

Beyin Tümörlerinde Anti-Anjiogenik Yaklaşımlar

Anti-Angiogenic Approaches for Brain Tumors

ÖZ

Kemoterapi oldukça heterojen yapıdaki kanser hücrelerini hedef alır. Anti-anjiogenik yaklaşımların hedefi ise homojen ve neoplastik olmadığı için daha az dirençli olan endotel hücreleri ve damar duvarına ait diğer yardımcı hücrelerdir. Bunun dışında başka birçok özellik anti-anjiogenik terapiyi kemoterapiye göre üstün kılar. Özellikle damarlanmanın çok fazla olduğu malignant gliomlar için anti-anjiogenik yaklaşımlar umut vaat etmektedir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Anti-anjiogenez, anti-anjiogenik faktörler, beyin tümörleri, klinik denemeler.

ABSTRACT

Chemotherapy attacks neoplastic cells, which display heterogeneity. On the other hand, anti-angiogenic approaches target homogeneous and non-neoplastic cells, mainly endothelial cells, which show less resistance. Anti-angiogenic approaches have some additional advantages to chemotherapy. As malignant brain tumors, especially malignant gliomas are among the most vascularized tumors, anti-angiogenic strategies have the potential to treat these diseases. This article reviews the principles of anti-angiogenic treatment for brain tumors.

KEY WORDS: Anti-angiogenesis, anti-angiogenic factors, brain tumors, clinical trials

Türker KILIÇ¹

Özlem YILDIRIM²

M. Necmettin PAMIR³

^{1,3} Marmara Üniversitesi
Nörolojik Bilimler Enstitüsü, İstanbul

² Marmara Üniversitesi Moleküler
Nöroşirürji Laboratuvarı, İstanbul

Geliş Tarihi: 07.05.2004

Kabul Tarihi: 05.07.2004

Yazışma adresi:

Türker KILIÇ

Marmara Üniversitesi

Nörolojik Bilimler Enstitüsü

PK 53, 34840 Maltepe-İstanbul

E-posta: türkiliç@tnn.net

Tel : 0532 514 14 98

Faks : 0216 327 52 49

ANTI-ANJİOGENİK YAKLAŞIMLAR

Tümör gelişiminin anjiogeneze bağımlı olduğu hipotezinin ortaya konmasının ardından ilk olarak 1971 yılında J. Folkman tarafından anjiogeneze inhibisyonunun tedavi avantajı sağlayabileceği düşüncesi geliştirilmiştir (19, 20). Anti-anjiogenik tedavi endotel hücrelere odaklanmıştır. Tümör ilişkili endotel hücreleri neoplastik olmamakla beraber, proliferasyon ve invazyon gibi malignan özelliklere sahiptirler. Dolayısıyla anti-anjiogenik yaklaşımların konvansiyonel kemoterapötik yaklaşımlara göre çeşitli avantajları vardır (33):

1. Tümörler hücre tipi ve malignan özelliklerine bağlı olarak heterojendirler; bu özellikleri sayesinde kemoterapötik ajanlara direnç gösterirler. Endotel hücreler ise homojen olduklarından ve neoplastik olmadıklarından daha az dirençlidirler.

2. Dolaşımdaki ilaç endotel hücrelerine kolaylıkla ulaşabilir; konvansiyonel sitotoksik ilaçlar ise tümör hücrelerine ulaşmak için yüksek stromal interstisyel basıncı aşmak zorundadır.

3. Solid tümörler -özellikle intraserebral tümörler- vaskülerizasyon fazından önce klinik semptomlar oluşturmayabilir. Dolayısıyla anjiogenezin durdurulması klinik semptomları engellemeye yetecektir.

4. Tümör damarları durgun damarlardan anjiogenik moleküllerin ekspresyonu ile ayırt edilebilir; bu moleküller tümör damarlarını hedeflemede yüksek seçicilik ortaya konmasını sağlayabilir.

5. Konvansiyonel kemoterapötik ajanların başarısı bütün tümör hücrelerinin öldürülmesine bağlıdır. Anti-anjiogenik ajanlar için bu gerekli değildir; örneğin sadece bazal membran hedef alınarak sekonder endotel hasarı oluşturulabilir veya endotel hücreleri için gerekli büyüme faktörleri inhibe edilerek tümörü besleyen damarlar engellenebilir.

6. Dört aşamalı olarak tariflenen anjiogeneze mekanizmasının her bir basamağı ayrı ayrı anti-anjiogenik yaklaşımı içinde barındırır. Anti-anjiogenik tedavinin optimizasyonu için spesifik seçenekler sunar. (Tablo I).

Beyin tümörleri için ortaya konan anti-anjiogenik yaklaşımların da ekstrakranial neoplazilere göre çeşitli avantajları ve sınırlandırmaları vardır. Örneğin, gliomlarda metastazın görülmeyişi ve sinir sisteminin immünolojik olarak korunmuş oluşu lokal tedaviyi ve konağın bağışıklık sisteminin

Tablo I. Anti-anjiogenik yaklaşımların ana hedefleri

Büyüme faktörlerinin antognistleri
Anjiogenik faktör üretiminin durdulması
Büyüme faktörlerinin monoklonal antikorları
Çözünür büyüme faktörü reseptörleri
Tirozin kinaz reseptörlerinin inhibisyonu
Protein Kinaz C inhibisyonu
Endotelial proliferasyonunun durdurulması
Hücre siklusu inhibitörleri
Vasküler hedefli ajanlar
Endotel progenitör hücrelerinin baskılanması
Matriks degradasyonunun durdurulması
Seçici veya seçici olmayan MMP inhibitörleri
Plazminojen aktivatörünün inhibisyonu
Endotel hücre yüzey markerlarının hedeflenmesi
Anti-integrin antikorları
Siklik peptidler

etkilenmemesini teorik olarak mümkün kılar. Ayrıca yetişkin beyinde rutin olarak bölünen hücreler ve anjiogeneze olmadığından, anti-anjiogenik tedavi direkt olarak yüksek damarlanma gösteren glioma yönelecek ve çevre beyin dokusu için çok daha az toksik olacaktır. Bu avantajların yanında kan-beyin engelinin sınırlandırıcı etkisinin aşılacak ilacın glioma nasıl ulaştırılacağı üstesinden gelinmesi gereken ilk sorudur (1, 4, 6, 15, 35).

Anti-anjiogeneze kullanılan anjiogeneze inhibi-törleri doğal ve sentetik moleküller olarak ikiye ayrılabilir.

Doğal Anjiogeneze İnhibitörleri: Anjiostatin

Primer tümör hücrelerinin ürettiği bir protein olan plazminojenin 38 kDal'luk internal parçasının (kringle 1-4) özgül olarak endotel hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiş ve bu molekül anjiostatin olarak isimlendirilmiştir (45, 46).

Toksik olmayan anjiostatin sistemik olarak verildiğinde tümör gelişimini çok güçlü şekilde inhibe eder; metastatik ve primer tümörlerin proliferasyonu ve apoptoz dengelerini sağlayarak tümörü sessiz durumda tutar (8, 46). Anjiostatinin tümör mikrodamarlarındaki endotel hücre proliferasyonunu baskılayarak değil; endotel hücrelerinde ve endotel prekürsör hücrelerinde apoptozu indükleyerek aktivitesini ortaya koyduğunu gösteren çalışmalar da vardır (36).

Ayrıca anjiostatinin endotel migrasyonu, invazyon ve tüp oluşumunu inhibe ettiği in vitro olarak gösterilmiştir (9, 10). Anti-anjiogenik ve anti-tümör aktivitesini bFGF ve VEGF gibi anjiogenik büyüme faktörlerini baskılayarak ortaya koyuyor olabileceğine dair bulgular vardır. Fare modelinde sıçan ve insan orijinli subkutanöz ve intraserebral gliomlar anjiostatinin sistemik uygulanması ile başarılı şekilde tedavi edilmiştir (25).

Endostatin

Kolajen XVIII karboksi terminalinde Ala-His bağının elastaz kesimiyle oluşan 184 amino asitlik bir peptiddir. Endostatin doğal bir anjiogenez inhibitörüdür, oluşum evresindeki tümörde total gerilemeyi sağlayan en güçlü molekül gibi görünmektedir (44, 59). Endostatinin, anjiostatine benzer etkileri vardır; spesifik olarak endotel proliferasyonunu, migrasyonunu ve tüp formasyonunu inhibe ettiği ve endotel hücrelerinde apoptozu indüklediği görülmüştür (14, 44). Endostatin aktivitesinin tropomiyozin-endostatin etkileşimiyle ilişkili olduğuna dair bulgular vardır (37). Endostatinin bir anjiogenik faktör olan uPA (ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü) ve PAI-1 (plazminojen aktivatör inhibitörü-1) seviyesini düşürerek aktivite gösterdiği; fokal adezyonu bozarak hücre iskelet yapısını değiştirdiği belirlenmiştir (60). Anjiostatinin değil ancak endostatinin proliferatif endotel hücrelerde erken cevap genleri, hücre döngüsü ve apoptoz inhibitör genlerini, mitojenle aktive olan protein kinazları, fokal adezyon kinazları, endotel gelişimiyle ilgili G-protein reseptörlerini ve hücrenin yapısal komponentlerini baskıladığı gösterilmiştir (49). Endostatin üreten hücrelerin immün-izolasyonlu sodyum alginat kapsüllerinde sistemik olarak verilmesinin ardından beyin tümörü gelişiminin %35 azaldığı, çevre dokuya invazyonun inhibe edildiği, total vasküler yoğunluğun %67.6, perfüzyonun %67, damar çapının %37 azaldığı saptanmıştır (43).

Anjiostatin ve endostatin beraber uygulandığında tümör gerilemesinde sinerjistik etki ortaya konur; bu iki molekülün moleküler hedeflerinin farklı olduğunu gösterir (61).

Trombospondinler

Birçok normal hücre tarafından salgılanan heparin bağlayıcı 5 üyeli bir ekstraselüler protein ailesidir. In vitro olarak endotel hücre

proliferasyonunu ve in vivo olarak kornea anjiogenezini inhibe ettiği gösterilmiştir (24, 42). Trombospondinin birçok farklı dokudaki endotel hücrelerin proliferasyonunu durdurduğu (2, 56) ve endotel hücreleri arasındaki ilişkiyi istikrarsızlaştırdığı görülmüştür (31). İlk olarak Bouck tarafından trombospondinin doğal anjiogenez supresörü olduğu; tümör oluşumu sırasında anjiogenik fenotipin ortaya konması için baskılandığı düşünülmüştür (57). TSP 1 ve TSP 2 hipoksi ve onkogenlerle modüle edilen anti-anjiogenik proteinlerdir; özellikle TSP 1 ekspresyonu tümör evresi ile ters orantılıdır (13). In vitro ve in vivo olarak TSP 1 hareketsiz damarlara yakın konumdadır, aktif olarak gelişen damar filizlerinde ise bulunmaz (31). TSP 1 promotör bölgesi, aynı zamanda bir transkripsiyon faktörü olan p53 tümör baskılayıcı proteinin hedef bölgelerindedir; p53 proteini TSP 1 sentezini regüle ederek anjiogenezini durdurur (12). Kanser mekanizmasında; özellikle gliom gelişiminde görülen p53 kayıplarının sıklığı göz önünde bulundurulduğunda bu bulgu oldukça anlamlıdır.

TSP-2 hasarı, tümör farklılaşması veya proliferasyona değil apoptozun anlamlı şekilde azalmasına yol açar (28). TSP-2 ekspresyon vektörüyle transfekte tümör hücrelerinin VEGF gibi güçlü anjiogenik faktörlerin salgılanıyor olmasına rağmen tümör damar yoğunluğunun ve boyutlarının anlamlı şekilde azaldığı; hatta TSP-2'nin TSP-1'den daha güçlü bir anti-anjiogenik faktör olabileceği gösterilmiştir (52).

Heparin ve Kortizon

Heparin ve kortizon beraber uygulandığında güçlü bir anjiogenez inhibitörüdür (21), gelişen kapillerin bazal membranlarında hızlı çözülmelere neden olduğu görülmüştür (30). Heparin türevleri varlığında kortikosteroidlerin mineralokortikoid ve glukokortikoid potansiyellerinden bağımsız anti-anjiogenik özellikleri keşfedilmiştir; bilinen en güçlü anjiostatik steroid tetrahidrokortizoldür (11). Anjiostatik steroidlerin endotelial plazminojen aktivatör inhibitörünü indükleyerek bazal membranın yıkımını engeller (5). Anjiogenezin önemli unsurlarından olan adezyon molekülleri üzerinde de inhibitör etkileri görülmüştür (48).

Neovastat (AE-941)

Kıkırdak dokusunun damardan yoksun oluşu, anjiogenezini engelleyici faktörleri içerebileceğini

düşündürmüştür. Bu düşünceyle yola çıkan araştırmacılar köpek balığı kıkırdağının ekstrelerini in vivo ve in vitro anjiogenez analizlerinde uygulamışlardır. Bu doğal olarak elde edilen maddenin anjiogenezi inhibe ettiği görülmüş ve Neovastat (AE-941) olarak adlandırılmıştır (17). VEGF vasküler endotel hücrelere direkt etki eden güçlü bir anjiogenik regülatördür. Neovastat VEGFR-2'ye afinitesi gösterir; dolayısıyla VEGFR-2'ye bağlanmada VEGF ile yarışarak VEGF-VEGFR-2 sinyali anlamalı şekilde inhibe eder (3). Anjiogenik sinyallerle aktive olan endotel hücresi, anjiogenezin ilk basamağı olan bazal membran ve ekstraselüler matriksin degradasyonu için MMPler (matriksmetallo proteazları) gibi proteolitik enzimleri üretirler. Dolayısıyla MMPlerin anjiogenezdeki rolü büyüktür. Western blot analizleri TIMP (doku metalloproteaz inhibitörü) benzeri proteinler içerdiğini göstermiştir. Neovastat özellikle MMP-2, MMP-9 ve MMP-12'nin aktivitelerini inhibe ederek antianjiogenik etkisini ortaya koyar (18, 23).

Platelet Faktör 4

Anti-anjiogenik aktivitesi, anjiogenez inhibitörü olduğu gösterilen fakat toksik etkileri nedeniyle hayvan çalışmaları ve klinik denemeleri engellenen protamin molekülüyle benzer şekilde heparini nötralize ettiğinin fark edilmesiyle ortaya çıkmıştır. İn vitroda rekombinant insan PF4'ü spesifik olarak endotel proliferasyonunu ve migrasyonunu inhibe eder (38).

Penisilamin

Bakır varlığında H₂O₂ üreterek kollojen çapraz bağlarını inhibe eder (50). Endotel hücre proliferasyonunu ve anjiogenezi durdurduğu in vitro da gösterilmiştir (7, 62). Kornea modelinde intravenöz olarak verilen D-Penisilamin, EGF stimülasyonlu anjiogenezi inhibe eder. Özellikle bakır defektli beslenen hayvanlarda sistemik olarak penicillamin verilmesinin glial tümör gelişimini sınırladığı gözlenmiştir (62, 63). Ayrıca intraserebral karsinomlardaki tümör gelişimi ve anjiogenezi inhibe ettiği bildirilmiştir (7).

Sentetik Anjiogenez İnhibitörleri:

Minosiklin

Yağda çözünürlüğü çok olan, yarı sentetik tetrasiklin türevidir. Dokuya geçişi oldukça iyi olan güçlü bir kolajenaz inhibitörüdür; matriks metalloproteinazlarına etki ederek bazal membranın

degradasyonunu inhibe eder (51). Endotel hücre gelişimini in vitroda inhibe eder (55). Anti-kolajenaz aktivitesiyle değil antibiyotik aktivitesiyle endotel hücrelerin DNA ve protein sentezini seçici olarak durdurur (27). Tümör parankiması içine direkt olarak enjekte edildiğinde sıçan beynindeki glial tümörlerde gerilemeye ve yaşam süresinin artmasına neden olduğu; sistemik olarak verildiğinde ise etkisiz kaldığı görülmüştür (22, 58).

Medroksiprogesteron

Kolajen yıkımını ve tavşan korneasında tümör-indüksiyonlu anjiogenezi inhibe eden sentetik bir steroiddir (26). Plazminojen aktivator proteinin ortaya koyduğu proteolitik aktivite, ekstraselüler matriksde glikozaminoglikanlara bağlı bulunan FGF ve PDGF gibi anjiogenik büyüme faktörlerinin serbest kalmasına neden olur; medroksiprogesteronun endotel hücrelerin ürettiği plazminojen aktivatörünü inhibe etme yeteneğindedir (47).

AGM-1470 (TNP-470)

Aspergillus fumigatus fresenius'un doğal olarak salgıladığı fumagillinin analogu olan bir anjiogenez inhibitör ailesi sentezlenmiştir ve bu anjiogenezin inhibitörlerinden biri de AGM-1470 (Angiogenesis Modulator 1470)'dir; kapiller endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu inhibe eder (29, 34). AGM-1470 sistemik olarak verildiğinde implante edilmiş gliomlarda anjiogenezin azaltılarak büyümenin durdurulduğu (54), intrakranial gliomların inhibe olduğu ve hastaların yaşam süresinin uzadığı gözlenmiştir (53).

STI-571 (Gleevec)

Tümör hücrelerinde ve tümördeki hiperplastik kapillerin endotel hücrelerinde PDGF-b ekspresyonu; bütün gliom hücre serilerinde ve insan malignastrositom cerrahi numunelerinde PDGF-a reseptörü alt ünitelerinin aşırı ekspresyonu gözlenir. STI571 2-fenilaminopirimidin sınıfına ait bir tirozin kinaz inhibitörüdür (40). Özellikle Abl onkoproteini ve anjiogenik bir büyüme faktörü olan PDGF reseptörlerine karşı etkinliği yüksektir (16). STI571'in PDGF ligandları ve reseptörlerinin ortaya koyduğu otokrin-stimülasyonu inhibe ederek intrakranial insan glioblastoma implantlarında gelişimi engellediği gösterilmiştir (32). Beyin tümörlerinde ve anjiogenezde rol oynayan birçok büyüme faktörü reseptörlerinin tirozin kinaz ailesinden oluşu gleevec gibi tirozin kinaz inhibitörlerini klinik denemelere taşımıştır (39).

Beyin tümörlerinde klinik denemeleri başlamış olan anti-anjiogenik moleküller; etki mekanizmaları ve klinik fazları Tablo II'de özetlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Avgeropoulos, NG, Batchelor TT New treatment strategies for malignant gliomas. *Oncologist* 4: 209-224, 1999
2. Bagavandoss, P. and Wilks JW, Specific inhibition of endothelial cell proliferation by thrombospondin. *Biochem Biophys Res Commun* 170: 867-872, 1990
3. Beliveau R, Gingras D, Kruger EA, Lamy S, Sirois P, Simard B, Siro MG, Tranqui L, Baffert F, Beaulieu E, Dimitriadou V, Pepin MC, Courjal E, Richard I, Poyet P, Falardeau P, Figg WD, Dupont E: The angiogenic agent neovastat (AE-941) inhibits vascular endothelial growth factor mediated biological effects. *Clin Cancer Res* 8(4): 1242-1250, 2002
4. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E: Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 103: 159-165, 1999
5. Blei F, Wilson EL, Mignatti P, Rifkin DB: Mechanism of action of angiostatic steroids: suppression of plasminogen activator activity via stimulation of plasminogen activator inhibitor synthesis. *J Cell Physiol* 155:568-578, 1993
6. Brem, H, Mahaley MS, Vick NA, Black KL, Schold SC, Burger PC, Friedman AH, Ciric IS, Eller TW, Cozzens JW. Interstitial chemotherapy with drug polymer implants for the treatment

Tablo II. Beyin tümörlerinde klinik olarak denenen anjiogenez inhibitörleri

İnhibitör	Etki Mekanizması	Klinik Deneme Fazı
Marimastat	MMP inhibisyonu	GBMlerde faz III
Neovastat	MMP inhibisyonu	GBMlerde faz III
Penicilamin	Urokinaz inhibisyonu	GBMlerde faz II
AGM-1470 (TNP-470)	Hücre siklusunun, EH büyümesinin inhibisyonu	erişkin solid tümörlerinde faz II
Endostatin	EH proliferasyonunun inhibisyonu	faz I, II
Angiostatin	VEGF ve EH proliferasyonunun bloke edilmesi	solid
Pecillamine	EH migrasyonu/proliferasyonunun bloke edilmesi	GBMlerde faz II
Famesil Tranferaz İnhibitörü (L-778)	EH migrasyonu/proliferasyonunun bloke edilmesi	GBMlerde faz II
Anti-VEGF Antikoru faz I, II	VEGF'in inaktivasyonu	metastatik baş/boyun tümörleri
Anti-İntegrin B3 (Vitaxin)	EH spesifik integrin inhibisyonu	erişkin solid tümörlerinde faz I
Thalidomid	VEGF ve bFGF inaktivasyonu	malignant gliomlarda faz I
İnterferon- α	VEGF ve bFGF inaktivasyonu	yüksek gradeli gliomalarda faz II
PTK787	VEGF reseptör sinyalinin bloke edilmesi	GBMlerde faz I
Suramin	PDGF reseptörünün bloke edilmesi	GBMlerde faz II
EMD121974	EH yüzeyindeki integrinin inhibisyonu	beyin tümörlerinde faz I, II
Deltaparin		GBMlerde faz II
LY317615	Protein Kinaz C inhibisyonu	GBMlerde faz II
Platelet Faktör 4	EH migrasyonu/proliferasyonunun bloke edilmesi	faz II
Minosiklin (tetrasiklin)	EH proliferasyonunun inhibisyonu	beyin tümörlerinde faz I
STI-571 (Gleevec)	Tirozin kinaz inhibitörü	malignant gliomlar ve meingiomalarda faz I, II

(33, 41, National Cancer Institute, <http://cancer.gov/>)

- of recurrent gliomas. *J Neurosurg* 74:441-446, 1991
7. Brem SS, Zagzag D, Tsanaclis AM, Gately S, Elkouby MP, Brien SE: Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. Suppression of endothelial cell turnover by penicillamine and the depletion of copper, an angiogenic cofactor. *Am J Pathol* 137: 1121-1142, 1990
 8. Cao Y: Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol* 33:357-369, 2001
 9. Cao Y, Ji RW, Davidson D, Schaller J, Marti D, Sohndel S, McCance SG, O'Reilly M.S, Llinas M, Folkman J: Kringle of human Angiostatin, Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J Biol Chem* 271: 29461-29467, 1996
 10. Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, Anand-Apte B, Soker S, Letter B, O'Reilly M, Folkman J: Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5579- 5583, 1998
 11. Crum R, Szabo S, J: Folkman A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science* 230: 1375-1378, 1985
 12. Dameron KM, Volpert OM, Tainsky MA, Bouck N: Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265: 1582-1584, 1994.
 13. de Fraifont F, Nicholson AC, Feige JJ, Van Meir EG. Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends Mol Med* 7:401-407, 2001
 14. Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ., Lu H, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP: Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 274: 11721-11726, 1999
 15. Doolittle, ND, Petrillo A, Bell S, Cummings P, Eriksen S: Blood brain barrier disruption for the treatment of malignant brain tumors: The National Program. *J Neurosci Nurs* 30:81-90, 1998
 16. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmerman J, Lydon NB: Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med* 2:561-566, 1996
 17. Dupont E, Savard PE, Jourdain C, Juneau C, Thibodeau A, Ross N, Marenus K, Maes DH, Pelletier G, Sauder DN: Antiangiogenic properties of a novel shark cartilage extract: potential role in treatment of psoriasis. *J Cutan Med Surg* 2(3): 146-152. 1998
 18. Falardeau P, Champagne P, Poyet P, Hariton C, Dupont E: Neovastat, a naturally occurring multifunctional antiangiogenic drug, in phase III clinical trials. *Semin Oncol* 28(6): 620-625. 2001
 19. Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186, 1971
 20. Folkman J: Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. *Ann Intern Med* 82:96-100, 1975
 21. Folkman J, Langer R, Linhardt RJ, Haudenschild C, Taylor S: Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 221: 719-725, 1983
 22. Frazier JL, Wang PP, Case D, Tyler BM, Pradilla G, Weingart JD, Brem H: Local delivery of minocycline and systemic BCNU have synergistic activity in the treatment of intracranial glioma. *J Neuro-Onc.* 64: 203-209, 2003
 23. Gingras D, Renaud A, Mousseau N, Beaulieu E, Kachara Z, Beliveau R. Matrix proteinase inhibition by AE-941, a multifunctional antiangiogenic compound. *Anticancer Res* 21(1A): 145-155, 2001
 24. Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, LE B, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP: A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6624-6628, 1990.
 25. Griscelli F, Li H, Bennaceur-Griscelli A, Soria J, Opolon P, Soria C, Perricaudet M, Yeh P, Lu H: Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6367-6372, 1998
 26. Gross J, Azizkhan RG, Biswas C, Bruns RR, Hsieh DS, Folkman J: Inhibition of tumor growth, vascularization, and collagenolysis in the rabbit cornea by medroxyprogesterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:1176-1180, 1981
 27. Guerin C, Lathera J, Masnyk T, Golub LM, Brem H: Selective endothelial growth inhibition by tetracyclines that inhibit collagenase. *Biochem Biophys Res Commun* 188:740-745, 1992
 28. Hawighorst T, Velasco P, Streit M, Hong Y.K, Kyriakides T.R, Brown L.F, Bornstein P, Detmar M: Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: a novel host anti-tumor defense mechanism. *EMBO J* 20:2631-2640, 2001
 29. Ingber D.E, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J: Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 348:555-557, 1990
 30. Ingber DE, Madri JA, Folkman J: A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: induction of capillary basement membrane dissolution. *Endocrinology* 119: 1768-1775, 1986
 31. Iruela A, Bornstein P, Sage H: Thrombospondin exerts an antiangiogenic effect on cord formation by endothelial cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5026-5030, 1991
 32. Kılıç T, Alberta JA, Zdunek PR, Acar M, Iannarelli P, O'Reilly T, Buchdunger E, Black PM, Stiles CD: Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth by an orally active kinase inhibitor of the 2-Phenylamino pyrimidine class. *Cancer Res* 60:5143-5150, 2000
 33. Kirsch M, Schackert G, Black PM. Anti-angiogenic treatment strategies for malignant brain tumors. *J Neuro-Oncol* 50: 149-163, 2000
 34. Kusaka M, Sudo K, Fujita T, Marui S, Itoh F, Ingber D, Folkman J: Potent anti-angiogenic action of AGM-1470: comparison to the fumagillin parent. *Biochem Biophys Res Commun* 174:1070-1076, 1991
 35. Langer R, Murray J: Angiogenesis inhibitors and their delivery systems. *Appl Biochem Biotechnol* 8:9-24, 1983
 36. Lannutti BJ, Gately ST, Quevedo ME, Soff GA, Paller AS: Human angiostatin inhibits murine hemangioendothelioma tumor growth in vivo. *Cancer Res* 57:5277-5280, 1997
 37. MacDonald NJ, Shivers WY, Narum DL, Plum SM, Wingard JN, Fuhrmann SR, Liang H, Holland L, Chen DH, Sim BK: Endostatin binds tropomyosin. A potential modulator of the antitumor activity of endostatin. *J Biol Chem* 276:25190-25196, 2001

38. Maione TE, Sharpe RJ: Development of angiogenesis inhibitors for clinical applications. *Trends Pharmacol Sci* 11:457-461, 1990
39. Newton HB: Molecular neuro-oncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. Part 1: Growth factor and Ras signaling pathways. *Expert Rev Anticancer Ther* 3(5): 595-614, 2003
40. Nister M, Claesson-Welsh L, Eriksson A, Heldin CH, Westermark B: Differential expression of platelet-derived growth factor and its receptors in malignant glioma cell lines. *J. Biol. Chem.*, 266:16755-16763,1991
41. Pudivalli VK, Sawaya R: Antiangiogenesis- therapeutic strategies and clinical implications for brain tumors. *J Neuro-Oncol* 50: 189-200. 2000
42. Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP: Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 56:345-355, 1989
43. Read T.A, Sorensen D.R, Mahesparan R, Enger P.O, Timpl R, Olsen B.R., Hjelstuen M.H, Haraldseth O and Bjerkvig R. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. *Nat Biotechnol* 19:29-34, 2001
44. Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88: 277-285, 1997
45. Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Cao Y, Moses M, Lane WS, Sage E.H, Folkman J: Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59:471-482, 1994
46. Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, and Folkman J: Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79:315-328, 1994
47. Saksela O, Rifkin DB: Release of basic fibroblast growth factor- heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J Cell Biol* 110:767-775, 1990
48. Savu SR, Silvestro L: Adhesion inhibition in vitro by heparin derivatives correlates with their activity on angiogenesis in mice. *J Cell Mol Med* 7(2): 187-191, 2003
49. Shichiri M, Hirata Y, Antiangiogenesis signals by endostatin. *FASEB J* 15:1044-1053, 2001
50. Siegel RC: Collagen cross-linking. Effect of D-penicillamine on cross- linking in vitro. *J Biol Chem* 252:254-259, 1997
51. Sipos EP, Tamargo RJ, Weingart JD, Brem H. Inhibition of tumor angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 732:263-272, 1994
52. Streit M, Riccardi L, Velasco P, Brown LF, Hawighorst T, Bornstein P, Detmar M: Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14888-14893, 1999
53. Takamiya, Y, Brem H, Ojeifo J, Mineta T, Martuza RL: AGM-1470 inhibits the growth of human glioblastoma cells in vitro and in vivo. *Neurosurgery* 34:869-875, 1994
54. Taki T, Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Saitoh Y, Izumoto S, Mori K, Hayakawa T. Anti-proliferative effects of TNP-470 on human malignant glioma in vivo: potent inhibition of tumor angiogenesis. *J Neurooncol* 19:251-258, 1994
55. Tamargo RJ, Bok RA, Brem H. Angiogenesis inhibition by minocycline. *Cancer Res* 51:672-675, 1991
56. Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA, Giavazzi R: Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol* 111:765-772, 1990
57. Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ, Bouck N: Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* 122:497-511
58. Weingart JD, Sipos EP, Brem H: The role of minocycline in the treatment of intracranial 9L glioma. *J Neurosurg* 82:635-640, 1995
59. Wen W, Moses MA, Wiederschain D, Arbiser JL, Folkman J: The generation of endostatin is mediated by elastase. *Cancer Res* 59:6052-6056, 1999
60. Wickstrom SA, Veikkola T, Rehn M, Pihlajaniemi T, Alitalo K, Keski O: Endostatin-induced modulation of plasminogen activation with concomitant loss of focal adhesions and actin stress fibers in cultured human endothelial cells. *Cancer Res* 61: 6511-6516, 2001
61. Yokoyama Y, Dhanabal M, Griffioen AW, Sukhatme VP, Roomakrishnan S. *Cancer Res* 60: 2190-2196, 2000
62. Yoshida D, Ikeda Y, Nakazawa S: Suppression of 9L gliosarcoma growth by copper depletion with copper-deficient diet and D-penicillamine. *J Neurooncol* 17:91-97, 1993
63. Yoshida D, Ikeda Y, Nakazawa S: Suppression of tumor growth in experimental 9L gliosarcoma model by copper depletion. *Neurol Med Chir* 35:133-135, 1995