

Σημαντική πειραματική μείωση εμφάνισης ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων σε ποντικά C3H/Sy μετά από χημειοπροφύλαξη με EB1089, ένα νέο ανάλογο της βιταμίνης D

Σαχπαζίδου Δ., Στραβοράβδη Π., Τόλιου Θ.

Significant experimental decrease of the hepatocarcinoma incidence in C3H/Sy mice after long-term administration of EB1089, a vitamin D analogue

D. Sahpazidou, P. Stravoravdi, T. Toliou

Theagenio Cancer Hospital, Thessaloniki, Hellas

EB1089, a Vitamin D analogue without the acute side effects of the original vitamin, exerts strong antiproliferative activities in malignant cells, including hepatoma cells *in vitro* and in experimental hepatomas in animals as well. It also induces cell cycle arrest and apoptosis in premalignant conditions, suggesting its application in chemopreventive trials. We examined the possible chemopreventive effect of EB1089 on hepatocellular carcinoma incidence in C3H/Sy virgin female mice, a strain developing an incidence of 58% spontaneous hepatomas. A total of 95 mice, 16 weeks old, were used. EB1089 injections of 0.5 µg/kg of body weight were given intraperitoneally every other day for 2, 4 and 6 months to 51 mice (18,19 and 14 mice respectively). The rest 44 mice were divided into 3 control groups, accordingly, and injected with the vehicle solution only. The mice were sacrificed when they appeared moribund because of their disease. The rest were sacrificed at the age of at least 84 weeks. A full autopsy was performed and liver tissue was processed for histological examination. The results obtained show that only 3.9% of treated mice developed hepatocellular carcinomas, exclusively in the 2 month group, compared to 36.4% of hepatocellular carcinomas in the control group. Our results suggest that the chemopreventive administration of EB1089 causes a very statistically significant ($p < 0.0001$) inhibitory effect on hepatocellular carcinoma incidence of C3H/Sy mice. This effect could be useful in a potential application of the chemopreventive control of hepatocarcinomas.

Key Words: Experimental study, Spontaneous tumors, Chemoprevention

Σκοπός: Το EB1089, ανάλογο της βιταμίνης D, προκαλεί σημαντική αναστολή του πολλαπλασιασμού νεοπλασματικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ηπατοκυττάρων, *in vitro*, αλλά και σε πειραματικά προκαλούμενα ηπατώματα, *in vivo*. Επάγει επίσης την απόπτωση σε κυτταρικές σειρές με προκαρκινικές αλλοιώσεις, γεγονός που συνηγορεί για τη χρήση του σε πειράματα χημειοπροφύλαξης. Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η πιθανή χημειοπροφυλακτική δράση του EB1089 στην εμφάνιση ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων σε ποντίκια φυλής C3H/Sy, τα οποία αναπτύσσουν αυτόματα αυτούς τους όγκους σε ποσοστό μέχρι 58%.

Υλικό-Μέθοδοι: Χρησιμοποιήθηκαν 95 δηλυκά ποντίκια ηλικίας 4 μηνών. Σε 51 ζώα χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά EB1089 σε δόση 0,5 μg/Kg σωματικού βάρους κάθε 2^η ημέρα για 2, 4, και 6 μήνες σε 18,19 και 14 ποντίκια αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα 44 ζώα διαιρέθηκαν σε 3 ανάλογες υποομάδες και έλαβαν μόνο το διαλύτη. Τα ποντίκια που εμφάνισαν διόγκωση του ήπατος δανατώθηκαν έγκαιρα. Τα υπόλοιπα δανατώθηκαν σε ηλικία περίπου 24 μηνών. Έγινε αυτοψία και πλήρης νεκροτομή και ιστολογική εξέταση των σπλάχνων.

Αποτελέσματα: Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι μόνο 3,9% του συνόλου των ζώων στα οποία χορηγήθηκε το EB1089 εμφάνισαν ηπατοκυτταρικά καρκινώματα, αποκλειστικά στην ομάδα της δίμηνης χορήγησης, σε σύγκριση με το 36,4% των ομάδων αναφοράς.

Συμπεράσματα: Η χημειοπροφυλακτική χορήγηση του EB1089 προκαλεί πολύ σημαντική στατιστικά μείωση των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων στα ποντίκια φυλής C3H/Sy. Η περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του αναλόγου θα μπορούσε ενδεχομένως να οδηγήσει σε κλινική εφαρμογή του στον έλεγχο του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

Λέξεις Κλειδιά: Πειραματική μελέτη, Αυτόματα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα, Χημειοπροφύλαξη.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο πρωτοπαθής καρκίνος του ήπατος ευθύνεται για μεγάλο αριθμό θανάτων του πληθυσμού παγκόσμια, με αυξανόμενη τάση στις δυτικές χώρες. Κανένα από τα φάρμακα τα οποία μέχρι τώρα έχουν χρησιμοποιηθεί, δεν αποδείχθηκε αποτελεσματικό στη θεραπεία των κακοήθων νεοπλασμάτων του ήπατος. Δεδομένου ότι η χειρουργική θεραπεία των εξεργασιών αυτών έχει ένδειξη σε λιγότερο από το 15% των περιπτώσεων, καθίσταται έκδηλη η ανάγκη για ανάπτυξη και μελέτη νέων αντικαρκινικών σκευασμάτων^{1,2}. Η 1,25α (OH)2D3 (βιταμίνη D) προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού σε μεγάλο αριθμό καρκινικών σειρών, μεταξύ των οποίων και κυττάρων ηπατοκαρκινώματος^{3,4}. Η κλινική χρήση της όμως περιορίζεται, λόγω της υπερασβεσταιμίας που προκαλεί, η οποία είναι παρενέργεια των μεγάλων δόσεων που απαιτούνται για θεραπεία^{2,5,6}.

Το EB1089, [1(S), 3(R)-dihydroxy-20(R)-5'-ethyl-5'-hydroxy-hepta-1'(E)-dien-1'-yl)-9, 10-seco-pregna-5(Z), 7(E), 10(19)-triene] είναι ένα ανάλογο της βιταμίνης D. Αναστέλει επίσης τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε πληθώρα καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ηπατοκυττάρων *in vitro*, αλλά και *in vivo* σε μεταμοσχεύσιμους ή προκλητούς όγκους, χωρίς τις έντονες παρενέργειες του μητρικού μορίου⁷. Συγκεκριμένα, το EB1089 είναι 50-200 φορές ισχυρότερο της βιταμίνης, σε σχέση με τη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης, σε κάθε σχεδόν κυτταρικό τύπο που μελετήθηκε μέχρι σήμερα^{6,8}. Επίσης, όπως αποδείχθηκε σε πειράματα με επίμυες, έχει 50% μικρότερη ασβεσταιμική δράση σε σχέση με τη μητρική μορφή⁹.

Πρόσφατες μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η δράση που εμφανίζει το EB1089 σε πειραματόζωα, λειτουργεί και σε κλινικό επίπεδο⁷.

Συνεπώς το EB1089 ίσως να αποτελέσει μία νέα προσέγγιση αντιμετώπισης του καρκίνου του ήπατος στον άνθρωπο. Το γεγονός ότι το EB1089 αναστέλλει επίσης τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στο επιθήλιο του εντέρου με προνεοπλασματικά χαρακτηριστικά και επάγει την απόπτωση και τη στάση του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα αδενώματος του παχέος εντέρου συνηγορεί για την πιθανή εφαρμογή του σε χημειοπροφυλακτικές δοκιμές^{10,11}.

Η χημειοπροφύλαξη αποτελεί μία νέα σχετικά προσέγγιση στη μελέτη της πρόληψης και της αντιμετώπισης του καρκίνου και αφορά κυρίως σε ομάδες πληθυσμού υψηλού κινδύνου. Διαφοροποιείται από τη χημειοθεραπεία γιατί εφαρμόζεται πριν από την εμφάνιση της νόσου ή σε προκαρκινικά στάδια και για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα, με σκοπό την πρόληψη της ανάπτυξης της νόσου¹².

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την πιθανή χημειοπροφυλακτική δράση του EB1089 στην εμφάνιση ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων σε παρθένα δηλυκά ζώα της φυλής C₃H/Sy. Η φυλή χαρακτηρίζεται από υψηλή συχνότητα εμφάνισης ηπατωμάτων (58%), και πρωτοπαδών καρκινωμάτων του μαστού με συχνότητα 60-70% σε νεαρή ηλικία.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια της αμιγούς φυλής C₃H/Sy που εκτρέφονται στο Ερευνητικό τμήμα του Θεαγενείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης. Παρθένα δηλυκά ζώα μετά τον απογαλακτισμό (1 μήνα μετά τη γέννησή τους) ζυγίστηκαν (15-21g) και τοποθετήθηκαν ανά ένα σε κλουβιά. Τα ζώα έπαιρναν νερό και τροφή (εμπορικό, συνδεδειγμένο παρασκεύασμα για πειραματόζωα) χωρίς περιορισμό. Σε τακτά χρονικά διαστήματα ζυγίζονταν και το ασβέστιο ούρων μετρούνταν σε ούρα που συγκεντρώνονταν από ομάδες των 5 ή 7 ζώων.

Το μέγεθος του δείγματος (αριθμός των προς μελέτη ποντικών) υπολογίσθηκε με βάση την υπόθεση ότι αναμένεται 15% μείωση της εμφάνισης όγκου στην πειραματική ομάδα με βάση το 100%. Για τιμές του α και β λάδους 0,05 και 0,20 αντίστοιχα, 50 ζώα ήταν απαραίτητα για κάθε ομάδα. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 95 ζώα, τα οποία χωρίστηκαν σε 2 ομάδες: πειραματική (51 ζώα) και μαρτύρων (44 ζώα). Η κάθε ομάδα χωρίστηκε σε 3 υποομά-

δες ανάλογα με τη διάρκεια χορήγησης του EB1089 δηλαδή 2, 4, και 6 μήνες, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.

Προετοιμασία φαρμάκου

Το EB1089 παραχωρήθηκε ευγενώς από τη Leo Pharmaceuticals σε συγκέντρωση 2mM σε ισοπροπανόλη. Το μητρικό διάλυμα, το οποίο ανανεώνονταν κάθε εβδομάδα, σχηματίστηκε με αραιώση 5ml του αρχικού σε 40 ml αιθανόλης. Ανάλογα με το σωματικό βάρος κάθε ζώου, κατάλληλος όγκος του διαλύματος αυτού αραιώνονταν σε φυσιολογικό ορό και συνολικός όγκος 250ml (0,5mg/kg σωματικού βάρους) χορηγούνταν με σύριγγα 21G.

Στα ζώα της ομάδας των μαρτύρων η ενέσιμη ποσότητα των 250ml περιείχε μόνον το διαλύτη και φυσιολογικό ορό.

Η χορήγηση του EB1089 ή του διαλύτη άρχισε όταν τα ζώα συμπλήρωσαν τη 16^η εβδομάδα της ζωής τους και δόθηκε ενδοπεριτοναϊκά, κάθε δεύτερη μέρα για 2, 4, και 6 μήνες ανάλογα με την ομάδα, περίπου την ίδια ώρα κάθε φορά (μεταξύ 10^{πς} και 12^{πς} πρωινής).

Τα ποντίκια θανατώνονταν με αιθέρα, λίγο πριν καταλήξουν λόγω της ανάπτυξης του όγκου. Τα υπόλοιπα θανατώθηκαν μετά την ηλικία των 84 εβδομάδων, ανάλογα με τη φυσική τους κατάσταση. Έγινε νεκροψία και πλήρης νεκροτομή. Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν για τη μέτρηση ασβεστίου και το ήπαρ και τα λοιπά σπλάχνα της δωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας επεξεργάστηκαν για ιστολογική μελέτη ως εξής: ιστοτεμάχια σπλάχνων (<1.0cm) μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα οινόπνευματούχου φορμόλης (90ml οινόπνευμα 70°, 70ml φορμόλη 40% και 5ml παγόμορφο οξικό οξύ). Ακολούθησε η συνηθισμένη τεχνική εγκλεισμού σε παραφίνη και χρώση με αιματοξυλίνη-εωσίνη. Η μικροσκοπική μελέτη των

Πίνακας 1. Κατανομή ζώων σε ομάδες

Ομάδες	Αριθμός ζώων	Διάρκεια χορήγησης (μήνες)	Αριθμός ζώων
Πειραματική	51	2	18
		4	19
		6	14
Μαρτύρων	44	2	18
		4	18
		6	8

παρασκευασμάτων έγινε με οπτικό μικροσκόπιο.

Τα επίπεδα του ασβεστίου στο αίμα και τα ούρα μετρήθηκαν με αυτόματο αναλυτή (Electrolyte System) της εταιρείας Beckman, τύπου Synchron EL-ISE.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το EB1089 ήταν σε γενικές γραμμές καλά ανεκτό από τα ζώα. Σε καμμία ομάδα δεν προκλήθηκε θάνατος ζώου λόγω τοξικότητας. Το σωματικό βάρος των ζώων της πειραματικής ομάδας μειώθηκε κατά τη διάρκεια της θεραπείας και άρχισε να αυξάνεται πάλι μετά το τέλος της, μέχρι την αποκατάσταση σε ένα σταθερό επίπεδο βάρους. Το σωματικό βάρος των μαρτύρων αυξανόταν σταθερά μέχρι να φτάσει στα συνήδη για τη φυλή και ηλικία επίπεδα (σχήμα 1).

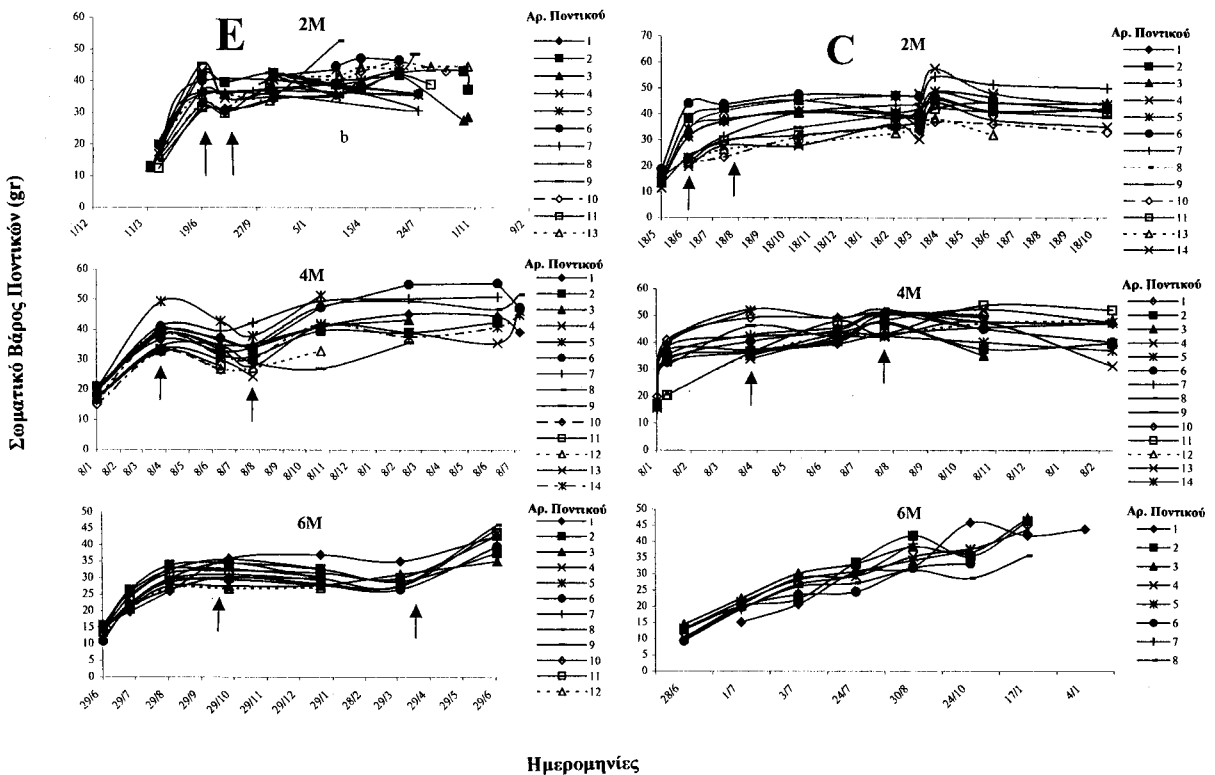
Τα επίπεδα του ασβεστίου των ούρων αυξήθηκαν δεραματικά και άμεσα με την έναρξη της θεραπείας με EB1089 σε όλες της υποο-

μάδες ($p < 0.05$ vs. ομάδα αναφοράς), παρέμειναν σε υψηλό επίπεδο καθόλη τη διάρκεια της χορήγησης και σταδιακά μειώθηκαν μετά το τέλος αυτής, μέχρι να προσεγγίσουν τα επίπεδα ασβεστίου ούρων των μαρτύρων (< 12 mg/dl) (σχήμα 2).

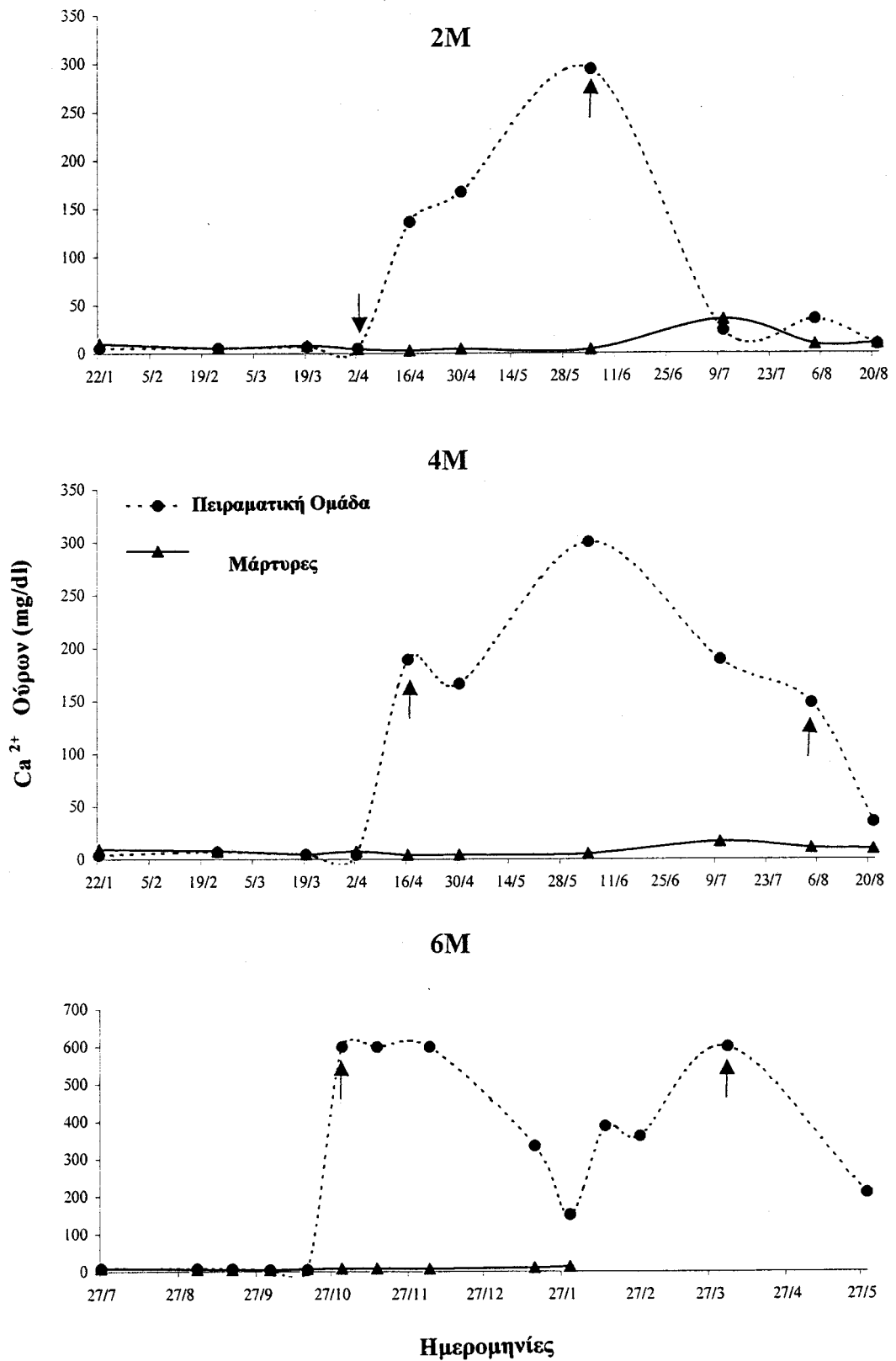
Τα επίπεδα ασβεστίου του αίματος της πειραματικής ομάδας είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) συγκρινόμενα με αυτά της ομάδας αναφοράς ($t=2.650$, $p=0.01021$).

Ο μέσος όρος των τιμών ασβεστίου για την πειραματική ομάδα ήταν $10,85 \pm 0,25$ mg/dl (mean \pm SEM) ενώ για την ομάδα αναφοράς $9,75 \pm 0,34$ mg/dl (mean \pm SEM), (σχήμα 3).

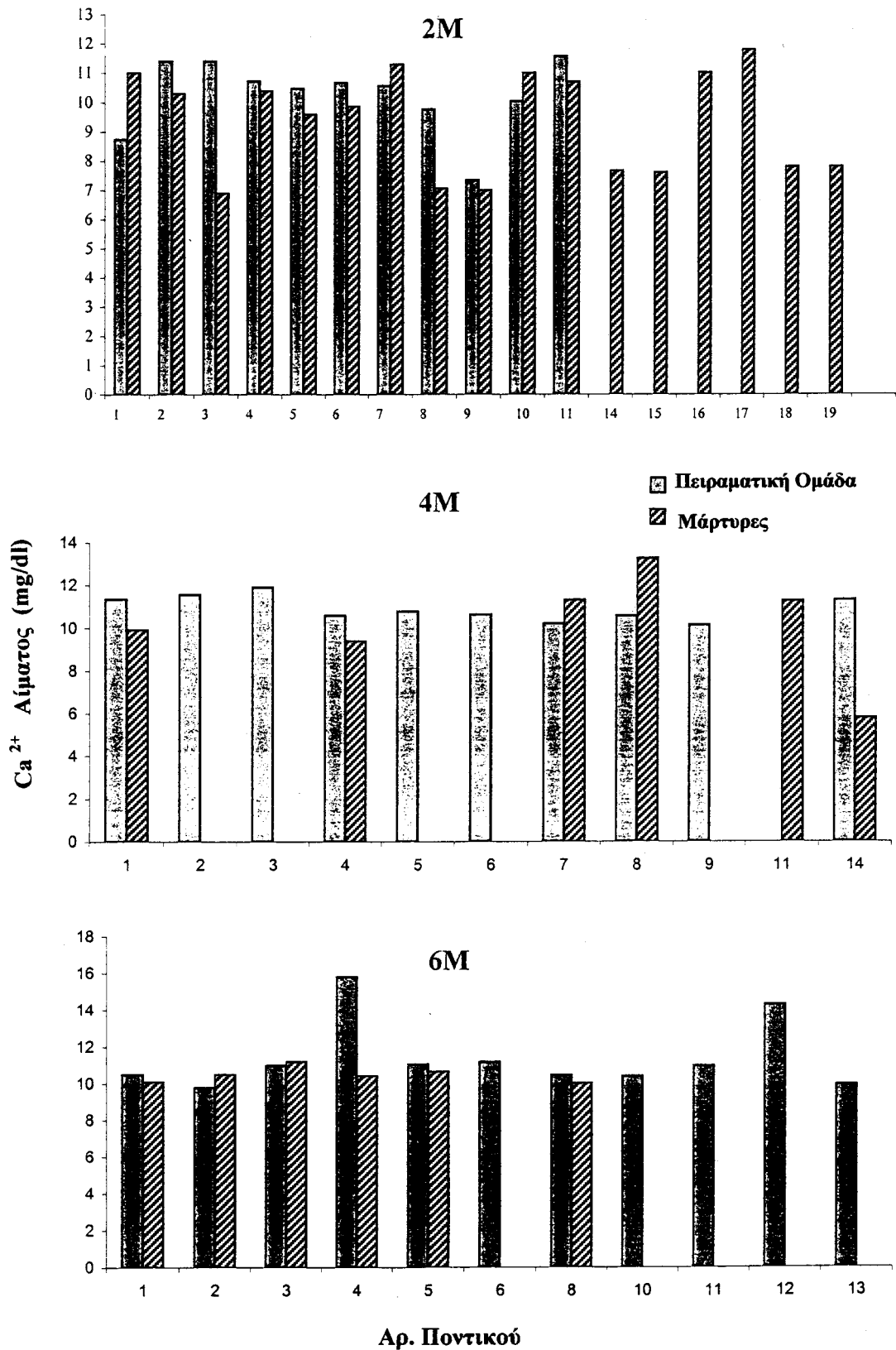
Στην πειραματική ομάδα μόνο 2 από τα 51 ζώα ανέπτυξαν ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (3,92%), ενώ στους μάρτυρες 16 από τα 44 (36,36%) (Πίνακας 2). Η δοκιμασία Fisher exact που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι υπάρχει ισχυρή ένδειξη ότι το ποσοστό των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων είναι υψηλότερο στην ομάδα αναφοράς ($p < 0.0001$).



Σχήμα 1. Μεταβολές σωματικού βάρους στην πειραματική ομάδα (E) και στους μάρτυρες (C). Η περίοδος δεραπείας δηλώνεται με τα βέλη. 2M: δίμηνη, 4M: τετράμηνη, 6M εξάμηνη δεραπεία.



Σχήμα 2. Επίδραση της θεραπείας στα επίπεδα του ασβεστίου των ούρων στην πειραματική ομάδα και στους μάρτυρες. 2M: δίμηνη, 4M: τετράμηνη, 6M εξάμηνη θεραπεία.



Σχήμα 3. Επίπεδα ασβεστίου αίματος στην πειραματική ομάδα και στους μάρτυρες. 2M: δίμηνη, 4M: τετράμηνη, 6M εξάμηνη θεραπεία.

Πίνακας 2. Ποσοστά εμφάνισης ηπατοκαρκινωμάτων (%) στις ομάδες ποντικών

Διάρκεια Θεραπείας (μήνες)	Πειραματική Ομάδα		Μάρτυρες	
	Αρ. ποντικών με ηπάτωμα/ σύνολο ποντικών	%	Αρ. ποντικών με ηπάτωμα/ σύνολο ποντικών	%
2	2/18	11,1	7/18	38,9
4	0/19	0	7/18	38,9
6	0/14	0	2/8	12,5
Σύνολο	2/51	3,9*	16/44	36,4*

P<0,0001 έναντι μαρτύρων για όλες τις ομάδες

Μικροσκοπική μελέτη

Πειραματική ομάδα

Μόνο δύο ζώα της υποομάδας με τη δίμηνη χορήγηση EB1089 ανέπτυξαν, το πρώτο ένα ευμεγέδες καλά διαφοροποιημένο και το δεύτερο δύο μικρά καλά διαφοροποιημένα, ηπατοκυτταρικά καρκινώματα. Η μέση ηλικία εμφάνισης ήταν 85,5 εβδομάδες (83 και 88).

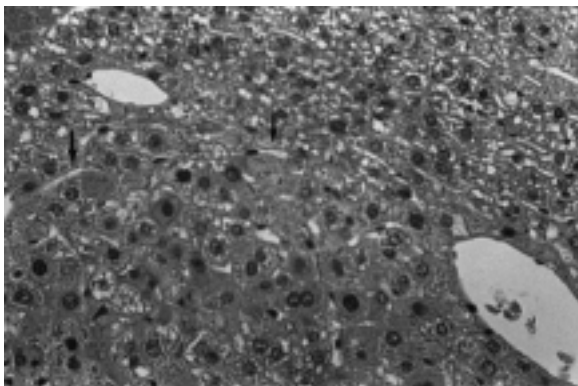
Ομάδα μαρτύρων

Συνολικά ανέπτυξαν όγκο του ήπατος 16 ζώα αυτής της ομάδας. Στην υποομάδα των δύο μηνών 7 ζώα ανέπτυξαν όγκους, πέντε από τους οποίους ήταν ευμεγέδεις και πολλαπλοί. Πέντε ήταν καλά διαφοροποιημένα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα με εωσινόφιλο και διαυγάζον κυτταρόπλασμα, ευμεγέδεις πυρήνες και διηθητικά συνήθως όρια. Σε δύο περιπτώσεις οι όγκοι ήταν μέτρια διαφοροποιημένοι, με ποικιλία στο μέγεθος και την εμφάνιση του πυρήνα. Η μέση ηλικία εμφάνισης των όγκων ήταν 82,2 εβδομάδες (80-86). Στην υποομάδα των 4 μηνών επτά ζώα ανέπτυξαν ηπα-

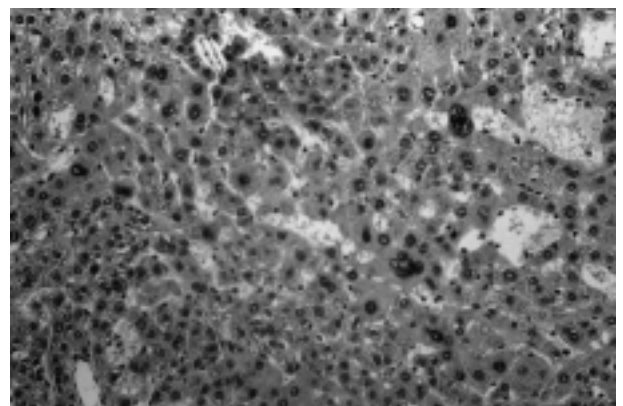
τοκυτταρικά καρκινώματα, τέσσερα από τα οποία ήταν ευμεγέδη και πολλαπλά. Από αυτά, πέντε ήταν καλής και δύο μέτριας διαφοροποίησης (φωτο 1, 2). Σε τρία από τα ζώα παρατηρήθηκε επίσης δυσπλασία ήπατος που χαρακτηρίζονταν από διογκωμένα ηπατοκύτταρα με μεγάλους πολύμορφους ή πολλαπλούς πυρήνες, εμφανή πυρήνια και πυρηνικά έγκλειστα. Η μέση ηλικία εμφάνισης των όγκων ήταν 66 εβδομάδες²⁹⁻⁹¹.

Στην υποομάδα των 6 μηνών δύο ζώα εμφάνισαν μικρά, καλά διαφοροποιημένα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα σε μέση ηλικία 70,5 εβδομάδων (70-71).

Στην πειραματική ομάδα παρατηρήθηκαν επίσης εκτεταμένες επασβεστώσεις ή/και συγκρίματα ασβεστίου στα ουροφόρα σωληνάρια και στο νεφρικό παρέγχυμα, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, αρχίζοντας από την ηλικία των 3 εβδομάδων από τη χορήγηση. Αναλυτικότερα, επασβεστώσεις παρατηρήθηκαν στο 54,5% των ζώων της τετράμηνης και στο 78,6% της εξάμηνης πειραματικής υποομάδας.



Φωτο 1. Καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα από μεγάλα κύτταρα και απωθητικά όρια (βέλη) X 200.



Φωτο 2. Πολύμορφο, μέτρια διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, X 200.

ΕΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ενδαρρυντικά αποτελέσματα των ερευνών που προέκυψαν από τη χρήση του EB1089 *in vitro*⁷, οδήγησαν στην πραγματοποίηση πληθώρας ερευνών με χρήση του EB1089 και σε *in vivo* πειράματα. Η δράση του έχει ήδη διερευνηθεί σε ζωικά μοντέλα προκλητών ή μεταμοσχεύσιμων όγκων μαστού, προστάτου, παγκρέατος και όγκων κυττάρων Leydig¹⁵⁻²¹.

Οι μελέτες αυτές απέδειξαν με σαφήνεια ότι το EB1089, εκτός της ρυθμιστικής δράσης που έχει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, προκαλεί υποστροφή των όγκων, εμποδίζει την εμφάνιση μεταστάσεων και αυξάνει τον χρόνο επιβίωσης των πειραματοζώων^{15,17,20,22-24}.

Το 1992, οι Thomas και συν. διαπίστωσαν ότι η βιταμίνη D έχει ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό φυσιολογικών και προνεοπλασματικών επιθηλιακών κυττάρων του ορθού και πρότειναν την εφαρμογή της χημειοπροφυλακτικά¹⁰. Πρόσφατα, οι Diaz και συν. διαπίστωσαν ότι και το EB1089 επάγει την απόπτωση σε προκαρκινικά αδενικά κύτταρα και έτσι ενδέχεται να έχει χημειοπροφυλακτική δράση. Η χημειοπροφύλαξη αποτελεί μία νέα –πολλά υποσχόμενη– προσέγγιση στη αντιμετώπιση του καρκίνου και δίνει νέες ελπίδες για μείωση της νοσηρότητας και θνησιμότητας^{12,25}. Έτσι η έρευνα για τη σύνθεση, ανάπτυξη και έλεγχο νέων φαρμάκων, που να εμποδίζουν την εμφάνιση του καρκίνου και όχι να παρεμβαίνουν θεραπευτικά, αποκτά μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον.

Στην παρούσα πειραματική εργασία επιχειρήσαμε να διασαφηνίσουμε μία πιθανή χημειοπροφυλακτική δράση του EB1089 σε αυτόματα ηπατώματα ποντικών της φυλής C3H/Sy, που χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά αυτόματης εμφάνισης της νόσου.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η χρόνια ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του φαρμάκου σε δόση 0,5 mg/kg σωματικού βάρους κάθε δεύτερη ημέρα προκαλεί σημαντική μείωση στην εμφάνιση των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων. Η χορήγηση EB1089 για 4 και 6 μήνες προκάλεσε πλήρη αναστολή εμφάνισης ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων, ενώ τα αντίστοιχα ζώα μάρτυρες εμφάνισαν ηπατοκυτταρικά καρκινώματα σε ποσοστό 36,36%. Δύο μόνον από τα 18 ζώα (11,11%) που έλαβαν EB1089 για 2 μήνες εμφάνισαν τη νόσο, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στους μάρτυρες ήταν 38,39%. Θνησιμότητα εξαιτίας της θεραπείας δεν παρατηρή-

θηκε. Τα επίπεδα του ασβεστίου στα ούρα των πειραματοζώων αυξήθηκαν αμέσως μετά την έναρξη της χορήγησης, αλλά επανήλθαν στα πριν από τη χορήγηση επίπεδα, λίγο μετά τη διακοπή. Τα επίπεδα του ασβεστίου στο αίμα ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στις ομάδες των πειραματοζώων σε σχέση με τους μάρτυρες. Η εναπόθεση συγκριμάτων ασβεστίου στα ουροφόρα σωληνάκια και στο νεφρικό παρέγχυμα, εξάλλου, επιβάλλει την πολύ προσεκτική χορήγηση του φαρμάκου.

Στην ομάδα των μαρτύρων τα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 50%, εμφανίζονταν συνήθως σαν ευμεγέθεις ή πολλαπλοί όγκοι, ενώ οι υπόλοιποι ήταν μικροί ή μικροσκοπικά μόνον αναγνωρίσιμοι όγκοι. Οι περισσότεροι συγγραφείς θεωρούν ότι και οι μικροσκοπικοί όγκοι εφόσον ξεπερνούν σε διάμετρο τα 5-8 χιλιοστά, θεωρούνται κακοήδεις^{26,27}. Όλοι οι όγκοι, ανεξαρτήτως μεγέθους, εμφάνιζαν κυτταρολογικά κριτήρια κακοήδειας, δηλαδή διάταξη σε δοκίδες πάχους περισσοτέρων του ενός κυττάρων, διατεταμένα κολπώδη τριχοειδή, απουσία χολαγγείων, ποικιλία στο μέγεθος του κυττάρου και του πυρήνα, ευμεγέδη ή πολλαπλά πυρήνια και μιτώσεις. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα ήταν καλά διαφοροποιημένα, ενώ μερικοί από τους μεγαλύτερους όγκους ήταν μέσου βαθμού διαφοροποίησης ή με κυτταρική πολυμορφία.

Σε τέσσερα ζώα (στα τρία από αυτά με σύγχρονη παρουσία ηπατοκυτταρικού καρκινώματος) παρατηρήθηκαν επίσης δυσπλαστικές αλλοιώσεις των ηπατοκυττάρων, οι οποίες θεωρούνται προκαρκινωματώδεις. Δυσπλαστικές αλλοιώσεις στα ζώα της πειραματικής ομάδας δεν παρατηρήθηκαν. Στα ζώα της πειραματικής ομάδας τα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα εμφανίζονταν σε μεγαλύτερες ηλικίες συγκριτικά με τους μάρτυρες. Μικροσκοπικά και οι δύο όγκοι ήταν καλής διαφοροποίησης.

Η δραστηριότητα του EB1089 μελετήθηκε πρόσφατα σε μία κλινική μελέτη φάσης II και περιελάμβανε 22 ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα προχωρημένου σταδίου²⁸. Αν και μόνο δύο από τους 22 ασθενείς εμφάνισαν μείωση του όγκου, οι ερευνητές θεωρούν ότι αυτή η υποχώρηση του όγκου είναι εξαιρετικά απίθανο να έχει προκύψει τυχαία, ειδικά στην περίπτωση του ηπατοκαρκινώματος, όπου η αυτόματη υποστροφή θεωρείται ιδιαίτερα σπάνια²⁹.

Επισημαίνουμε ότι στην παρούσα πειραματική εργασία η χορήγηση του EB1089 έγινε χημειοπροφυλακτικά. Τα αποτελέσματα όμως δείχνουν ότι η μακρόχρονη χορήγηση του EB1089, πριν από την ανάπτυξη του ηπατοκαρκινώματος προστατεύει τα ζώα από την εμφάνιση του όγκου.

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης του EB1089 στο καρκίνωμα του ήπατος του ποντικού δεν είναι γνωστός και πιθανώς διαφέρει από αυτό στον άνθρωπο. Εντούτοις, η παρούσα πειραματική όσο και η προαναφερθείσα κλινική μελέτη υπαινίσσονται μια ενδιαφέρουσα δράση του EB1089 στα ηπατοκύτταρα, που μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη στην αντιμετώπιση του καρκίνου του ήπατος υπό κατάλληλες συνθήκες.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΗΡΙΑ

Οι συγγραφείς δέλουν να ευχαριστήσουν την κ. Lise Binderup της Leo Pharmaceuticals, η οποία ευγενώς παραχώρησε το σκεύασμα EB1089, τις τεχνολόγους κ. Ε. Βελκοπούλου και Ε. Λαζαρίδου για την εξαιρετική τεχνική υποστήριξη και τον καθηγητή κ. Γ. Φούντζηλα για την πολύτιμη βοήθειά του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Jourdan JL, Akhter J, Bowrey P, Pourgholami MH, Morris DL. Hepatic intra arterial injection of lipiodol-1,25-dihydroxyvitamin D₃ for hepatocellular carcinoma in rats. *Anticancer Res*, 20:2739-2744, 2000.
- Finlay IG, Stewart GJ, Pourgholami MH, Akhter J, Morris DL. The use of lipiodol and medium chain triglyceride as delivery agents for hepatic arterial administration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. A potential new treatment for hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*, 20:2705-2710, 2000.
- Akhter J, Hassiotis V, Bolton E, Morris DL. Profound inhibition of human hepatoma cell line by vitamin D₃ and analogues [Abstract] *Aust NZJ Surg*, 68:520, 1988.
- Pourgholami MH, Akhter J, Lu Y, Morris DL. In vitro and in vivo inhibition of liver cancer cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Lett*, 151:27-102, 2000.
- James SY, Mackay AG, Colston KW. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its analogues on induction of apoptosis in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 58(4):395-401, 1996.
- Hansen CM, Maenpaa PH. EB 1089, a novel vitamin D analog with strong antiproliferative and differentiation-inducing effects on target cells. *Biochem Pharmacol*, 1(54):1173-1179, 1997.
- Hansen CM, Hamberg KJ, Binderup E, Binderup L. Seocalcitol (EB1089): a vitamin D analogue of anti-cancer potential. Background, design, synthesis, pre-clinical and clinical evaluation. *Curr Pharm Des*, 6(7):803-827, 2000.
- Kissmeyer AM, Binderup E, Binderup L, Mork Hansen C, Andersen NR, Makin HL, Schroeder NJ et al. Metabolism of the vitamin D analog EB1089: Identification of in vivo and in vitro liver metabolites and their biological activities. *Biochem Pharmacol*, 53(8):1087-1097, 1997.
- Vink van Wijngaarden T, Pols HA, Buurman CJ, Birkenhager JC, Van Leeuwen JP. Inhibition of insulin and insulin-like growth factor-I stimulated growth of human breast cancer cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and the vitamin D₃ analogue EB1089. *Eur J Cancer*, 32A(5):842-848, 1996.
- Thomas MG, Tebbutt S, Williamson RCN. Vitamin D and its metabolites inhibit cell proliferation in human rectal mucosa and a colon cancer cell line. *Gut*, 33:1660-1663, 1992.
- Diaz GD, Paraskeva C, Thomas MG, Binderup L, Hague A. Apoptosis is induced by the active metabolite of vit D₃ and its analogue EB1089 in colorectal adenoma and carcinoma cells: possible implications for prevention and therapy. *Cancer Res*, 60(8):2304-2312, 2000.
- Sporn MB. Chemoprevention of cancer. *Lancet*, 342:1211-1213, 1993.
- Festing FWM. Inbred strains in biochemical research. London: Macmillan press LTD, p. 168-174, 1997.
- Stravoravdi P, Toliou Th, Polyzonis M. Protamine sulfate: a new chemopreventive role for an anti-angiogenic substance. *The Cancer Journal*, 7(2):81-84, 1994.
- James SY, Mercer E, Brady M, Binderup L, Colston KW. EB1089, a synthetic analogue of vitamin D, induces apoptosis in breast cancer cells in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol*, 125(5):953-962, 1998.
- Van Weelden K, Flanagan I, Binderup L, Tenniswood M, Welsh J. Apoptotic regression of MCF-7 xenografts in nude mice treated with the vitamin D₃ analog EB1089. *Endocrinology*, 139(4):2102-2110, 1998.
- Blutt SE, Polek TC, Stewart LV, Kattan MW, Weigel NL. A calcitriol analogue, EB1089, inhibits the growth of LNCaP tumors in nude mice. *Cancer Res*, 60(4):779-782, 2000.
- Lokeshwar BL, Schwartz GG, Selzer MG, Burn-

- stein KL, Zhuang SH, Block NL, Binderup L. Inhibition of prostate cancer metastasis in vivo: a comparison of 1,25-dihydroxyvitamin D (calcitriol) and EB1089. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 8(3):241-248, 1999.
19. Akhter J, Chen X, Bowrey P, Bolton EJ, Morris DL. Vitamin D₃ analog EB1089, inhibits growth of subcutaneous xenografts of the human colon cancer cell line, LoVo, in a nude mouse model. *Dis Colon Rectum*, 40(3):317-321, 1997.
 20. Colston KW, James SY, Ofori-Kuragu EA, Binderup L, Grant AG. Vitamin D receptors and anti-proliferative effects of vitamin D derivatives in human pancreatic carcinoma cells in vivo and in vitro. *Br J Cancer*, 76(8):1017-1020, 1997.
 21. Hag M, Kremer R, Goltzman D, Rabbani SA. A vitamin D analogue (EB1089) inhibits parathyroid hormone-related peptide production and prevents the development of malignancy-associated hypercalcaemia in vivo. *J Clin Invest*, 91(6):2416-2422, 1993.
 22. Colston KW, Mackay AG, James SY, Binderup L, Chander S, Coombes RC. EB1089: a new vitamin D analogue that inhibits growth of breast cancer cells in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol*, 44(12):2273-2280, 1992.
 23. Nickerson T, Huynh H. Vitamin D analogue EB1089-induced prostate regression is associated with increased gene expression of insulin-like growth binding proteins. *J Endocrinol*, 160(2):223-229, 1999.
 24. Sahpazidou D, Stravoravdi P, Toliou Th, Nenopoulou H, et al. The effects of EB1089- a vitamin D analogue- on the growth of spontaneous mammary carcinoma (SMC) of C3H/Sy mice. 10th Interuniversity Symposium: Highlights in female cancers. *Abst book* p 206, 2000.
 25. Lippman SC, Hong KW. 13-cis-retinoic acid and cancer chemoprevention. *JNCI*, 13:111-115, 1992.
 26. Reuber MD. Morphologic and biologic correlation of hyperplastic and neoplastic hepatic lesions occurring "spontaneously" in C₃H XY hybrid mice. *Brit J Cancer*, 25:538-543, 1971.
 27. Ward JM, Vlahakis G. Evaluation of hepatocellular neoplasms in mice. *JNCI*, 61:807-811, 1978.
 28. Dalhoff K, Astrup L, Bach-Hansrn J, Burcharth F, Haahr H, Hamberg K, Evans RJ et al. Seocalcitol (EB1089), a vitamin D analogue, in hepatocellular carcinoma [Abstract]. *Hepatology*, 28(4):Pt2-227A, 1998.
 29. Kaczynski J, Hansson G, Remotti H, Wallerstedt S. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. *Histopathology*, 32:147-150, 1998.

Η παρούσα εργασία τιμήθηκε με το βραβείο "Γ. Τηνιακός" στο 8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Βόλος, 18-21 Απριλίου 2002.

Corresponding address

*Dr. Despina Sahpazidou, Symeonides Research Center
Theagenio Cancer Hospital, 2, Al. Symeonides str.
Thessaloniki 540007, Hellas, Tel. No. +0310 898237
Fax No. +0310845514*

Υπεύθυνος για αλληλογραφία:

*Δρ. Δέσποινα Σαχπαζίδου, Συμεωνίδειο Ερευνητικό Κέντρο, Θεαγένειο Αντικαρκινικό Νοσοκομείο, Αλ. Συμεωνίδη 2, Θεσσαλονίκη 54007, Τηλέφωνο: 0310898237
Fax: 0310845514*