reactive oxygen species (hvarfgjörn hættuleg milliefni)
SIRT1	Silent mating type information regulation 2 homolog 1
TCER	Tumor cell extraction reagent (æxlisfrumuútdráttarefni)
TM	Transfer medium (flutningsæti)
TMZ	Temozolomide (Temósólómíð)
TRAF1	TNF receptor-associated factor 1

3 Inngangur

Matur er mannsins megin. Frá örófi alda hefur maðurinn safnað jurtum til átu og lækninga. Mikið er nú rannsakað til að mæta stórauknum áhuga fyrir s.k. náttúruefnum úr jurtum (e. phytochemicals) til lækninga og tengist það meðal annars meðferðum við krabbameini. Eitt þessara efna er resveratról. Markmið þessarar rannsóknar er að meta lyfjanæmisaukandi áhrif resveratróls á krabbamein. Fyrir valinu varð illkynja stjarnfrumuæxli (e. glioblastoma multiforme, GBM) sem er á meðal illvígustu æxlissjúkdóma.

3.1 Saga resveratróls og fyrri rannsóknir

Resveratról var fyrst nefnt í japanskri vísindagrein árið 1939 eftir að efnið var eingangrað úr hinni eitruðu lækningajurt *Veratrum album* (ísl. bjarthnöri) (1). Efnið skipar stóran sess í fornri lækningasögu Asíu þar sem það er betur þekkt sem „Hu Zhang“ eða „Ko-jo-kon“ sem er duftið af þurrkaðri rót plöntunnar *Polygonum cuspidatum* en íslenska heiti hennar er blómsúra (Mynd 1). Resveratról vakti síðan mikla athygli þegar það fannst í vínberjum árið 1976 (2) og síðar í rauðvíni árið 1992 (3).

Mynd 1: Blómsúra. Resveratról finnst í duftinu af þurrkaðri rót plöntunnar *Polygonum cuspidatum* (ísl. blómsúra).

Í upphafi þessarar aldar virtust rannsóknir sýna að efnið gæti leitt til allt að tvöföldunar á lengd lífs hjá gersveppum (*Saccharomyces cerevisiae*), smáormum (*Caenorhabditis elegans*) og flugum (*Drosophila melanogaster*) (4, 5). Þessar rannsóknir vöktu mikla athygli ekki síst vegna þess að þær birtust með stuttu millibili í hinu virta vísindatímariti Nature og álitu ýmsir að hér væri loksins kominn til sögunnar langlífis elixírinn sjálfur. Sú trú varði þó ekki lengi því hluti af niðurstöðunum var hrakinn vegna galla í uppsetningu tilrauna. Árið 2011 birti Nature þó enn á ný niðurstöður sem studdu mögulegt hlutverk resveratróls við framlengingu lífs (6). Lagt hefur verið til að resveratról sé skýringin á fyrirbærinu „French Paradox“ sem er hið öfuga samband á milli hóflegrar rauðvínsdrykkju og hjarta- og æðasjúkdóma sem faraldsfræðilegar rannsóknir hafa stutt að sé til staðar á meðal Frakka. Allt hefur þetta leitt til stóraukins áhuga á resveratróli meðal vísinda- og leikmanna og í kjölfarið hafa fjölmargar *in*

vitro, in vivo og *ex vivo* rannsóknir verið gerðar á virkni resveratróls varðandi efnaskipti og sjúkdóma (Tafla 1).

Áhugi manna á resveratróli í sambandi við krabbameinslyfjameðferð kviknaði eftir að Jang og félagar sýndu fram á krabbameinshemjandi áhrif efnisins árið 1997 (7). *In vitro* rannsóknir hafa stutt þá tilgátu að resveratról hafi áhrif á meginskrefin í krabbameinsmyndun, þ.e. upphaf, viðhald og framvindu þeirra. Þau áhrif hafa síðan verið metin í dýrum sem og fáeinum rannsóknum á mönnum. Rannsóknir á resveratróli styðja þó ekki aðeins krabbameinshemjandi hlutverk þess heldur hefur einnig verið sýnt fram á möguleg lyfjanæmisaukandi áhrif efnisins í meðferð krabbameina (8). Hins vegar hefur hlutverk resveratróls við að auka lyfjanæmi GBM lítið verið rannsakað.

Tafla 1. Lækningaleg virkni resveratróls. Fjölmargar *in vitro, in vivo* og *ex vivo* rannsóknir verið gerðar á virkni resveratróls varðandi efnaskipti og sjúkdóma.

Virkni gegn bakteríum, sveppum og veirum (9, 10)
Andoxandi virkni (11)
Eyðing hættulegra hvarfgjarnra milliefna (Reactive oxygen species, ROS) (12)
Hindrun lípíð peroxunar (13)
Hindrun á myndun eicosanoíða (14)
Hindrun á samloðun blóðflagna (14)
Bólgueyðandi virkni (7)
Æðaslakandi virkni (15)
Estrógen og and-estrógen virkni (16)
Hindrun á monoaminoxidasa (17)
Hindrun á H^+/K^+-ATPasa (18)
Virkni gegn sykursýki (19)
Virkni gegn Alzheimer (20)
Virkni gegn krabbameinum (7, 21)
Tölur innan sviga vísa til viðeigandi greina í heimildaskrá.

Resveratról er almennt talið myndast í fjölmörgum plöntutegundum sem svar við áreitum á borð við útfjólubláa geilsun, bakteríur og sveppi. Efnið er búið til í húðþekju laufblaða og hýði vínberja en ekki í aldinkjöti þeirra (10). Resveratról er líklega þekktast fyrir að bera ábyrgð á mögulegum heilsuverndandi áhrifum rauðvíns. Auk vínberja og rauðvíns má finna resveratról í rauðum og bleikum vínberjasafa, bláberjum, krækiberjum, mórberjum, trönuberjum, rabbabara, jarðhnetum og kakódufti (22). Hvítvín og rósavín innihalda mun minna resveratról heldur en rauðvín enda er sá tími sem vínber eru látin gerjast með hýðinu ákvarðandi þáttur fyrir resveratról magnið í víni. Magn resveratról í vínberjahýði er hinsvegar háð ræktunarafbrigðinu, landfræðilegum uppruna og útsetningu fyrir sveppum, t.a.m.

Bothrytis cinerea (23). Þau rauðvín sem ríkust eru af resveratról eru komin af „cabernet-sauvignon“, „pinot-noir“ og „mourvedre“ vínþrúgum en þau sem innihalda minnst resveratról eru hinsvegar komin af „gamay“, „cabernet franc“ og „grenache“ þrúgum (24). Þá er talið að vín frá kaldari svæðum á borð við Bordeaux í Frakklandi innihaldi meira resveratról heldur en vín frá heitari svæðum á borð við Kaliforníu, Ástralíu, Spán og Suður-Ameríku (25).

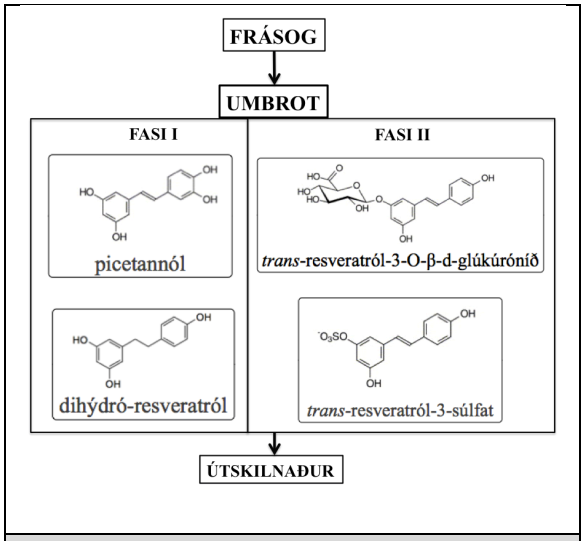
Resveratról er einnig framleitt á rannsóknarstofum með efnasmíði eða líftækni og er auk þess selt í stórum stíl sem fæðubótarefni. Flest resveratról á markaði inniheldur kjarna blómsúrurótarinnar gerjaðan af sveppnum *Aspergillus oryzae* (26) sem Asíubúar nota til gerjunar á soja en gerjað soja er enn ein uppspretta resveratról. Resveratról fæðubótarefni innihalda á bilinu 50 µg til 60 mg af resveratról á hvern skammt. Sá skammtur sem ætlað er að þurfi til að fyrirbyggja ýmsa þráláta sjúkdóma í mönnum er enn óþekktur. *In vitro* rannsóknir hafa þó bent til þess að sá lágmarksstyrkur sem þarf til að ná fram krabbameinshemjandi áhrifum resveratról sé a.m.k. 5-10 µM (27). Hins vegar hafa *in vivo* rannsóknir bæði á dýrum og mönnum ekki náð að mæla svo háan blóðstyrk.

3.2 Frásog og stöðugleiki resveratról

Niðurstöðum *in vitro* og *in vivo* rannsókna ber ekki alltaf saman. Flestar rannsóknir á virkni resveratról hafa verið gerðar *in vitro* þar sem frumur eru útsettar fyrir óumbrotnu efninu í allt að 10-100 sinnum hærri styrk en sá hámarksstyrkur sem mælst hefur í blóði manna eftir inntöku (27). Rannsóknir á áhrifum resveratról *in vivo* stranda því flestar á hinu lága aðgengi efnisins. Resveratról fer þó greiðlega yfir blóð-heila hindrann (e. blood brain barrier, BBB) í músum og hefur sú staðreynd ekki síst vakið áhuga á mögulegu hlutverku efnisins í baráttunni við heilaæxli (28).

Þegar resveratról er tekið inn um munn frásogast það frá meltingarfærum manna en aðgengi þess er hinsvegar lágt vegna hins hraða umbrots og útskilnaðar. Efnið er umbrotið af fasa I ensímum í picetannól og díhýdró-resveratról en af fasa II ensímum í glúkúróníð og súlfat (29) (Mynd 2). Rannsóknir á mönnum sýna að það resveratról sem mælist í blóði eftir inntöku sé ekki nema um 5% af því magni sem tekið var inn. Það litla magn sem mælist í blóði er fyrst og fremst á formi afleiðanna, súlfats og glúkúróníðs (30). Flestir vefir líkamans komast því aðeins í tæri við afleiður resveratról ef frá er talin þekja meltingarvegarins. Lítið er vitað um virkni resveratról afleiða í líkamanum en rannsókn frá 2011 sýndi að afleiður resveratróls geti ýmist haft meiri eða minni virkni en upphaflega efnið (31). Þá er ekki vitað

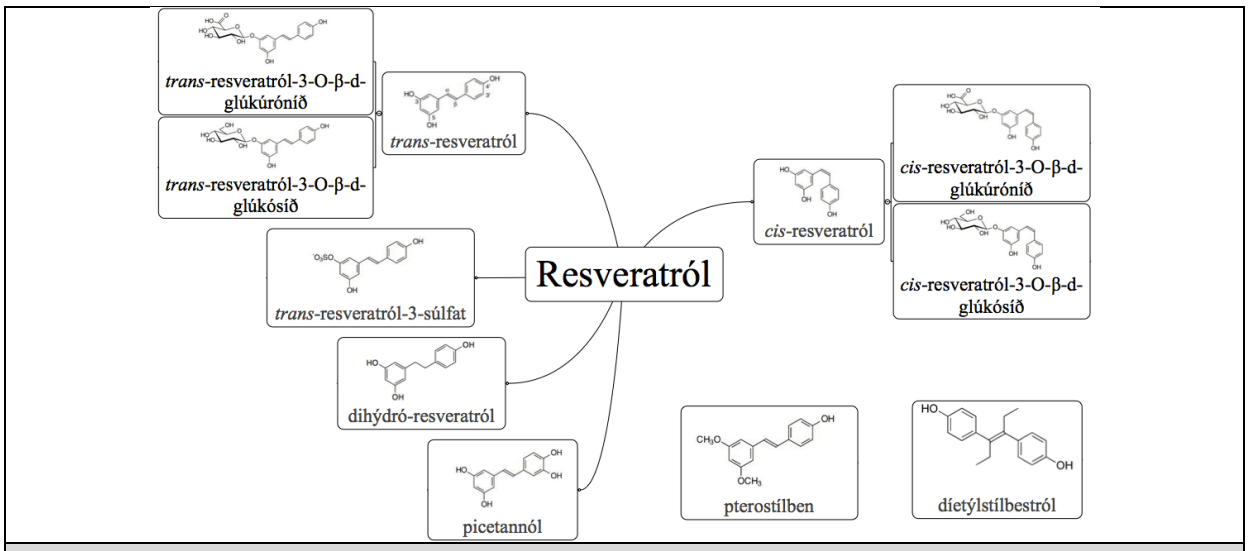
hvort að ákveðnir vefir geti umbreytt resveratról afleiðum í trans-resveratról á ný (29). *In vitro* rannsóknir hafa reynt að meta áhrif resveratról afleiða og sýndi ein þeirra fram á COX-1 (cyclo-oxygenase-1) og COX-2 (cyclo-oxygenase-2) séu hindraðir en SIRT1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1) vikjaður af bæði resveratról og súlfat afleiðu þess (32).



Mynd 2: Umbrot resveratról. Í mönnum er resveratról umbrotið af fasa I ensímum í picetannól og díhýdró-resveratról en af fasa II ensímum í resveratról-3-O-β-d-glúkúróníð og resveratról-3-súlfat.

Resveratról tilheyrir flokki polýfenóla sem kallast stílben en polýfenól eiga það sameiginlegt að vera komin af fenýlalaníni og innihalda arómatískan hring með virkum hýdroxýlhóp. Sameindin er fituleysanleg og kemur bæði fyrir sem *cis* og *trans* ísómera. *Trans* ísómeran er algengari, virkari og meira rannsökuð heldur en *cis* ísómeran og því verður resveratról haft um *trans*-3,4',5-tríhýdroxýstílben út ritgerðina. Í plöntum koma báðar ísómerurnar fyrir sem glúkósíð en resveratról-3-O-β-glúkósíð er kallað píesíð. Í rauðvíni er talsvert magn af resveratról en talið er að það myndist þegar sykursameindin er klofin af píesíði í gerjunarferlinu (22). Samtengd form af resveratról, utan súlfats og glúkúróníðs, innihalda 1-3 metýl hópa t.d. pterostílben. Afleiðurnar halda eftir a.m.k. einum hýdroxýlhóp og hafa því allar andoxunarhæfni. Picetannól er náttúruleg hliðstæða resveratról með fjóra hýdroxýlhópa og þ.a.l. aukna andoxunarhæfni. Þá ber að nefna að stílben bygging resveratról er náskyld hinu tilbúna estrógeni díetýlstílbestról og getur efnið því ýmist virkað sem estrógen viðtaka örvi (agónisti) eða hemill (antagónisti) eftir aðstæðum (33) (Mynd 3). Eins hafa verið þróaðar nýjar resveratról afleiður í tilraun til að auka aðgengi efnisins og má nefna sem dæmi

tetrametoxýstílben en sýnt hefur verið fram á að það miðli krabbameinshemjandi áhrifum sínum um aðra ferla en resveratról (34).



Mynd 3: Efnaformúlur resveratróls (3,4',5-tríhýdroxýstílben) ísómera og afleiða. Resveratról í náttúrunni kemur bæði fyrir sem *cis*- og *trans*-resveratról (*cis*- og *trans*-3,4',5-tríhýdroxýstílben). Báðar ísómerurnar geta komið fyrir sem píesíð (*cis*- og *trans*-resveratról-3-O-β-d-glúkósíð). Samtengd form af resveratróli innihalda glúkúróníð-, súlfat- eða metýlhópa t.d. resveratról-3-O-β-d-glúkúróníð, resveratról-3-súlfat og pterostílben (3,5-trímetoxý-4'-hydroxýstílben). Náttúruleg hliðstæða resveratróls er picetannól (3,4,3′,5′-trans-tetrahýdroxýstílben). Náskylt resveratról er hið tilbúna estrógen díetýlstílbestról (4,4'-(3*E*)-hex-3-en-3,4-díyldífenól).

Rannsóknir á aðgengi resveratróls í mönnum eru á byrjunarstigi. Í rannsókn þar sem sex heilbrigðir menn og konur tóku inn 25 mg af resveratróli kom í ljós að einungis örlítið magn af óumbreyttu efninu fannst í blóði. Styrkurinn í blóði náði hámarki 60 mínútum eftir inntöku og var hann þá um 2 µM (29). Sami hámarksstyrkur mældist eftir 30 mínútur í annarri rannsókn þar sem 12 heilbrigðir menn tóku inn 25 mg af resveratróli á hvert kíló líkamsþyngdar. Þá er aðgengi resveratróls talið háð því hvort að efnið sé fengið úr rauðvíni, græmetissafa eða vínberjasafa (35) og er aðgengið úr vínberjasafa talið lægra en úr rauðvíni (36). Þá sýndi nýleg rannsókn að aðgengi resveratróls úr rauðvíni sé óháð því hvort að vínið sé drukkið með mat eða á fastandi maga (37).

Ýmsar leiðir hafa verið farnar í tilraunum til þess að auka aðgengi á resveratról. Meðal annars hefur efninu verið komið fyrir í burðarsameindum á borð við lípósóm, cyclodextrín og kalsíum perlur (38-40). Rannsókn frá 2011 sýndi fram á aukið aðgengi resveratróls þegar það var tekið inn samhliða virka efninu píperín (e. piperine) sem finnst í pipar. Aðgengið jókst um 229% og hámarksstyrkurinn í blóði um 1544% (41). Nú er í gangi slembiröðuð tvíblind klínísk forkönnun á áhrifum píperín á aðgengi resveratróls hjá 24 heilbrigðum einstaklingum (42). Þá benti *in vivo* rannsókn á rottum til þess að háskammtameðferð með resveratróli (50

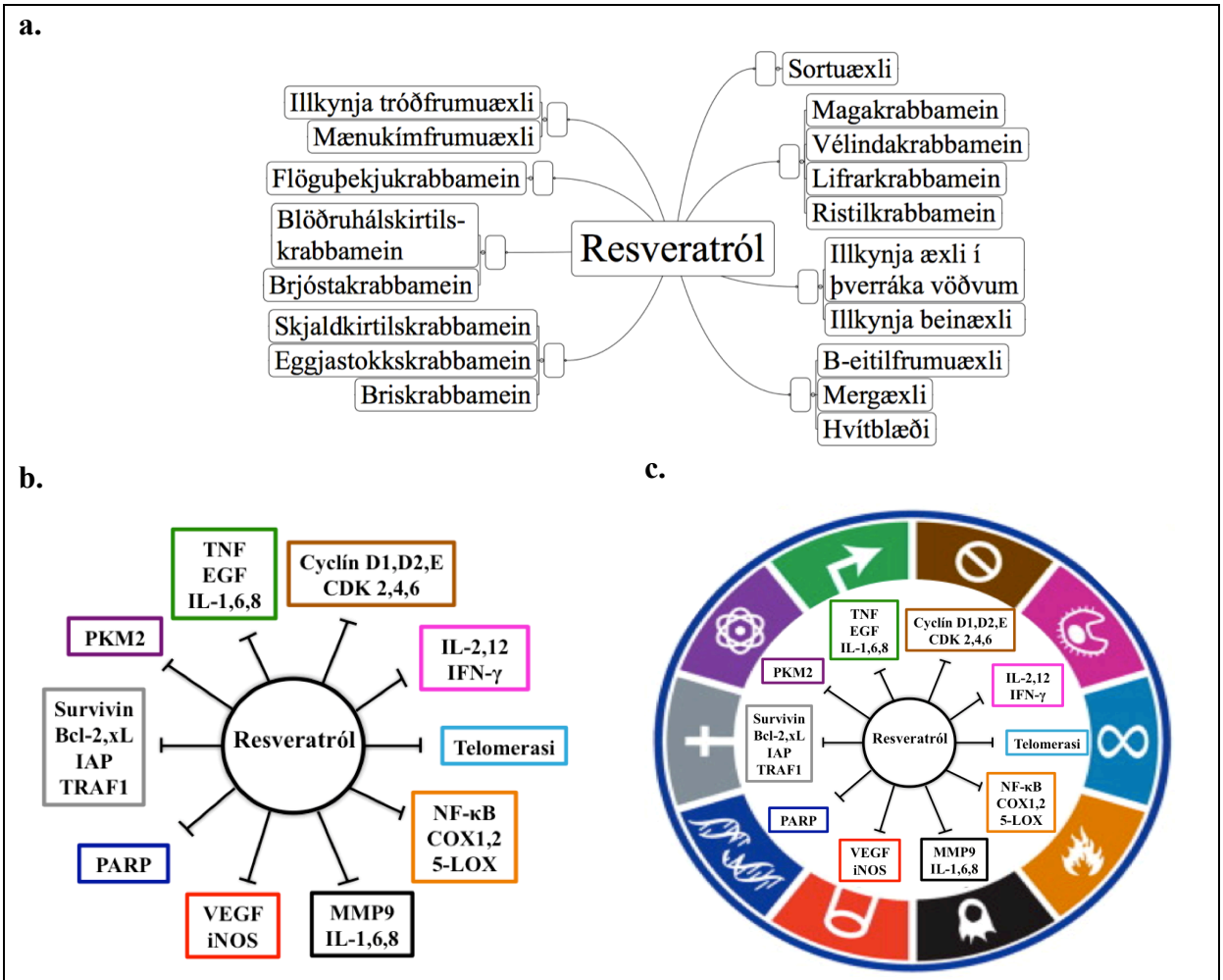
mg/kg) um munn auki ekki aðgengi þess. Aðgengið jókst heldur ekki við það að gefa efnið oftar á dag, allt að 7 sinnum, en þegar resveratról var gefið í cyclodextrínum jókst bæði frásogið og aðgengið (43).

Milliverkanir resveratróls við önnur lyf eru ekki þekktar í mönnum en *in vitro* rannsókn benti til þess að resveratról geti hindrað ensímið CYP3A4 (Cytochrome P_{450} 3A4). Í kjölfarið hefur verið sett af stað klínísk lyfjarannsókn til að athuga milliverkanir við önnur lyf umbrotin af CYP3A4, þar á meðal krabbameinslyf, ónæmisbælandi lyf og statín lyf (44). Þá hefur verið sýnt fram á að resveratról hindri sértækt ensímið CYP1A1 í lifrarfrumum manna (45) en örvi fasa II ensím í músum (46). Ekki hefur tekist að sýna fram á eiturvirkni resveratról í mönnum (30). Alls eru í gangi 46 klíníska lyfjarannsóknir á resveratról og þar af 14 tengdar krabbameini (47). Kortlagning á áhrifum resveratról í mönnum getur mögulega opnað nýjar leiðir fyrir hagnýtingu efnisins í forvarnir og meðferð krabbameina.

3.3 Sameindaskotmörk resveratról

Krabbamein er samheiti margra og misleitra sjúkdóma sem þróast eftir fjölmörgum ferlum og því er hægara sagt en gert að kortleggja áhrif resveratról á hverja krabbameinsfrumu. Áhrif resveratról virðast felast í heilu boðefnaferlunum ólíkt flestum krabbameinslyfjum sem oftast hafa sértækari virkni. Meðferð með resveratról hefur þannig áhrif á breitt svið boðefnaferla sem koma að myndun (e. initiation), vexti (e. promotion), viðhaldi, fjölgun (e. progression) og fari (e. migration) krabbameinsfrumna (7).

Áhrif resveratról eru væntanlega háð skammti, tímasetningu meðferðar og mögulega mismunandi svipgerð hverrar krabbameinsfrumu. *In vitro* rannsóknir hafa samt sýnt að resveratról geti hamið vöxt fjölda krabbameina (48-51) (Mynd 4a). Talið er að resveratról miðli hamlandi áhrifum sínum á æxlisvöxt með ýmsu móti: (i) stöðvun frumuhrings, (ii) virkjun á frumum ónæmiskerfisins, (iii) hemlun á telómerasa virkni í æxlisfrumum, (iv) hemlun á æxlishvetjandi bólgusvari, (v) hemlun á ífarandi vexti og meinvarpamyndun, (vi) hindrun á nýmyndun æða, (vii) hindrun á DNA viðgerð, (viii) virkjun á stýrðum frumudauða (lat. apoptosis), (ix) hliðrun á efnaskiptum frumunnar í átt að loftháðri glýkólýsu og (x) hindrun á framleiðslu vaxtarþátta (52-54) (Mynd 4b). Þegar sameindaskotmörk resveratról eru skoðuð til hliðsjónar við hin 10 kennimerki krabbameina, sem birt voru í tímaritinu Cell árið 2011, þá vaknar sú spurning hvort að resveratról geti mögulega haft bælandi áhrif á öll þessi 10 kennimerki (55) (Mynd 4c). Greinin er eftir þá Hanahan og Weinberg og er hún endurskoðun á klassískri grein sem þeir skrifðu í sama tímariti rúmum áratug áður (56).



Mynd 4:

a. Bælandi áhrif resveratróls á ýmsar krabbameinsfrumur. *In vitro* rannsóknir hafa sýnt fram á að resveratról geti hamið vöxt blöðruhálskirtils-, bris-, brjósta-, eggjastokks-, flöguþekju-, lifrar-, maga-, ristil-, skjaldkirtils- og vélindakrabbameina auk B-eitilfrumuæxla, mergæxla (e. Multiple myeloma), hvítblæðis í merg- og eitilfrumum, illkynja æxla í þverráka vöðvum (e. Rhabdomyosarcoma), illkynja beinæxla, sortuæxla (e. Melanoma), mænukímfrumuæxla (e. Medulloblastoma) og illkynja tróðfrumuæxla (e. Glioma) (48-51).

b. Sameindaskotmörk resveratróls. Rannsóknir benda til þess að resveratról miðli hamlandi áhrifum sínum á krabbameinsvöxt með stöðvun frumuhrings (↓cyclín D1,D2,E; ↓CDK 2,4,6); virkjun á frumum ónæmiskerfisins (↑IL-2,12 og ↑IFN-γ); hindrun á telómerasa; hindrun á æxlishvetjandi bólgusvari (↓NF-κB, ↓COX1,2 og ↓5-LOX); hindrun á ífarandi vexti og meinvarpamyndun (↓MMP9 og ↓IL-1,6,8); hindrun á nýmyndun æða (↓VEGF og ↓iNOS); hindrun á DNA viðgerð með því að kljúfa PARP; virkjun á stýrðum frumudauða (↓Survivin, ↓Bcl-2, ↓Bcl-xL, ↓IAP og ↓TRAF1); hindrun á PKM2 og hliðrun á efnaskiptum frumunnar í átt að loftháðri glýkólýsu; hindrun á framleiðslu vaxtarþátta (↓TNF, ↓EGF og ↓IL-1,6,8) (52-54).

c. 10 kennimerki krabbameina. Hin 10 kennimerki krabbameina, sem birt voru í tímaritinu Cell árið 2011 eru: 1. Ónæmi fyrir vaxtarbælandi boðefnum. 2. Undanskot frá ónæmiskerfi. 3. Takmarkalaus geta til fjölgunar. 4. Æxlishvetjandi bólgusvar. 5. Ífarandi vöxtur og meinvörp. 6. Nýæðamyndun. 7. Óstöðugleiki erfðaefnis og stökkbreytingar. 8. Undanskot frá stýrðum frumudauða. 9. Hliðrun á efnaskiptum frumunnar. 10. Sjálfbærni í framleiðslu vaxtarþátta (55).

3.4 Glioblastoma heilaæxli

Á Íslandi eru heila- og önnur miðtaugakerfisæxli um 3% allra greindra krabbameina. Á árunum 2002-2006 greindust árlega að meðaltali um 40 tilfelli, en aldursstaðlað nýgengi er um 9 tilfelli miðað við 100.000 karla og 12 miðað við 100.000 konur. Meðalaldur við greiningu er 53 ár en heilaæxli geta þó myndast í fólki á öllum aldri og eru þau algengustu föstu æxli í börnum auk þess að valda hjá þeim flestum dauðsföllum vegna krabbameina. Almennt eru heilaæxli algengari hjá hvíta kynstofninum og dánartíðni er hærri hjá körlum en konum (57).

Æxli í heila eru misleitur hópur æxla en uppruna þeirra má ýmist rekja til heilavefjarins sjálfs eða öllu oftar til meinvarpa annars staðar frá, einkum frá lungna-, brjósta-, nýrna- og húðsortuæxli. Æxli upprunnin í heilavef eru kölluð eiginleg heilaæxli og verða þau einkum til við illkynja ummyndun þroskaðra taugastoðfrumna eða taugastofnfrumna. Eiginleg heilaæxli meinverpast sjaldan eða aldrei út fyrir miðtaugakerfið en geta dreifst innan þess (58).

Algengustu og jafnframt illvígustu heilaæxlin í mönnum eru GBM en þau eru samkvæmt Alþjóða heilbrigðismálastofnun (e. World Health Organization, WHO) flokkuð sem fjórðu gráðu stjarnfrumuæxli (lat. astrocytoma). GBM eru eiginleg heilaæxli með gríðarlega misleita svip- og sameindagerð sem endurspeglar upprunann frá ólíkum þroskunarstigum stjarnfrumna (e. astrocytes), fáhyrna (e. oligodendrocytes) og heilaþelsfrumna (e. ependymal cells). Æxlin samanstanda þó að mestu af myndlausum stjarnfrumum með óreglulegan kjarna, vökvadrepi (e. liquefactive necrosis) og auknum vexti æðaþelsfrumna. Æxlisfrumunar raða sér gjarnan í kringum drepsvæðin og þá yfirleitt í heilahvelum (58). Meinafræðingar flokka æxlin eftir staðsetningu, frumugerð, frumuþéttleika, stigi frumskiptinga og því hvort ákveðnir líffærameinafræðilegar eiginleikar séu til staðar við ljóssmásjárskoðun eða ekki.

GBM má skipta í „prímer“ eða „sekúnder“ æxli á grundvelli þróunar. „Prímer“ eða sjálfsprottin IV gráðu GBM hafa oft yfirtjáningu á EGFR (epidermal growth factor receptor) geni, stökkbreytingu í PTEN (phosphatase and tensin homolog) geni, brottfall á CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), MDM2 (murine double minute 2) og INK4α genum og tap á p14 og p16 æxlisbæliprótínum. „Sekúnder“ GBM byrja hinsvegar sem I-III gráðu stjarnfrumuæxli með stökkbreytingu í p53 æxlisbæliprótíni sem veldur uppsöfnun litningagalla og þróun yfir í IV gráðu GBM. „Sekúnder“ GBM hafa auk þess yfirtjáningu á PDGF (Platelet derived growth factor) og PDGFRα (platelet derived growth factor receptor α) (59). Nýlega kom í ljós stökkbreyting í IDH 1 og 2 (isocitrate dehydrogenase 1 og 2) genum í

um 10% GBM og 80% stjarnfrumuæxla af lægri gráðum (60). Tilvist stökkbreytingarinnar hefur verið tengd betri horfum sjúklinga og efnaskiptalegri umbreytingu æxlanna. Stökkbreytt IDH genin tjá fyrir umbreyttu ensími í sítrónusýruhringnum sem getur breytt alfa-ketóglútarati í R(-)-2-hýdroxýglútarat en nýlega var sýnt fram á að R(-)-2-hýdroxýglútarat hindri afmetýleringu históna með þeim afleiðingum að þroski ósérhæfðra frumna stöðvast (61).

Orsakir heilaæxla eru mjög á huldu. Síaukin notkun þráðlausra síma og farsíma hefur vakið áhyggjur margra og mikið er rannsakað í þeim efnum, en það hefur ekki átt við rök að styðjast að rafsegulbylgjur séu áhættuþáttur (62). Þá hefur fjöldi efna og efnasambanda verið athugaður vegna mögulegs sambands atvinnu og myndunar heilaæxla. Sem dæmi má nefna efnið vínylklóríð sem notað er í jarðolíu- og jarðgasvinnslu, landbúnaði (skordýraeitur) og gúmmíiðnaði en ekki hefur heldur tekist að sýna fram á klárt orsakasamband þar (63). Staðfest hefur verið orsakasamband á milli jónandi geislunar og heilaæxla (64). Rannsókn frá árinu 2006 sýndi samband heilaæxla og útsetningar fyrir blýi á vinnustað (65) og nýlega uppgötvuðust hugsanleg tengsl við alkóhólneyslu (66). Dæmi um óbreytanlega áhættuþætti eru hækkandi aldur, hvítur kynþáttur og saga um heilaæxli í fjölskyldunni en erfðafræðilegir þættir eru taldir hafa áhrif í innan við 1% illkynja heilaæxla (63).

Klínísk einkenni heilaæxla stafa yfirleitt af auknum innankúpuþrýsting vegna ífarandi æxlisvaxtar í nálægan heilavef og sérstaklega vegna meðfylgjandi dreps, bólgusvörunar og bjúgmyndurnar. Helstu klínísku einkennin eru höfuðverkur, ógleði, uppköst, sjóntruflanir, persónuleikabreytingar, minnistruflanir, jafnvægisskerðing, heyrnarskerðing, flog og skert meðvitund. Höfuðverkur er oftast fyrsta einkenni heilaæxlis eða í um 35 % tilfella (58).

GBM eru á meðal erfiðustu krabbameinssjúkdóma vegna þess hve hratt og ífarandi þau vaxa, hve lítið þau svara geisla- og lyfjameðferð, ennfremur hve erfitt er að fjarlægja þau að öllu með skurðaðgerð og hve skammur tími líður frá greiningu að erfiðum einkennum eins og krömpum og persónuleikabreytingum og að lokum andláti. Nýlegar rannsóknir sýna að meðal lifun GBM sjúklinga er um eitt ár eftir fulla meðferð en án nokurrar meðferðar lifa fæstir lengur en örfáa mánuði (67). Dræmur árangur lyfjameðferðar stafar vafalaust að verulegu leyti af misleitri gerð GBM. Fruma í misleitu æxli þarf ekki að innihalda sama safn stökkbreytinga og næsta fruma en fjöldi frumusvipgerða í heilaæxli getur verið mikill og jafnvel numið þúsundum (68). Ákveðnar frumur innan æxlisins geta því verið ónæmar fyrir tilteknu lyfi en aðrar ekki. Sumar frumur skipta sér sjaldan og þá hafa krabbameinslyf sem

hindra frumuskiptingu lítil áhrif. Í þessum tilvikum getur verið til lítils að beita frumudrepandi krabbameinslyfjum.

3.5 Krabbameinslyfin Cisplatín og Temósólómíð

Lyfjameðferð við GBM var fyrst kynnt til sögunnar á níunda áratugnum með flokki alkýlerandi krabbameinslyfja þar sem Cisplatín (CIS) var fremst í flokki (59). Skurð- og geislameðferð voru þó áfram ráðandi í baráttunni við heilaæxli og illa gekk að sýna fram á gagnsemi lyfjameðferðar sem viðbótarmeðferð (69).

Árið 2005 kom fram slembiröðuð lyfjarannsókn með 573 þáttakendum þar sem sýnt var fram á aukna lifun hjá sjúklingum sem hlutu lyfjameðferð með lyfinu Temósólómíð (TMZ), sem gefið var samhliða og í kjölfar geislameðferðar, þegar sú nálgun var borin saman saman við geislameðferð eina og sér. Um 25% þeirra sem tóku Temósólómíð voru á lífi 2 árum eftir að meðferð hófst borið saman við 10% hjá þeim sem ekki fengu Temósólómíð (70). Í kjölfarið hefur ráðandi meðferð við GBM verið þríþætt frá árinu 2005. Fyrsta meðferð er nánast undantekningarlaust skurðaðgerð, sé æxlið staðsett þannig að hægt sé að komast að því, en í kjölfarið geislameðferð samhliða lyfjameðferð. Eftirmeðferð með Temósólómíð er í dag hefðbundin meðferð, sem verið er að reyna að bæta frekar. Þegar Temósólómíð gagnast ekki er er oft stuðst við önnur lyf eins og Cisplatín.

Cisplatín var fyrsta krabbameinslyfið í flokki platínum sambanda. Lyfið myndar krosstengi við DNA og hindrar í kjölfarið jafnskiptingu frumunnar (e. mitosis), kallar á DNA viðgerð og stuðlar að stýrðum frumudauða þegar viðgerðin tekst ekki. Lyfið er gefið í æð í skamman tíma en ónæmi gegn lyfinu myndast fljótt. Lagt hefur verið til að fruman myndi ónæmi með því að breyta upptöku og útskilnaði sínum á lyfinu, hindra stýrðan frumudauða og auka DNA viðgerð (71). Sértæk aukaverkun af Cisplatín er nýrnaskaði og því þarf að fylgjast vel með nýrnastarfsemi á meðan meðferð er beitt. Til að lágmarka nýrnaskaða en hámarka lyfhrif er gjarnan notast við þvagræsingu ásamt vökvagjöf. Nýrnaskaðinn virðist fyrst og fremst stafa af myndun hættulegra hvarfgjarnra milliefna og skömmu eftir tilkomu lyfsins kom upp sú hugmynd að gefa andoxunarefni samhliða Cisplatín meðferð til að koma í veg fyrir nýrnaskaða (72). Í því samhengi ber að nefna að rannsókn frá 2010 sýndi að andoxunarefnið resveratról hefði marktækt meiri bælandi áhrif á vöxt EAC (Ehrlich ascites carcinoma) æxlismódels í músum heldur en Cisplatín. Þegar hvort tveggja var gefið saman kom í ljós að resveratról jók áhrifin af Cisplatín (73).

Temósólómíð er annarrar kynslóðar alkýlerandi krabbameinslyf úr röð imíðasótetrasína (e. imidazotetrazine). Lyfið hefur reynst vel við GBM þar sem það er nánast 100% frásogað, fer greiðlega yfir blóð-heila hindra og nær fullum drápsstyrk (e. inhibitory concentration, IC) innan heilans (74). Rannsóknir hafa sýnt að Temósólómíð örvi stýrðan frumudauða (75), sjálfsát (e. autophagy) (76), stöðvun frumuhrings og valdi því að jafnskipting frumunnar kemst í uppnám (e. mitotic catastrophe) (77). Einnig hefur verið sýnt fram á að lyfið virki frekar á GBM stofnfrumur heldur en sérhæfðar frumur (78). Þá hefur verið sýnt fram á virkni lyfsins bæði hjá nýgreindum og endurkomu GBM tilfellum (70). Aftursýn rannsókn frá 2012 staðfestir fyrri rannsóknir um aukna lifun GBM sjúklinga eftir viðbótarmeðferð með Temósólómíð (79).

Flestir sjúklingar þola Temósólómíð tiltölulega vel en á móti kemur að æxlin mynda oftast fremur fljótt þol gegn lyfinu. Einn þekktur þáttur sem stuðlar að þolmynduninni er metýlering á stýriröð MGMT (O^6-metýlgúanín-DNA-metýltransferasa) gensins sem leiðir til minnkaðrar tjáningar á MGMT viðgerðarprótíni. Alkýlerandi krabbameinslyf á hindra eftirmyndun DNA með því að binda alkýlhópa á núkleótíð í DNA, t.a.m. á O^6 gúanín. MGMT viðgerðarprótínið fjarlægir alkýl hópa af O^6-gúanín og hafa rannsóknir sýnt að ofmetýlering á stýriröðinni og minnkuð tjáning prótínsins leiði til aukinnar virkni alkýlerandi lyfja á borð við Temósólómíð og Cisplatín (80).

Þrátt fyrir framfarir í myndgreiningu, skurðlækningum, geisla-, lyfja- og stoðmeðferðum hafa lífshorfur GBM sjúklinga einungis lítið batnað og flest æxlin þróa með sér minnkað lyfjanæmi, sem oftast leiðir til endurkomu æxlisins. Til að snúa við minnkuðu lyfjanæmi GBM frumna hafa menn einbeitt sér að skotmörkum á borð við Hsp90α siðgæðisprótín, EGFR vaxtarþáttarviðtaka, æxlisbæli- og MDR-gen, DNA viðgerð (MGMT), telómerasa og GBM stofnfrumur (59). Þörfin fyrir úrræði sem eykur lyfjanæmi GBM er augljós.

3.6 Lyfjanæmispróf á heilaæxlum og klínisk þýðing þeirra

Skömmu eftir tilkomu lyfjameðferðar við krabbameini uppgötvuðu menn að sjúklingar með sömu sjúkdómsgreiningu sýndu misgóða svörun við sömu lyfjameðferð. Þá kviknaði áhugi manna fyrir lyfjanæmisprófunum æxlisfrumna *ex vivo*. Í kjölfarið hófu menn að þróa ýmis lyfjanæmispróf (e. chemosensitivity testing) til að sannreyna mögulega einstaklingsbundna krabbameinslyfjameðferð.

Þegar kemur að því að velja hentugt lyf fyrir krabbameinssjúkling þurfa læknar að treysta á niðurstöður klíniskra rannsókna ásamt eigin þekkingu og reynslu. Krabbameinslæknir getur

því aðeins vitað hvaða lyf eru líklegust til þess að virka hverju sinni. Slíkar upplýsingar nægja ekki alltaf einar og sér þar sem breytileikinn á milli sjúklinga er eins mikill og raun ber vitni. Breytileikinn milli einstaklinga, æxla og jafnvel innan æxlis stafar meðal annars af erfðafræðilegri misleitni æxlisfrumna. Þörfin fyrir að sérsníða meðferð að hverjum GBM sjúklingi er gríðarleg í ljósi þess að GBM eru meðal misleitustu æxla sem finnast í mönnum (81).

Til að hægt sé að framkvæma lyfjanæmispróf á krabbameinsæxli þarf fyrst að taka sýni úr æxlinu og einangra úr því krabbameinsfrumurnar. Frumurnar eru ræktaðar í tilsvarandi æti í hitaskáp við 37°C og 5% CO_2 til að reyna að líkja eftir aðstæðum innan líkamans. Þá er frumunum deilt á lyfjabakka með þeim lyfjum sem prófa skal. Að ákveðnum tíma liðnum eru frumurnar taldar og/eða efnaskipti þeirra mæld og áhrif mismunandi krabbameinslyfja metin útfrá hlutfallslegu frumudrápi. Mat á lifun má framkvæma með ýmsum prófum en Tilgangurinn er að meta hvaða lyf og/eða lyfjastyrkur hefur mest frumudrepandi áhrif og um leið að útiloka þau lyf sem ekki eru líkleg til að vinna á krabbameininu.

Rannsóknir hafa sýnt að það lyf sem hefur besta virkni í lyfjanæmisprófi virki á sjúklinginn í um 65% tilvika og að versta lyfið í slíku prófi virki einmitt ekki í yfir 90% tilvika (82). Þannig er með 90% öryggi hægt að segja til um hvaða lyf muni reynast gagnslaus við krabbameinsmeðferð og um leið sparast sjúklingnum hliðarverkanir viðkomandi lyfja. Þá sýnir rannsókn frá 2010 að það geti verið efnahagslegur ávinningur af innleiðingu lyfjanæmisprófa fyrir ákveðnar gerðir krabbameina (83). *In vitro* lyfjanæmisprófanir eru enn á tilraunastigi en þörf er á frekari klínískum rannsóknum til að staðfesta mögulegt notagildi þeirra.

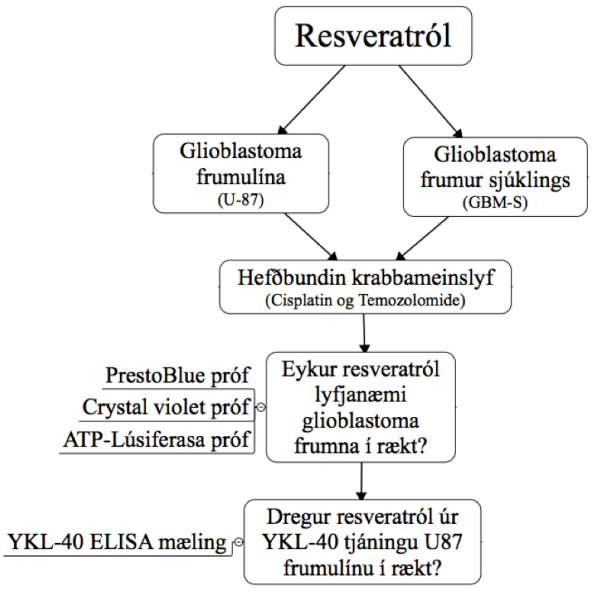
3.7 YKL-40 og krabbamein

YKL-40, einnig kallað HC gp-39 (human cartilage glycoprotein-39), er seytt glýkóprótín sem fyrst var borið kennsl á fyrir rúmum áratug við rækt MG63 frumulínu (illkynja beinæxlis frumulína) (84). YKL-40 er seytt af fjölda frumugerða og getur bæði verið vaxtarþáttur (85) og viðloðunarsameind (86). Prótínið tilheyrir fjölskyldu kítínasa líkra prótína sem hafa varðveitt kítinbindiset sín en misst ensímvirknina vegna færslu einnar amínósýru í virknisetinu (87). Hlutverk YKL-40 í þróun krabbameina er enn að miklu leyti óljóst en rannsóknir hafa bent til þess að YKL-40 styðji við vöxt og þroskun krabbameinsfrumna með því að hindra stýrðan frumudauða en stuðla að æðanýmyndun, umsetningu utanfrumuefnis og myndun meinvarpa (88, 89).

Rannsóknir hafa sýnt fram á aukna tjáningu YKL-40 hjá ýmsum krabbameinum og hefur hún verið sett í samhengi við þróun æxlis og verri horfur sjúklings. YKL-40 er það prótín sem tjáð er í einna mestu yfirmagni í GBM en það er ekki tjáð í heilbrigðum heilavef (90). Þegar YKL-40 tjáning er slegin út hjá GBM-frumum stöðvast þær í G1 fasa og verða minna ífarandi og næmari fyrir krabbameinslyfjum og geislun (90). Enn fremur var nýlega sýnt fram á að resveratról geti dregið úr YKL-40 tjáningu GBM-frumna í rækt (91). Þá lofar góðu að mæla YKL-40 með ELISA aðferð í þeim tilgangi að spá fyrir um horfur hjá GBM sjúklingum (92). YKL-40 er því aðlaðandi skotmark í þróun nýrra meðferða við GBM og við krabbameini almennt.

3.8 Markmið rannsóknarinnar

Resveratról er þannig talið grípa inn í boðefnaferla frumnanna og draga úr krabbameinssvipgerð þeirra, sem leiðir m.a. af sér að hömlum er aflétt fyrir stýrðum frumudauða. Í kjölfarið verður aukning á lyfja- og geislanæmi krabbameinsfrumnanna. Markmið okkar rannsóknar var að meðhöndla U87 glioblastoma frumulínu í rækt með resveratról og meta síðan YKL-40 tjáningu hennar og næmi fyrir hefðbundnu krabbameinslyfjunum Temósólómíð og Cisplatín. Þá var reynt að snúa áhrifunum af resveratról við með því að baða frumurnar í YKL-40. Rannsóknin var síðan endurtekin á frumum frá GBM sjúklingi (Mynd 5).



Mynd 5. Uppsetning rannsóknarinnar.

4 Efniviður og aðferðir

4.1 Efni og áhöld

Manna glioblastoma frumulína, U87, var fengin frá ATCC (American Type Culture Collection). GBM-S frumulínan var einangruð úr fersku GBM sýni sem fengið var frá taugaskurðdeild Landspítalans eftir tilskilin leyfi Vísindasiðanefndar og Persónuverndar.

Ræktunarflöskur, flatir 96 holu ræktunarbakkar, 15 og 50 mL túbur voru frá Falcon Bd bioscience. 10 og 25 mL glerpípettur voru frá Sarstedt. Vinnsla á frumuræktum og vefjasýnum fór fram í Labcaire Vertical Laminar Flow rannsóknarskáp með Ovation stafrænum pípettum og pípettuoddum frá VistaLab en Pipetboy acu rafmagnspípettu frá Integra. Spuni á frumulausnum fór fram í Sorvall Legend RT kælanlegri skilvindu frá Kendro Laboratory Products.

Frumutalningar voru gerðar með Bio-Rad TC10 sjálfvirkum frumuteljara á Bio-Rad talningaglerjum. Frumur voru skoðaðar með Olympus CK40 viðsnúinni ljóssmásjá. Myndir voru teknar af frumunum með Leica DFC480 stafrænni myndavél. Við birtumælingar var notast við Orion L birtumæli frá Berthold Detection Systems GmbH og voru gögnin lesin af Simplicity 4.20 hugbúnaði.

Við gleypnimælingar var notast við MultiScan MCC/340 og HTS 7000 mæli frá Perkin Elmer og voru þau gögn lesin af HtsOle hugbúnaði. MicroVue YKL-40 ELISA prófið var frá Quidel. YKL-40 var fengið frá Bjarna Þór Sigurðssyni, meistaranema í lífeindafræðum við Læknadeild Háskóla Íslands.

Krabbameinslyfin Cisplatín (innrennslisstofn, 1 mg/ml) og Temósólómíð (Temodal, 250 mg hart hylki) voru fengin frá Landspítala. Lúsiferín-lúsifera lausnin og TCER (Tumor cell extraction reagent) lausnin voru blandaðar af starfsfólki ValaMed. Resveratról og Temósólómíð voru leyst í dímetýlsúlfoxíði (DMSO) sem blandað var á rannsóknarstofu ValaMed. Crystal violet, Ficoll þéttilausn, resveratról, Trypan blue (0,4%) og trypsín voru frá Sigma-Aldrich. DMEM frumuæti (Dulbecco's modified Eagle medium), FBS (fetal bovine serum) nautgripafóstursermi, PBS (Phosphate buffer salin) fosfat-salt-jafnalausn, penicillin-streptomycin sýklalyf og PrestoBlue lausnin voru frá GIBCO Invitrogen.

4.2 Rannsóknarsnið og framkvæmd

4.2.1 Undirbúningur U87 frumulínu

U87 frumulínan frá ATCC var upphaflega einangruð úr sjúklingi með GBM. Frumulínan hafði verið fryst í fljótandi nitri og hana þurfti því að afþýða áður en frumunum var sáð í ræktunarflöskur með sermisæti (DMEM frumuæti, 10% FBS nautgripafóstursermi og 1% penicillin-streptomycin sýklalyf). Þær voru látnar vaxa í 3 daga í senn í ræktunarskáp við 37°C og 5% CO_2. Eftir þann tíma voru þær orðnar 70-90% þekjandi, höfðu myndað anga og fest sig niður á botn ræktunarflaskna. Frumurnar voru þá skolaðar með flutningsæti (e. transfer medium, TM) og var trypsín notað til að losa þær fyrir tilraunir og endursáningu á nýjar ræktunarflöskur í hlutfallinu 1:4.

4.2.2 Undirbúningur glioblastoma frumna sjúklings

Sýni úr GBM heilaæxli var fengið af Landspítala. Sýninu var gefið dulkóðunarnúmer til að ekki væri hægt að rekja það aftur til sjúklings. Fyrsta skrefið var að skera sýnið í nokkra búta sérhver um1 mm^3 að stærð og láta það meltast í 0,1% kollagenasalausn yfir nótt. Hrist var upp í sýninu eftir þörfum. Sýnið var þá spunnið í skilvindu í sjö mínútur við 300 × g. Flotinu var hellt af og pellettan (samsafn frumnanna) leyst upp í TM. Aftur var spunnið og pellettan leyst upp í TM. Þá var frumulausnin spunnin gegnum ficoll þéttilausn með eðlisþéttnina 1.077 g/cm^3 í 30 mínútur við 400 × g.

Við þetta myndaðist frumulag milli þéttilausnar og frumulausnar. Frumulagið var einangrað og frumurnar þvegnar tvisvar uppúr TM. Í seinna skiptið var pellettan leyst upp í sermisæti. Þá voru frumurnar taldar með sjálfvirkum frumuteljara sem notar útilokunaraðferð byggða á trypan bláum lit og reyndust þær vera 2,5 milljón talsins. Að lokum voru frumurnar settar á ræktunarflösku og henni komið fyrir í ræktunarskáp í sólarhring við 37°C og 5% CO_2. Frumurnar festu sig ekki niður á botn ræktunarflöskunnar svo ekki var þörf á að losa þær með trypsíni.

4.2.3 Undirbúningur resveratról og krabbameinslyfja

Resveratról var leyst upp í DMSO til að útbúa 100 mM stofnlausn. Stofnlausnin var síðan þynnt með sermisæti fyrir notkun á frumur. Notast var við þynningarnar 100; 50; 25; 12,5; 6,25 og 3,125%. 100% styrkur fyrir resveratról var 100 µM. Styrkur DMSO í hverjum brunni fór því aldrei yfir 0,1%.

Cisplatín var á innrennslisformi og var stofnlausnin í styrknum 1 mg/ml. Temósólómíð fæst bæði á sprautuformi og í hylkjum en hylkin eru mun algengari. Innihald 250 mg hylkis var leyst í DMSO til að fá 20 mg/ml stofnlausn. Stofnlausnirnar voru þynntar með sermisæti fyrir notkun í tilraunir.

Bæði lyfin voru notuð í styrkjum frá IC50 (e. half maximal inhibitory concentration) og voru lausnirnar raðþynntar niður í 6% af upphaflegum styrk. Ákvörðun var tekin um að notast við þá IC50 styrki sem birtir hafa verið fyrir U87 frumulínu til að tryggja að krabbameinslyfin myndu ekki drepa frumurnar. 100% styrkur (IC50) fyrir Cisplatín var því 0,9 μM en 390 μM fyrir Temósólómíð (93, 94).

Til að mæla möguleg samverkandi áhrif resveratróls og lyfjanna tveggja voru útbúnar tvær mismunandi lausnir með resveratróls og hvoru krabbameinslyfi til helminga í sömu upphafsstyrkjum og fyrr. Þær lausnir voru svo raðþynntar niður í 6% af upphaflegum styrk. Þá voru útbúnar viðmiðunarlausnir af DMSO í sömu styrkjum og resveratróls annars vegar og Temósólómíð hinsvegar til að mæla möguleg áhrif af DMSO. Þær lausnir voru raðþynntar á sama hátt og hinar, niður í 6% af upphaflegum styrk.

4.2.4 Prófun resveratróls og krabbameinslyfja

Til að útbúa 96 holu ræktunarbakka með 20.000 frumum í hverjum brunni þurfti fyrst að telja frumurnar, spinna þær síðan niður og leysa þær upp í viðeigandi rúmmáli af sermisæti. Þá fékst frumulausn sem hægt var að deila jafnt á 96 holur bakkans svo að 20.000 frumur yrðu í hverjum brunni. U87 frumulínan var látin vaxa í 24 klst á bakkanum svo að þær næðu botnfestu áður en efnunum var bætt á. GBM frumur sjúklings þurftu ekki þennan vaxtartíma enda eru þær ekki taldar festa sig jafn mikið og efnin mátti því setja á frumurnar sama dag og þeim var sáð á bakkann.

Resveratról var bætt í viðeigandi brunna á þremur bökkum og var raðþynnt sex sinnum. Hver bakki var mældur að ákveðnum tíma liðnum, sá fyrsti eftir 24 klst, annar eftir 48 klst og sá þriðji eftir 72 klst, þrítekið fyrir hvern tímapunkt. Cisplatín og Temósólómíð ýmist með eða án resveratróls var bætt í viðeigandi brunna á öðrum bökkum og var raðþynnt sex sinnum, þrítekið fyrir hvert lyf/efnablöndu. Þeir bakkar voru mældir að 72 klst liðnum.

Resveratról og Temósólómíð stofnlausnirnar höfðu verið blandaðar í DMSO og því var tilsvarandi styrkur af DMSO hafður sem viðmið í þeim mælingum. Í öllum mælingum voru almennir viðmiðunarbrunnar hafðir efst (maximum inhibition, MI) og neðst (no inhibition

control, M0). Í MI var sett Triton X-100 sápulausn til að fá algjört frumudráp en í M0 eingöngu frumur og æti til að fá fulla frumulifun.

4.2.5 Mat á lífvænleika með ATP-Lúsiferasa, PrestoBlue og Crystal violet prófum

Ýmis próf hafa verið þróuð til að meta lífvænleika eftir að frumur hafa verið útsettar fyrir lyfjum *in vitro*. Prófin eru allt frá einföldun frumutalningum til óbeinna mælinga á borð við hin svokölluðu ATP-Lúsiferasa, PrestoBlue og Crystal violet próf.

ATP-Lúsiferasa prófið byggir á efninu lúsiferín sem er náttúrulegt efni í eldflugum. Lúsiferín hvarfast við súrefni og gefur frá sér ljós fyrir tilstilli efnahvatans lúsiferasi (ATPasi). Ljósmagnið er í réttu hlutfalli við það magn ATP sem lúsiferasinn nýtir og endurspeglar því lífvænleikann. Til að mælingin verði marktæk þarf þó að tryggja að allt ATP innan frumu sé mælt. Í þessari rannsókn var því notuð TCER (Tumor cell extraction reagent) sprengilausn, hönnuð af prófessor Ian Cree. Lausnin inniheldur Triton X-100 til ATP útdráttar og Vanadat til samkeppnishindrunar á ATPösum. Þá var fjölrása pípetta notuð til að setja 50 µL af lúsiferasa lausn í hvern brunn og ljósmagnið mælt í Orion L birtumæli.

Undirstaða PrestoBlue lausnarinnar er efnið resazurin sem nýtir afoxunarhæfni lifandi frumna til að endurspegla lífvænleika frumulausnar. Efnið er frumugegndræpt og blátt á lit en þegar því er bætt út á lifandi frumur afoxast það, tekur á sig rauðan lit og verður flúrljómandi. Þessi breyting var mæld með HTS 7000 Perkin Elmer gleypnimæli við 590 nm bylgjulengd. Fjölrása pípetta var notuð til að setja 10 µL af PrestoBlue lausn í hvern brunn og gleypnin mæld innan 1-2 mínútna. Lengri biðtími hefði orsakað minni flúrljómun og skekkt mælinguna talsvert.

Crystal violet litar aðeins þær frumur sem eru lifandi og var sú litun því notuð í kjölfarið af PrestoBlue til að meta frumulifun. Hver brunnur ræktunarbakkanna var þveginn tvisvar með 200 µL af fosfat-salt-jafnalausn (e. Phosphate buffer saline, PBS) og frumurnar litaðar með 100 µL af 0.25% Crystal violet lausn í 10 mínútur. Bakkarnir voru þá þvegnir með eimuðu vatni og 100 µL af 33% ediksýru settir í hvern brunn til að leysa upp litinn í hverri holu. Gleypnin var mæld við 540 nm bylgjulengd í MultiScan MCC/340 gleypnimæli.

4.2.6 Mæling á YKL-40 tjáningu U87 frumulínu með ELISA aðferð

Settur var upp ræktunarbakki með ýmist 100 µM resveratról, 390 µM Temósólómíð (IC50) eða einungis sermisæti, þrítekið fyrir hverja breytu. Til að mæla tjáningu U87 frumulínu á YKL-40 prótíni var æti safnað úr hverjum brunni bakkans og var magnið af seyttu YKL-40

metið með ELISA aðferð samkvæmt leiðbeiningum framleiðanda (Quidel). Gleypni var mæld með MultiScan MCC/340 mæli við 405 nm bylgjulengd og útbúin staðalkúrfa til að reikna YKL-40 magnið í ng/mL.

4.2.7 Prófun á áhrifum YKL-40 á U87 frumulínu

Framkvæmd var þreifirannsókn þar sem reynt var að snúa við lyfjanæmisaukandi áhrifum resveratróls á U87 frumulínu með því að baða frumurnar í YKL-40. Settur var upp ræktunarbakki með 100 µM resveratról og 390 µM Temósólómíð (IC50) saman eða einungis sermisæti og var 100 ng af YKL-40 bætt útá, þrítekið fyrir hverja breytu. Áhrifin voru mæld með ATP-Lúsiferasa prófi og var notast við Orion L birtumæli.

4.3 Úrvinnsla

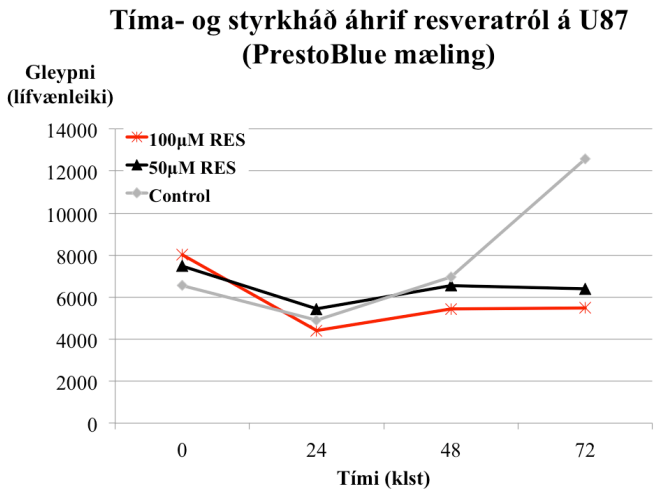
Við tölfræðiúrvinnslu var notast við forritin SigmaPlot 12.2 og Microsoft Excel 14.1.0. Gröf voru unnin í SigmaPlot og Microsoft Excel og töflur í Microsoft Excel og Microsoft Word 14.1.0. Myndir voru unnar í Mindjet MindManager 9.0.194. Gögnin voru normaldreifð og tölfræðileg marktækni á milli fleiri en tveggja hópa var því ákvörðuð með notkun einhliða dreifigreiningar (e. analysis of variance, ANOVA). Tölfræðileg marktækni á milli tveggja hópa var ákvörðuð með notkun t-prófs. Marktæknimörk voru miðuð við $p<0,05$.

5 Niðurstöður

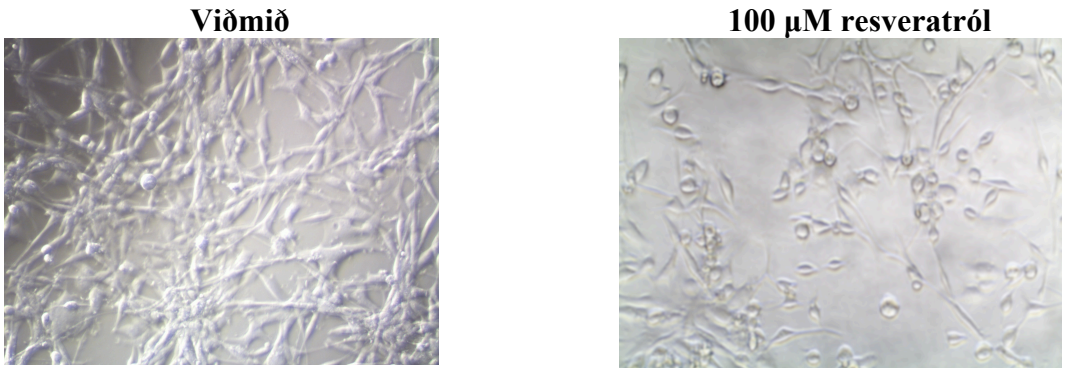
5.1 Resveratról sýnir tíma- og styrkháða hindrun á vexti U87 frumulínu

U87 frumulína sem skipti sér eftir veldisfalli var meðhöndluð með raðþynningum af resveratróli í 24, 48 og 72 klst. Notast var við þynningarnar 100; 50; 25; 12,5; 6,25 og 3,125 µM. Styrkur DMSO í hverjum brunni fór aldrei yfir 0,1%. Hlutfallsleg frumulifun var reiknuð sem hlutfall af fullri frumulifun. Niðurstöðurnar eru meðaltöl úr þríteknum mælingum með PrestoBlue mæliaðferð. Einsog sést á Mynd 6a, sýndi resveratról bæði tíma- og styrkháða hindrun á vexti U87 frumulínu. Eftir 72 klst mældist marktækur munur á meðhöndlun með resveratróli í styrkjunum 50 og 100 µM borið saman við 0 µM viðmiðunarhóp. Eftir 72 klst meðhöndlun með 100 µM resveratról borið saman við 0 µM viðmiðunarhóp mældist munur uppá 7093 gleypnigildi við 590 nm bylgjulengd. Sá munur var jafnframt hinn mesti sem mældist í tilrauninni. Því voru teknar myndir af frumunum fyrir og eftir 72 klst meðferð með 100 µM resveratról (Mynd 6b). Á myndunum má sjá greinilegan vaxtarmun. Þegar athuguð voru áhrif lægri styrkja af resveratróli (25; 12,5; 6,25 og 3,125 µM) mældist marktækur munur á 24 klst meðhöndlun með resveratról í styrknum 25 µM borið saman við 100 µM og 25 µM borið saman við 0 µM (p<0,001). 24 klst meðhöndlun með resveratról í styrknum 25 µM virtist hinsvegar glæða lífvænleika frumnanna (Mynd 6c). Meðhöndlun með 12,5; 6,25 og 3,125 µM resveratról hafði engin marktæk áhrif á lífvænleika U87 frumulínu.

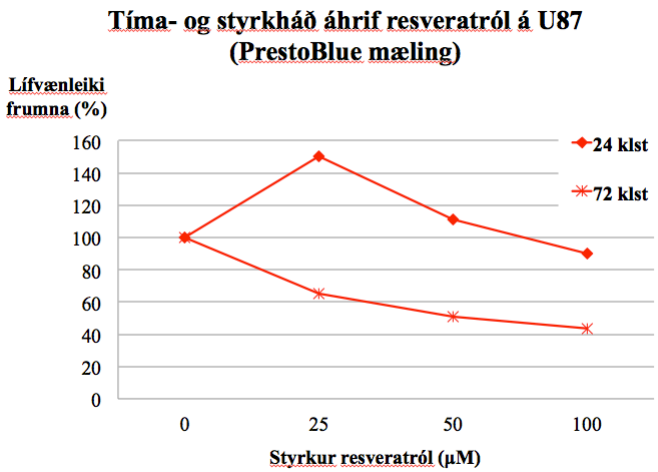
a.



b.



c.



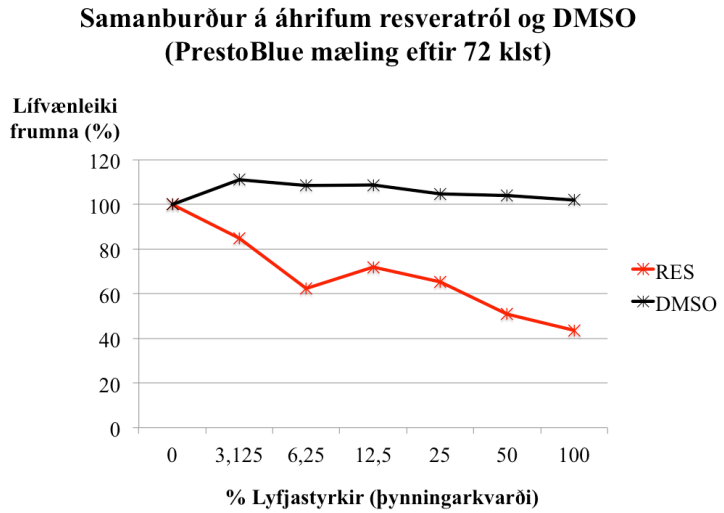
Mynd 6:

a. Tíma- og styrkháð hindrun resveratról á vexti U87 frumulínu. Meðhöndlun U87 frumna með 100 µM og 50 µM þynningum af RES, resveratról í 24, 48 og 72 klst. Lífvænleiki frumna var metinn með PrestoBlue. Hlutfallsleg frumulifun var reiknuð sem hlutfall af fullri frumulifun, MO (p<0.05).

b. Vaxtarmunur U87 frumna. Útlit U87 frumna fyrir og eftir 72 klst meðferð með 100 µM resveratról séð undir viðsnúinni ljóssmásjá. Upphafleg stækkun: 40x.

c. Þversagnakennd áhrif resveratról á vöxt U87 frumulínu. Eftir 24 klst mældist marktækur munur á meðhöndlun með resveratról í styrknum 100 µM borið saman við 25 µM (p<0,001) sem virtist glæða lífvænleika frumnanna. Þá mældist einnig marktækur munur á meðhöndlun með resveratról í styrknum 25 µM borið saman við 0 µM (p<0,001).

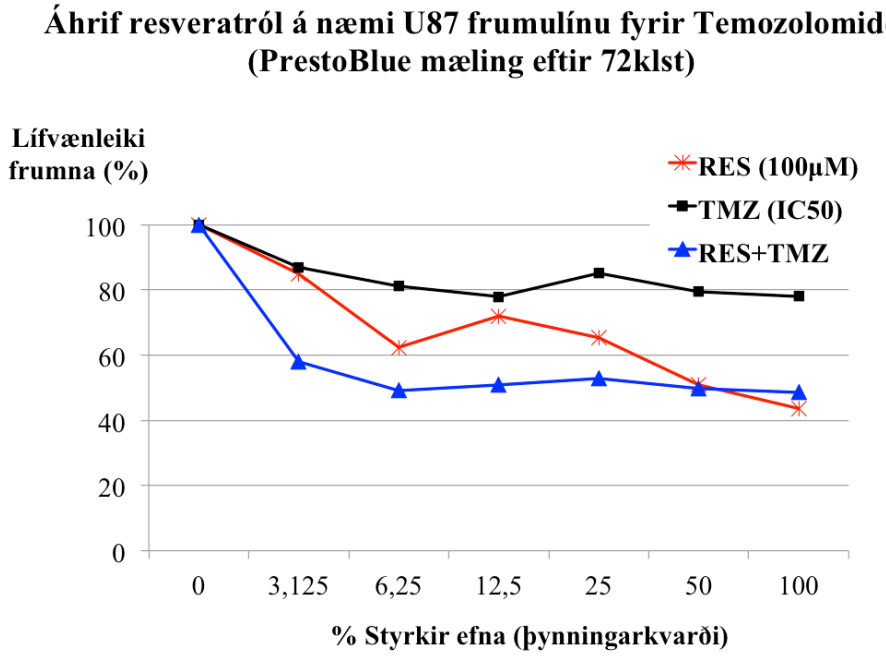
Útbúnar voru viðmiðunarlausnir af DMSO í sömu styrkjum og resveratról annars vegar og Temósólómíð hinsvegar til að mæla möguleg áhrif af DMSO. Þær lausnir voru raðþynntar á sama hátt og hinar, niður í 6% af upphaflegum styrk. Við samanburð allra breyta í öllum styrkjum mældust engin marktæk áhrif af DMSO með PrestoBlue. Niðurstöður úr samanburði á áhrifum resveratról og DMSO á lífvænleika U87 frumulínu eftir 72 klst eru sýndar á Mynd 7. Myndin sýnir að DMSO hafði ekki marktæk áhrif á niðurstöðuna (p<0,001).



Mynd 7: Samanburður á áhrifum resveratról og DMSO á lífvænleika U87 frumulínu eftir 72 klst. DMSO hafði ekki marktæk áhrif á lífvænleika U87 (p<0,001). Lífvænleiki frumna var metinn með PrestoBlue.

5.2 Resveratról eykur næmi U87 frumulínu fyrir Temósólómíð

Til að mæla möguleg samverkandi áhrif resveratról og Temósólómíð var U87 frumulína meðhöndluð með ýmist 100 µM resveratról, 390 µM Temósólómíð (IC50) eða hvoru tveggja saman í 72 klst. Allar lausnir voru raðþynntar niður í 6% af upphaflegum styrk, þrítekið fyrir hvert lyf/efnablöndu. Lífvænleiki frumna var metinn með PrestoBlue (Mynd 8). Marktækur munur mældist á RES+TMZ og TMZ í 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 og 100% styrkjum efna. Munurinn var mestur uppá 29,5% lækkun á lífvænleika við 100% styrki efnanna (p<0,001). Þá mældist marktækur munur á öllum styrkjum borið saman við engan styrk efna (0% styrkur efna) (p<0,001).

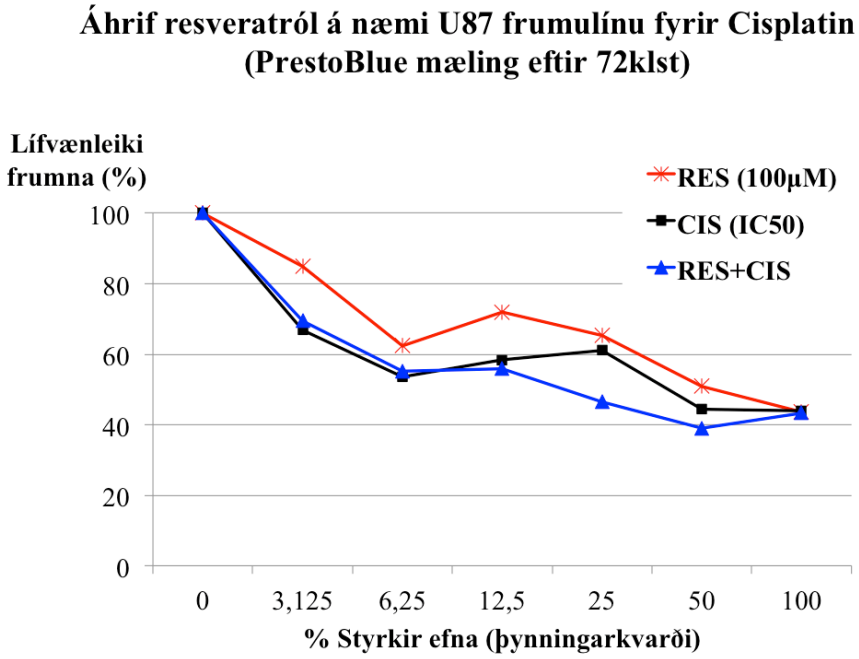


Mynd 8: Áhrif resveratról á næmi U87 frumulínu fyrir TMZ með PrestoBlue mælingu eftir 72 klst. Marktækur munur mældist á RES+TMZ og TMZ í 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 og 100% af upphafsstyrkjum efnanna. Munurinn var mestur uppá 29,5% lækkun á lífvænleika við 100% styrki efnanna (p<0,001).

5.3 Resveratról eykur næmi U87 frumulínu fyrir Cisplatín í hærri styrkjum

Til að mæla möguleg samverkandi áhrif resveratról og Cisplatín var U87 frumulína meðhöndluð með ýmist 100 µM resveratról, 0,9 µM Cisplatín (IC50) eða hvort tveggja saman í 72 klst. Allar lausnir voru raðþynntar niður í 6% af upphaflegum styrk, þrítekið fyrir hvert lyf/efnablöndu. Lífvænleiki frumna var metinn með PrestoBlue (Mynd 9).

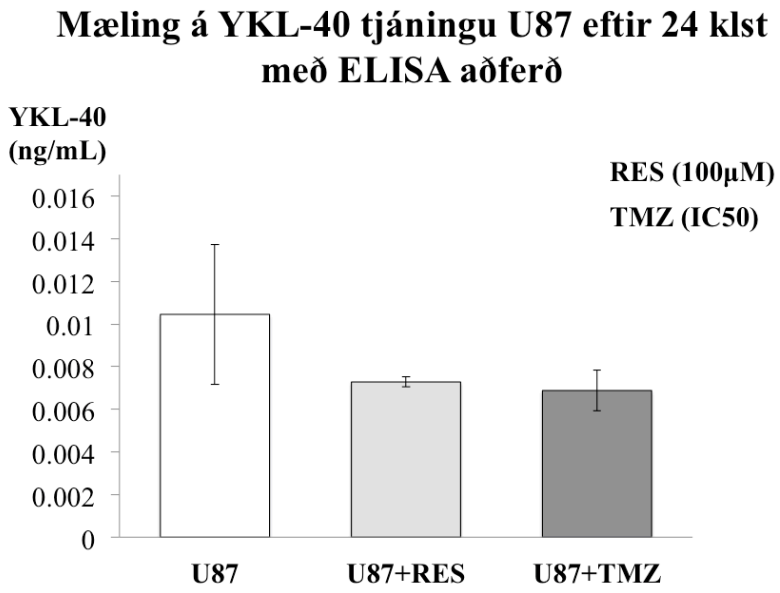
Marktækur munur mældist á öllum styrkjum efna innan hvers hóps (RES, CIS, RES+CIS) en þegar hóparnir voru bornir saman mældist aðeins marktækur munur á RES+CIS og CIS í 25% og 50% styrkjum. Sá munur var uppá 15% lækkun á lífvænleika við 25% styrk efnanna og 5,39% lækkun við 50% styrk. Þá mældist marktækur munur á öllum styrkjum borið saman við engan styrk efna. Við 100% styrk efna var enginn munur á meðferð með RES, CIS eða RES+CIS (p<0,001).



Mynd 9: Áhrif resveratról á næmi U87 frumulínu fyrir CIS með PrestoBlue mælingu eftir 72 klst. Marktækur munur mældist á RES+CIS og CIS í 25% og 50% af upphaflegum styrkjum efnanna. Munurinn var uppá 15% lækkun á lífvænleika við 25% styrki og 5,39% lækkun við 50% styrki (p<0,001).

5.4 Resveratról bælir YKL-40 tjáningu U87 frumulínu

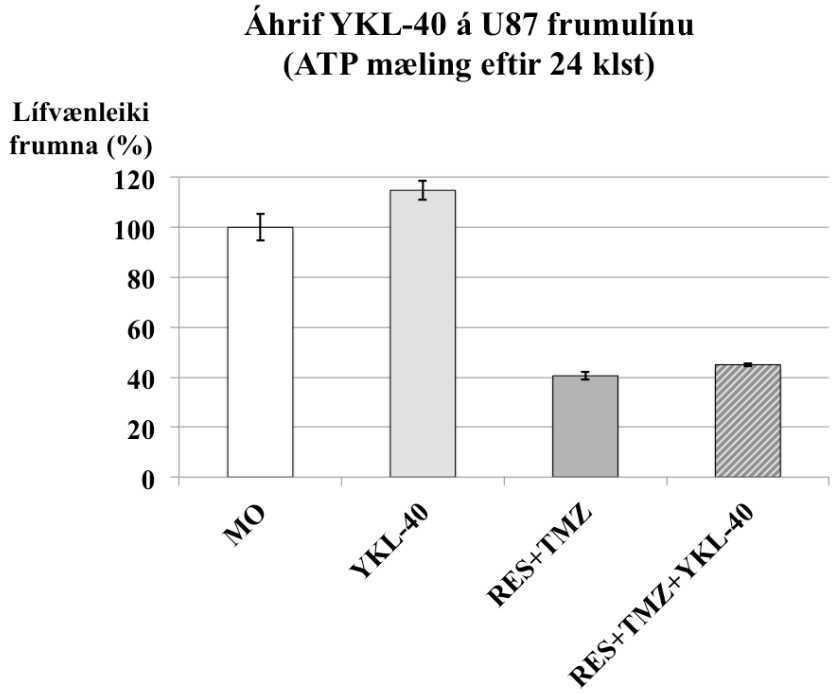
Seytt magn U87 á YKL-40 eftir 24 klst meðferð með ýmist 100 µM resveratról, 390 µM Temósólómíð (IC50) eða einungis sermisæti var metið með ELISA aðferð. Mynd 10 sýnir að þegar þessum styrkjum af resveratról eða Temósólómíð var bætt útá U87 minnkaði seytt magn YKL-40 marktækt borið saman við U87 hóp þar sem eingunis æti hafði verið bætt útá frumurnar.



Mynd 10: Mæling á YKL-40 tjáningu U87 frumulínu eftir 24 klst með ELISA aðferð. Seytt magn U87 á YKL-40 eftir meðferð með einungis sermisæti, 100 µM resveratról; RES eða 390 µM TMZ (IC50) var metið með ELISA aðferð. Útbúin var staðalkúrfa til að reikna YKL-40 magnið í ng/mL (y-ás).

5.5 YKL-40 snýr ekki við lyfjanæmisaukandi áhrifum resveratróls á U87 frumulínu

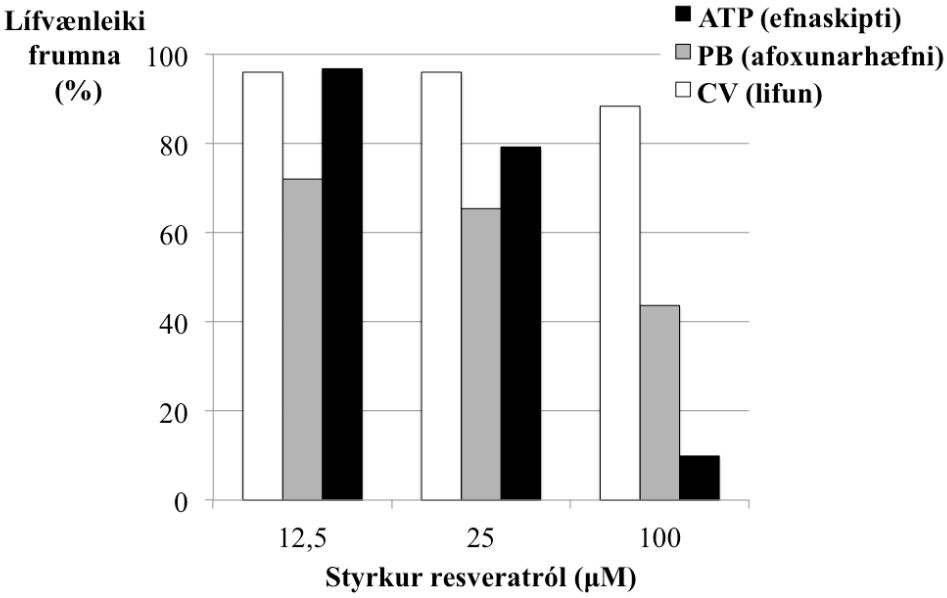
Framkvæmd var þreifirannsókn þar sem U87 var meðhöndluð með ýmist 100 µM resveratról, 390 µM Temósólómíð (IC50), 100 ng af YKL-40 og eða einungis sermisæti. Ekki mældist marktækur munur á lífvænleika frumnanna eftir viðbót 100 ng af YKL-40, hvorki þegar því var bætt útá U87 með æti né þegar því var bætt útá U87 með resveratról og Temósólómíð (Mynd 11).



Mynd 11: Áhrif YKL-40 á U87 frumulínu. Ekki mældist marktækur munur á lífvænleika U87 eftir viðbót 100 ng af YKL-40, hvorki þegar því var bætt útá U87 með æti (MO) né þegar því var bætt útá U87 með 100 µM resveratról (RES) og 390 µM TMZ (IC50). Lífvænleiki frumna var metinn með ATP-Lúsiferasa mælingu eftir 24 klst (p<0,001).

5.6 Samanburður ATP-Lúsiferasa, PrestoBlue og Crystal violet prófa

Allar tilraunir á U87 voru endurteknar þrisvar sinnum til að geta mælt með hverju hinna þriggja prófa, ATP-Lúsiferasa, PrestoBlue og Crystal violet. Á Mynd 12 má sjá niðustöður allra þriggja prófa eftir 72 klst meðferð með 12,5; 25 og 100 µM resveratról. Með PrestoBlue og ATP-Lúsiferasa prófum mældist marktækur munur á meðferðum með 25 og 100 µM resveratról (p<0,001). Með Crystal violet mældist enginn marktækur munur á meðferðum með 12,5; 25 og 100 µM resveratról.



Mynd 12: Samanburður ATP-Lúsiferasa, PrestoBlue og Crystal violet prófa.

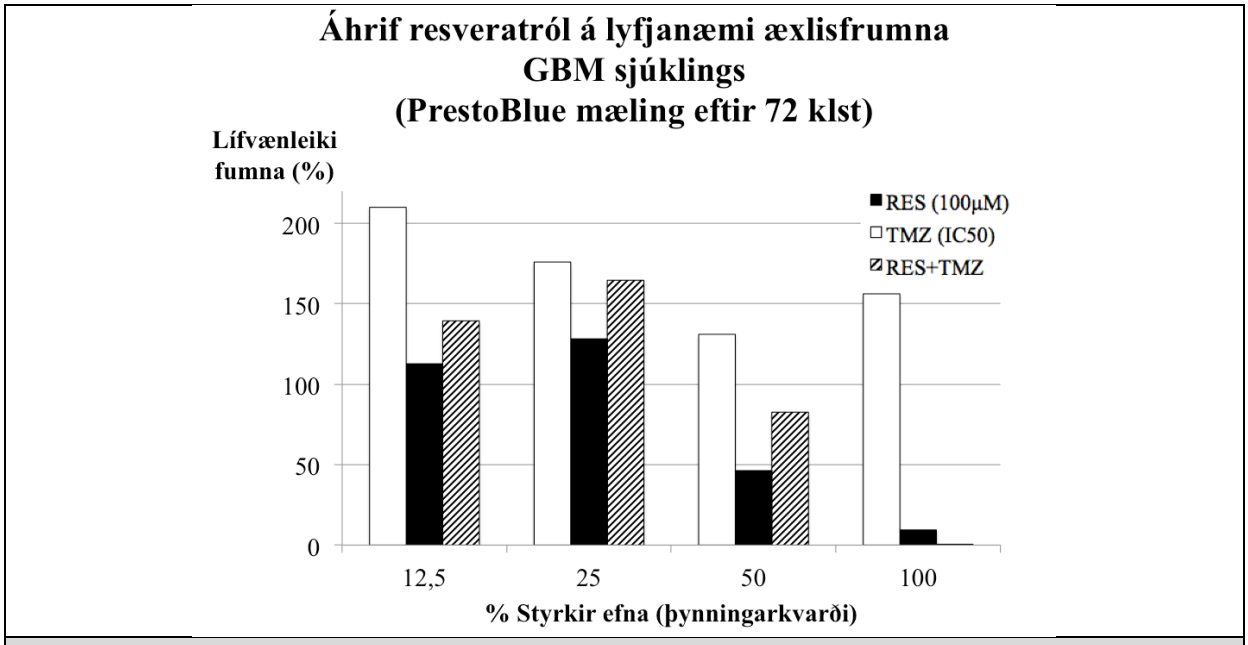
Niðustöður ATP-Lúsiferasa, PrestoBlue og Crystal violet prófa eftir 72 klst meðferð með 12,5; 25 og 100 µM resveratról.

5.7 Áhrif resveratróls á glioblastoma frumur sjúklings

GBM frumur sjúklings voru einangraðar og kom í ljós að þær voru aðeins 2,5 milljónir talsins. Því var ákveðið að nýta frumurnar í mælingar á samverkandi áhrifum resveratróls og Temósólómíð þar sem þær mælingar höfðu komið best út hjá U87 frumulínu (Kafli 5.2).

GBM frumur sjúklings voru því meðhöndlaðar á sama hátt og U87 með ýmist 100 µM resveratról, 390 µM Temósólómíð (IC50) eða hvoru tveggja saman í 72 klst. Notast var við sömu styrki og fyrir U87 til að geta borið saman niðurstöðurnar. Allar lausnir voru raðþynntar niður í 6% af upphaflegum styrk, þrítekið fyrir hvert lyf/efnablöndu. Lífvænleiki frumna var metinn með PrestoBlue mælingu eftir 72 klst.

Marktækur munur mældist á meðferð með resveratról í 12,5; 25; 50 og 100% styrkjum efna (p<0,001). Ekki mældist marktækur munur á meðferð með mismunandi styrkjum Temósólómíð eða Temósólómíð ásamt resveratróli (Mynd 13).



Mynd 13: Áhrif resveratróls á glioblastoma frumur sjúklings. Hindrun á lífvænleika GBM frumna sjúklings eftir 72 klst meðferð með resverartól (RES: 100 µM), TMZ (IC50 fyrir U87: 390 µM) og hvoru tveggja saman. Lífvænleiki frumna var metinn með PrestoBlue mælingu.

6 Umræður og ályktanir

6.1 Helstu niðurstöður

Resveratról sýndi tíma- og styrkháða hindrun á vexti U87 frumulínu. Þá jók resveratról næmi U87 frumulínu fyrir hefðbundna krabbameinslyfinu Temósólómíð í öllum mældum styrkjum og er það í samræmi við niðurstöður rannsóknar sem birtar voru fyrr á þessu ári (93). Resveratról jók þó aðeins næmi frumulínunnar fyrir Cisplatín í 25 og 50% styrkjum. DMSO hafði ekki marktæk áhrif á niðurstöðurnar.

Resveratról bældi YKL-40 tjáningu U87 frumulínunnar og voru þar með staðfestar niðurstöður nýlegrar rannsóknar (91). Þegar frumurnar voru baðaðar í YKL-40 snerust lyfjanæmisaukandi áhrif resveratról ekki við. Hjá GBM frumum sjúklings sýndi resveratról styrkháð frumudráp og virtist það auka næmi fyrir Temósólómíð þótt ekki hafi tekist að sýna fram á það með marktækum hætti.

6.2 Túlkun niðurstaða

Samkvæmt öllum þremur mæliaðferðum virtust sterkustu áhrifin af resveratról á U87 koma fram eftir 72 klst sem er í samræmi við niðurstöður fyrri rannsóknar (93). Áhugavert var að eftir 24 klst meðhöndlun virtust áhrif resveratról vera þveröfug og hreinlega auka lífvænleika frumnanna í 25 og 50 μM styrkjum. Áhrif resveratról virðast því vera mjög tímaháð en styrkháð áhrif resveratról eru hinsvegar vel þekkt. Talið er að lægri styrkir resveratról hamli stýrðum frumudauða en að hærri styrkir aflétti þeim hömlum. Rannsóknum ber hinsvegar ekki saman um hverjir styrkirnir eru (95). Í okkar rannsókn virtust háir styrkir, 50 og 100 μM, valda mestri bælingu á lífvænleika U87 frumulínu. Þau áhrif gætu verið tilkomin vegna afléttingar á hömlum fyrir stýrðum frumudauða.

Helsti styrkleiki rannsóknarinnar er sá að sýnt var að resveratról geti aukið næmi hjá U87 frumulínu *in vitro* fyrir Temósólómíð í 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 og 100% styrkjum. Vert er að nefna að 100 μM resveratról hafði meiri bælandi áhrif á lífvænleika U87 heldur en hálfur drápsstyrkur af Temósólómíð. Áhugavert væri að bera saman áhrifin í hærri styrkjum af Temósólómíð.

Temósólómíð var blandað í DMSO en þekkt er að DMSO sé frumudrepandi. Tryggt var að styrkur DMSO færi ekki yfir 0,1% í kerfinu og í kjölfarið mældust engin áhrif af DMSO. Þar af leiðandi var útilokað að DMSO hefði skekkt niðurstöðurnar.

Niðurstöður rannsóknar frá 2012 benda til þess að resveratról auki næmi GBM fyrir Temósólómíð *in vitro* og *in vivo* með því að hindra sjálfsát (93). Samkvæmt þeim niðurstöðum olli Temósólómíð bæði stýrðum frumudauða og frumuverndandi sjálfsáti miðluðu af myndun hættulegra hvarfgjarnra milliefna (ROS) og virkjun ERK kínasa. ROS/ERK boðleiðin var hinsvegar bæld með resveratról og leiddi það til minnkaðs sjálfsáts og aukins stýrðs frumudauða. Þetta bendir til þess að resveratról geri GBM næmari fyrir Temósólómíð-stýrðum frumudauða með því að bæla frumuverndandi sjálfsát. Í ljósi þessa væri athyglisvert að skoða hvort að resveratról geri GBM næmari fyrir Cisplatín-stýrðum frumudauða með sama hætti.

Í okkar tilraun tókst aðeins að sýna fram á aukið lyfjanæmi fyrir Cisplatín í 25% og 50% styrkjum eftir meðhöndlun með resveratról í 72 klst. Við 100% styrk efna var hinsvegar enginn munur á meðferð með resveratról, Cisplatín eða resveratról og Cisplatín. Vert væri að skoða nánar hver áhrifin verða þegar farið er yfir 100% styrki efnanna.

Resveratról er talið grípa inn í boðefnaferla frumna og draga úr krabbameinssvipgerð þeirra sem m.a. endurspeglast í YKL-40 tjáningu. Í kjölfarið verður aukning á lyfjanæmi GBM frumna (90). Resveratról bældi YKL-40 tjáningu U87 en YKL-40 breytti ekki lyfjanæmisaukandi áhrifum resveratról. Af því drögum við þá ályktun að lyfjanæmisaukandi áhrifum resveratról sé ekki miðlað í gegnum YKL-40. Þegar YKL-40 einu og sér var bætt út á U87 mældist heldur ekki marktækur munur á lífvænleika frumnanna. Í ljósi þess má áætla að U87 frumulínan framleiði nógu mikið YKL-40 til að metta kerfið og viðbót YKL-40 hafi þar af leiðandi engin áhrif á lífvænleika frumnanna.

Þegar niðurstöður úr ATP-Lúsiferasa, PrestoBlue og Crystal violet prófum, eftir 72 klst meðferð á U87 með 12,5; 25 og 100 µM resveratról, voru bornar saman kom í ljós að sláandi munur var á niðurstöðum Crystal violet borið saman við ATP-Lúsiferasa og PrestoBlue. Crystal violet litar aðeins lifandi frumur en ATP-Lúsiferasa og PrestoBlue prófin mæla lífvænleika frumna með óbeinum hætti, byggt á þáttum sem tengjast efnaskiptum frumunnar. Samanburður prófanna þriggja kveikti þá spurningu hvort resveratról miðli áhrifum sínum fyrst og fremst með bælingu á efnaskiptum og í kjölfarið lífvænleika U87 frumulínunnar. Það væri í samræmi við nýbirtar niðurstöður þess eðlis að reveratról hindri efnaskipti krabbameinsfrumna með því að hindra ensímið PKM2 (pyruvate kinase muscle isozyme 2) en það ensím er talið hliðra efnaskiptum krabbameinsfrumna í átt að loftháðri glýkólýsu (54).

Til að meta hvort réttlætanlegt sé að nota prófin þrjú *in vitro* til að spá fyrir um útkomu *in vivo* mætti e.t.v. nota allar þrjár mæliaðferðir og bera saman áhrifin í frumulínum annars vegar og á tilsvarandi frumum frá sjúklingum hinsvegar. Niðurstöðum *in vitro* og *in vivo* rannsókna ber þó ekki alltaf saman. Flestar rannsóknir á virkni resveratróls hafa verið gerðar *in vitro* þar sem frumur eru útsettar fyrir óumbrotnu efninu í margfalt hærri styrk en sá hámarksstyrkur sem mælst hefur í blóði manna eftir inntöku (27). Í þessari rannsókn virtust 50 og 100 µM styrkir resveratróls valda mestri bælingu á lífvænleika U87 en það er 25-50 sinnum hærri styrkur en hefur nokkurn tímann mælst í blóði (29). Ýmsar leiðir hafa verið farnar í tilraun til að auka aðgengi resveratróls en þörf er á fleiri og stærri framsýnum slembiröðuðum klínískum lyfjarannsóknum þar sem mæld eru áhrifin af auknu aðgengi efnisins. Þá verður áhugavert að fylgjast með útkomu rannsókna á áhrifum resveratróls afleiða í mönnum.

Resveratról getur bæði vikað sem oxunar- og andoxunarefni, allt eftir því hvaða frumugerð á í hlut, í hvaða styrk og hve lengi efnið er notað (95). Skammtímameðferð með resveratróli í lágum skömmtum gæti samkvæmt okkar niðurstöðum verið varasöm og hreinlega glætt lífvænleika krabbameinsfrumna. Að meðhöndla krabbamein með resveratróli samhliða hefðbundnum krabbameinslyfjum getur því verið einsog tvíeggja sverð. Tryggja þarf að notaðir séu skammtar sem ekki valda þessum þversagnakenndu áhrifum.

Þá ber að nefna að stílben bygging resveratróls er náskyld hinu tilbúna estrógeni díetýlstílbestróli og getur efnið því ýmist virkað sem estrógen agonisti eða antagónisti eftir aðstæðum (33). Þann eiginleika resveratróls mætti mögulega nýta til meðferðar á hormónaháðum krabbameinum.

Rannsóknir hafa auk þess sýnt að resveratról geti hindrað ensímið CYP3A4 *in vitro*. Í kjölfarið hefur verið sett af stað klínísk lyfjarannsókn til að athuga milliverkanir við önnur lyf umbrotin af CYP3A4, þar á meðal krabbameinslyf (44). Athyglisvert verður að fylgjast með niðurstöðum þeirrar rannsóknar, en ef resveratról hindrar CYP3A4 í mönnum mætti mögulega nýta það til að draga úr umbroti þeirra krabbameinslyfja sem einnig nýta CYP3A4 ensímið. Þannig mætti mögulega lengja þann tíma sem ákveðin krabbameinslyf eru óumbrotin í blóði og mögulega notast við lægri skammta og minnka um leið þær aukaverkanir sem krabbameinssjúklingar þurfa að þola.

Helsti veikleiki rannsóknarinnar var sá að hún var háð því að GBM sýni myndu berast frá Landspítala en slík æxli voru óvenju fá á rannsóknartímabilinu. Aðeins barst eitt sýni undir lok rannsóknartímabils og var það fremur smátt. Ekki náðist að fá fram nema um 2,5 milljónir

GBM frumna. Það stóð til að endurtaka rannsóknina á frumum frá fleiri sjúklingum en sökum þess hve sýnið gaf rýran æxlisfrumufjölda var valið að nýta frumurnar í mælingar á samverkandi áhrifum resveratról og Temósólómíð þar sem þær mælingar höfðu komið best út hjá U87 frumulínu.

Aðeins lítill hluti mælinganna reyndist marktækur og því er lítið hægt að fullyrða útfrá þeim þótt niðustöðurnar bendi til þess að resveratról geti aukið næmi fyrir Temósólómíð hjá GBM frumum frá sjúklingum. Mælingum verður þó haldið áfram þegar fleiri sýni berast og verða þá prófaðir þeir styrkir krabbameinslyfja og resveratról sem mælst hafa í blóði manna.

6.3 Næstu skref

Niðurstöður úr rannsókninni verða notaðar til endurbótar og áframhaldandi þróunar á *in vitro* lyfjanæmisprófunum hjá ValaMed. Til að svara spurningum um næmi og sértæki mæliaðferðanna þriggja verður í framhaldinu gerður samanburður á fleiri frumulínum með aðferðunum þremur. Þá stendur til að framkvæma fleiri mælingar með resveratról samhliða efninu kúrkúmin, imperatorín sem er fúrankúmarínefni úr ætihvönn frá Saga Medica og kítósan frá Genis ehf og bera saman áhrifin á YKL-40 tjáningu og lyfjanæmi nokkurra frumulína.

6.4 Lokaorð

In vitro lyfjanæmisprófanir eru enn á tilraunastigi. Þörfin fyrir einstaklingsmiðaðar krabbameinslyfjameðferðir er hinsvegar augljós í ljósi þess hve breytileikinn á milli svipgerða æxlisfrumna, innan æxlis og á æxlum frá mismunandi sjúklingum, er mikill.

Þrátt fyrir framfarir í myndgreiningu, skurðlækningum, geisla-, lyfja- og stoðmeðferðum hafa lífshorfur GBM sjúklinga einungis lítið batnað og flest æxlin þróa með sér minnkað lyfjanæmi, sem oftast leiðir til endurkomu æxlisins. Þörf er fyrir úrræði sem eykur lyfjanæmi GBM. Rannsóknin okkar sýnir að resveratról geti aukið næmi U87 glioblastoma frumulínu fyrir krabbameinslyfinu Temósólómíð, *in vitro*.

7 Þakkarorð

Sérstakar þakkir til leiðbeinenda minna, þeirra Ingvars Hákonar Ólafssonar; heila- og taugaskurðlæknis við Landspítala, Finnboga Rúts Þormóðssonar; doktors í taugalíffræði, og Helga Sigurðssonar; yfirlæknis og doktors í krabbameinslækningum, fyrir samstarfið. Þakkir til starfsfólks ValaMed og fyrir aðstöðu þar. ValaMed fær einnig þakkir fyrir efniskostnað við framkvæmd rannsóknarinnar. Jón M. Einarsson, rannsókna- og þróunarstjóri hjá Genis ehf. fær þakkir fyrir aðstoð við tölfræðiúrvinnslu. Bjarni Þór Sigurðsson, meistaranemi í lífeindafræðum við Læknadeild Háskóla Íslands, fær þakkir fyrir aðstoð við YKL-40 mælingar. Ragnheiður Björk Hreinsdóttir og Jón Guðmundsson fá þakkir fyrir góða aðstoð.

8 Heimildaskrá

1. Takaoka M. Resveratrol, a new phenolic compound, from Veratrum grandiflorum. Journal of the Chemical Society of Japan. 1939;60:1090-100.
2. Langcake P, Pryce RJ. The production of resveratrol by Vitis vinifera and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. Physiological Plant Pathology. 1976;9(1):77-86.
3. Siemann EH, Creasy LL. Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. American Journal of Enology and Viticulture. 1992;43(1):49-52.
4. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan. Nature. 2003;425(6954):191-6.
5. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. Nature. 2004;430(7000):686-9.
6. Viswanathan M, Guarente L. Regulation of Caenorhabditis elegans lifespan by sir-2.1 transgenes. Nature. 2011;477(7365):E1-E2.
7. Jang MS, Cai EN, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science. 1997;275(5297):218-20.
8. Frampton GA, Lazcano EA, Li HA, Mohamad A, DeMorrow S. Resveratrol enhances the sensitivity of cholangiocarcinoma to chemotherapeutic agents. Laboratory Investigation. 2010;90(9):1325-38.
9. Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, Gerez C, Guittet O. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. Febs Letters. 1998;421(3):277-9.
10. Creasy LL, Coffee M. Phytoalexin production potential of grape berries. Journal of the American Society for Horticultural Science. 1988;113(2):230-4.
11. Chanvitayapongs S, DraczynskaLusiak B, Sun AY. Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. Neuroreport. 1997;8(6):1499-502.
12. Fauconneau B, WaffoTeguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from Vitis vinifera cell cultures using in vitro tests. Life Sci. 1997;61(21):2103-10.
13. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. Lancet. 1993;341(8852):1103-4. Epub 1993/04/24.
14. Paceasciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. Clin Chim Acta. 1995;235(2):207-19.
15. Chen CK, PaceAsciak CR. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. Gen Pharmacol. 1996;27(2):363-6.
16. Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997;94(25):14138-43.
17. Han Y, Ryu S, Han B. Antioxidant activity of resveratrol closely correlates with its monoamine oxidase-A inhibitory activity. Archives of Pharmacal Research. 1990;13(2):132-5.
18. Murakami S, Arai I, Muramatsu M, Otomo S, Baba K, Kido T, et al. Effect of stilbene derivatives on gastric H+, K(+)-ATPase. Biochemical pharmacology. 1992;44(10):1947-51.

19. Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Koneru S, Juhasz B, Zhan L, Otani H, et al. Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase. Free Radical Biology and Medicine. 2007;43(5):720-9.
20. Karuppagounder SS, Pinto JT, Xu H, Chen HL, Beal MF, Gibson GE. Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. Neurochemistry International. 2009;54(2):111-8.
21. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. Anticancer Research. 2004;24(5A):2783-840.
22. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean MEJ, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002;50(11):3337-40.
23. Cichewicz RH, Kouzi SA, Hamann MT. Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen Botrytis cinerea. Journal of Natural Products. 2000;63(1):29-33.
24. Roggero JP, Archier P. Quantitative-determination of resveratrol and of one of its glycosides in wines. Sci Aliments. 1994;14(1):99-107.
25. Goldberg DM, Yan J, Ng E, Diamandis EP, Karumanchiri A, Soleas G, et al. A global survey of trans-resveratrol concentrations in commercial wines. American Journal of Enology and Viticulture. 1995;46(2):159-65.
26. Wang H, Liu L, Guo YX, Dong YS, Zhang DJ, Xiu ZL. Biotransformation of piceid in Polygonum cuspidatum to resveratrol by Aspergillus oryzae. Applied Microbiology and Biotechnology. 2007;75(4):763-8.
27. Gescher AJ, Steward WP. Relationship between mechanisms, bioavailibility, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: A conundrum. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2003;12(10):953-7.
28. Wang Q, Xu JF, Rottinghaus GE, Simonyi A, Lubahn D, Sun GY, et al. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. Brain Research. 2002;958(2):439-47.
29. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. Drug Metabolism and Disposition. 2004;32(12):1377-82.
30. Boocock DJ, Faust GES, Patel KR, Schinas AM, Brown VA, Ducharme MP, et al. Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2007;16(6):1246-52.
31. Kondratyuk TP, Park EJ, Marler LE, Ahn SY, Yuan Y, Choi YS, et al. Resveratrol derivatives as promising chemopreventive agents with improved potency and selectivity. Molecular Nutrition & Food Research. 2011;55(8):1249-65.
32. Calamini B, Ratia K, Malkowski MG, Cuendet M, Pezzuto JM, Santarsiero BD, et al. Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. Biochemical Journal. 2010;429:273-82.
33. Davis SR, Dalais FS, Simpson ER, Murkies AL. Phytoestrogens in health and disease. In: Conn PM, editor. Recent Progress in Hormone Research, Vol 54: Proceedings of the 1998 Conference1999. p. 185-211.
34. Ma ZS, Molavi O, Haddadi A, Lai R, Gossage RA, Lavasanifar A. Resveratrol analog trans 3,4,5,4 '-tetramethoxystilbene (DMU-212) mediates anti-tumor effects via mechanism different from that of resveratrol. Cancer Chemother Pharmacol. 2008;63(1):27-35.
35. Goldberg DA, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. Clinical Biochemistry. 2003;36(1):79-87.

36. Meng XF, Maliakal P, Lu H, Lee MJ, Yang CS. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004;52(4):935-42.
37. Vitaglione P, Sforza S, Galaverna G, Ghidini C, Caporaso N, Vescovi PP, et al. Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. Molecular Nutrition & Food Research. 2005;49(5):495-504.
38. Hung CF, Chen JK, Liao MH, Lo HM, Fang JY. Development and evaluation of emulsion-liposome blends for resveratrol delivery. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 2006;6(9-10):2950-8.
39. Lucas-Abellan C, Fortea I, Lopez-Nicolas JM, Nunez-Delicado E. Cyclodextrins as resveratrol carrier system. Food Chemistry. 2007;104(1):39-44.
40. Das S, Ng KY. Resveratrol-loaded calcium-pectinate beads: effects of formulation parameters on drug release and bead characteristics. Journal of pharmaceutical sciences. 2010;99(2):840-60. Epub 2009/08/05.
41. Johnson JJ, Nihal M, Siddiqui IA, Scarlett CO, Bailey HH, Mukhtar H, et al. Enhancing the bioavailability of resveratrol by combining it with piperine. Molecular Nutrition & Food Research. 2011;55(8):1169-76.
42. Howard H Bailey M. A Randomized, Double-Blind Pilot Trial of Resveratrol With or Without Piperine to Enhance Plasma Levels of Resveratrol. 2012 [26.05.2012]; Available from: http://clinicaltrials.gov/ct2/show/nct01324089?term=resveratrol&rank=1t.
43. Lin HS, Ho PC. Preclinical Pharmacokinetic Evaluation of Resveratrol Trimethyl Ether in Sprague-Dawley Rats: the Impacts of Aqueous Solubility, Dose Escalation, Food and Repeated Dosing on Oral Bioavailability. Journal of pharmaceutical sciences. 2011;100(10):4491-500.
44. Yvonne S Lin P, Ryan Bradley N, MPH, Kelsey Hanson M. Resveratrol and Midazolam Metabolism. 2012 [25.05.2011]; Available from: http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01173640?term=resveratrol&rank=2.
45. Chun YJ, Kim MY, Guengerich FP. Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor. Biochem Biophys Res Commun. 1999;262(1):20-4.
46. Szaefer H, Cichocki M, Brauze D, Baer-Dubowska W. Alteration in phase I and II enzyme activities and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adduct formation by plant phenolics in mouse epidermis. Nutrition and Cancer-an International Journal. 2004;48(1):70-7.
47. ClinicalTrials.gov, a registry and results database of federally and privately supported clinical trials conducted in the United States and around the world [database on the Internet]. [cited 25.5.2011]. Available from: http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=resveratrol.
48. Zhou HB, Yan Y, Sun YN, Zhu JR. Resveratrol induces apoptosis in human esophageal carcinoma cells. World Journal of Gastroenterology. 2003;9(3):408-11.
49. Niles RM, McFarland M, Weimer MB, Redkar A, Fu YM, Meadows GG. Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. Cancer Letters. 2003;190(2):157-63.
50. Athar M, Back JH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2009;486(2):95-102.
51. Jiang H, Zhang L, Kuo J, Kuo K, Gautam SC, Groc L, et al. Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. Molecular Cancer Therapeutics. 2005;4(4):554-61.

52. Lanzilli G, Fuggetta MP, Tricarico M, Cottarelli A, Serafino A, Falchetti R, et al. Resveratrol down-regulates the growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro. International Journal of Oncology. 2006;28(3):641-8.
53. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. Biochemical pharmacology. 2006;71(10):1397-421. Epub 2006/03/28.
54. Iqbal MA, Bamezai RNK. Resveratrol Inhibits Cancer Cell Metabolism by Down Regulating Pyruvate Kinase M2 via Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin. PloS one. 2012;7(5):e36764.
55. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011;144(5):646-74.
56. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70.
57. JG Jn, L. Tt. Krabbamein á Íslandi. 2 ed. Reykjavík: Krabbameinsfélag Íslands; 2008.
58. Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH. Central nervous system tumors. Mayo Clinic Proceedings. 2007;82(10):1271-86.
59. Hayat MA, editor. Tumors of the Central Nervous System. 1 ed: Springer; 2011.
60. Yan H, Parsons DW, Jin GL, McLendon R, Rasheed BA, Yuan WS, et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. New England Journal of Medicine. 2009;360(8):765-73.
61. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. Nature. 2012;483(7390):474-U130.
62. Corle C, Makale M, Kesari S. Cell phones and glioma risk: a review of the evidence. J Neurooncol. 2012;106(1):1-13. Epub 2011/08/20.
63. Baldi I, Huchet A, Bauchet L, Loiseau H. Epidemiology of glioblastoma. Neurochirurgie. 2010;56(6):433-40.
64. Cavenee WK. High-grade gliomas with chromosome 1p loss. Journal of Neurosurgery. 2000;92(6):1080-1.
65. van Wijngaarden E, Dosemeci M. Brain cancer mortality and potential occupational exposure to lead: Findings from the National Longitudinal Mortality Study, 1979-1989. International Journal of Cancer. 2006;119(5):1136-44.
66. Baglietto L, Giles GG, English DR, Karahalios A, Hopper JL, Severi G. Alcohol consumption and risk of glioblastoma; evidence from the Melbourne Collaborative Cohort Study. International Journal of Cancer. 2011;128(8):1929-34.
67. Helseth R, Helseth E, Johannesen TB, Langberg CW, Lote K, Ronning P, et al. Overall survival, prognostic factors, and repeated surgery in a consecutive series of 516 patients with glioblastoma multiforme. Acta Neurologica Scandinavica. 2010;122(3):159-67.
68. Holand K, Salm F, Arcaro A. The Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Pathway as a Therapeutic Target in Grade IV Brain Tumors. Curr Cancer Drug Targets. 2011;11(9):894-918.
69. Fine HA, Dear KBG, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP. Metaanalysis of radiation-therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. Cancer. 1993;71(8):2585-97.
70. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. New England Journal of Medicine. 2005;352(10):987-96.
71. Stordal B, Davey M. Understanding cisplatin resistance using cellular models. IUBMB Life. 2007;59(11):696-9.
72. Walker EM, Jr., Gale GR. Methods of reduction of cisplatin nephrotoxicity. Annals of clinical and laboratory science. 1981;11(5):397-410. Epub 1981/09/01.

73. El-Mowafy AM, El-Mesery ME, Salem HA, Al-Gayyar MM, Darweish MM. Prominent chemopreventive and chemoenhancing effects for resveratrol: unraveling molecular targets and the role of C-reactive protein. Chemotherapy. 2010;56(1):60-5. Epub 2010/03/20.
74. Ostermann S, Csajka C, Buclin T, Leyvraz S, Lejeune F, Decosterd LA, et al. Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. Clin Cancer Res. 2004;10(11):3728-36.
75. Caporali S, Falcinelli S, Starace G, Russo MT, Bonmassar E, Jiricny J, et al. DNA damage induced by temozolomide signals to both ATM and ATR: Role of the mismatch repair system. Molecular Pharmacology. 2004;66(3):478-91.
76. Kanzawa T, Bedwell J, Kondo Y, Kondo S, Germano IM. Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide. Journal of Neurosurgery. 2003;99(6):1047-52.
77. Hirose Y, Katayama M, Mirzoeva OK, Berger MS, Pieper RO. Akt activation suppresses Chk2-mediated, methylating agent-induced G(2) arrest and protects from temozolomide-induced mitotic catastrophe and cellular senescence. Cancer research. 2005;65(11):4861-9.
78. Beier D, Rohrl S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, et al. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. Cancer research. 2008;68(14):5706-15.
79. Rock K, McArdle O, Forde P, Dunne M, Fitzpatrick D, O'Neill B, et al. A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme - the validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial: has a more radical approach improved survival? The British journal of radiology. 2012. Epub 2012/01/05.
80. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. Clin Cancer Res. 2004;10(6):1871-4.
81. Benediktsson G BE, Carlsson J. . Heterogeneity in cell loss and frequency of slow growing colonies of human glioma cell lines. Some effects of radiation. Anticancer Research. 1989(9):1483–8.
82. Cree IA, Kurbacher CM, Untch M, Sutherland LA, Hunter EM, Subedi AMC, et al. Correlation of the clinical response to chemotherapy in breast cancer with ex vivo chemosensitivity. Anti-cancer drugs. 1996;7(6):630-5.
83. Havrilesky LJ, Krivak TC, Mucenski JW, Myers ER. Impact of a chemoresponse assay on treatment costs for recurrent ovarian cancer. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2010;203(2).
84. Johansen JS, Williamson MK, Rice JS, Price PA. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. J Bone Miner Res. 1992;7(5):501-12.
85. Recklies AD, Baillargeon L, Ling H. HC-gp39 is a growth factor for connective tissue cells. Arthritis and Rheumatism. 2000;43(9):S347-S.
86. Elias JA, Homer RJ, Hamid Q, Lee CG. Chitinases and chitinase-like proteins in T(H)2 inflammation and asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2005;116(3):497-500.
87. Bussink AP, Speijer D, Aerts J, Boot RG. Evolution of mammalian chitinase (-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. Genetics. 2007;177(2):959-70.
88. Ling H, Recklies AD. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. Biochemical Journal. 2004;380:651-9.

89. Francescone RA, Scully S, Faibish M, Taylor SL, Oh D, Moral L, et al. Role of YKL-40 in the Angiogenesis, Radioresistance, and Progression of Glioblastoma. Journal of Biological Chemistry. 2011;286(17):15332-43.
90. Zhang W, Kawanishi M, Miyake K, Kagawa M, Kawai N, Murao K, et al. Association Between YKL-40 and Adult Primary Astrocytoma. Cancer. 2010;116(11):2688-97.
91. Zhang W, Murao K, Zhang X, Matsumoto K, Diah S, Okada M, et al. Resveratrol represses YKL-40 expression in human glioma U87 cells. BMC cancer. 2010;10:593. Epub 2010/10/30.
92. Tanwar MK, Gilbert MR, Holland EC. Gene expression microarray analysis reveals YKL-40 to be a potential serum marker for malignant character in human glioma. Cancer research. 2002;62(15):4364-8.
93. Lin CJ, Lee CC, Shih YL, Lin TY, Wang SH, Lin YF, et al. Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy. Free Radical Biology and Medicine. 2012;52(2):377-91.
94. Aghi M, Rabkin S, Martuza RL. Effect of chemotherapy-induced DNA repair on oncolytic herpes simplex viral replication. Journal of the National Cancer Institute. 2006;98(1):38-50.
95. Holme AL, Pervaiz S. Resveratrol in cell fate decisions. J Bioenerg Biomembr. 2007;39(1):59-63.