



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CARDIOLOGICHE, TORACICHE E VASCOLARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA

IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI

INDIRIZZO: SCIENZE GERIATRICHE ED EMATOLOGICHE

XXVII CICLO

*Ruolo dell'inibitore della trombina
dabigatran nella crescita neoplastica*

DIRETTORE DELLA SCUOLA: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

COORDINATORE DI INDIRIZZO: Ch.mo Prof. Fabrizio Fabris

SUPERVISORE: Ch.mo Dott. Fabrizio Vianello

DOTTORANDA: Dr.ssa Luisa Sambado

Indice

Indice	1
Sommario	3
Abstract	5
Elenco delle abbreviazioni	7
<i>Introduzione</i>	10
1. Trombosi e cancro	11
2. Trombina	14
3. Recettore attivato da proteasi (PAR)	30
4. Dabigatran	37
<i>Obiettivi generali</i>	42
<i>Materiali e metodi</i>	45
1. Linee cellulari, colture e trattamenti	46
2. Valutazione dell'espressione del recettore PAR-1	47
3. Valutazione della proliferazione e vitalità cellulare	48
4. Valutazione dell'apoptosi	48
5. Valutazione del ciclo cellulare	49
6. Valutazione dell'espressione di proteine coinvolte nel ciclo cellulare e	

nell'angiogenesi	50
7. Valutazione dell'espressione di geni coinvolti nell'angiogenesi attraverso metodica realtime PCR	51
8. Valutazione della chemiotassi con camera di Boyden	53
9. Formazione dei vasi con cellule endoteliali primarie HUVEC.	54
10. Analisi statistica	55
<i>Risultati</i>	56
1. Espressione di PAR-1	57
2. Trombina e proliferazione neoplastica	57
3. Effetti del dabigatran sulla proliferazione indotta da Trombina	58
4. Trombina e apoptosi	61
5. Ciclo cellulare: effetti della trombina e dabigatran	63
6. Effetti di trombina e dabigatran sull'espressione di proteine regolatrici del ciclo cellulare, p27 e ciclina D1	65
7. Effetti di trombina e dabigatran sull'espressione di proteine implicate nell'angiogenesi, twist e gro- α	69
8. Chemotassi indotta da trombina e ruolo del dabigatran	73
9. Trombina e neoangiogenesi: ruolo del dabigatran	77
<i>Discussione</i>	79
<i>Bibliografia</i>	88

Sommario

Gli eventi trombotici rappresentano una complicanza frequente dei pazienti con malattia neoplastica e ne condizionano una prognosi peggiore rispetto a pazienti neoplastici senza eventi trombotici. Ciò può suggerire che lo stato di ipercoagulabilità presente in questi pazienti favorisce la progressione neoplastica. Tra i fattori della coagulazione in grado di modulare la progressione neoplastica c'è la trombina, una serin-proteasi il cui ruolo principale è la trasformazione del fibrinogeno in fibrina, tappa finale della formazione del coagulo. La trombina tuttavia è in grado anche di stimolare processi come la proliferazione, la migrazione, l'adesione cellulare, l'angiogenesi, e la metastatizzazione. Tutti questi processi indotti dalla trombina sono mediati dal PAR-1, un recettore attivato da proteasi che viene espresso sulla membrana cellulare. Il dabigatran, un anticoagulante di corrente impiego nel trattamento del tromboembolismo venoso, inibisce in maniera reversibile l'attività della trombina modificandone la conformazione e rendendola incapace di legare ed attivare PAR-1.

Obiettivo dello studio è di valutare se dabigatran è in grado di annullare gli effetti della trombina sulla progressione tumorale. In particolare, sono stati valutati gli effetti della trombina e dabigatran *in-vitro* sulla regolazione del ciclo cellulare, sulla proliferazione di cellule tumorali, sulla motilità e sulla formazione di neo-vasi.

Per lo studio sono state utilizzate cellule di adenocarcinoma mammario e cellule di glioblastoma, come pure gli effetti di trombina e dabigatran sono stati definiti anche su una linea di cellule endoteliali. Per valutare l'effetto sulla proliferazione e sulla regolazione del ciclo cellulare, sono stati utilizzati il test di proliferazione MTS, l'analisi citofluorimetrica e il western blot. La morte cellulare è stata quantificata al citofluorimetro con anessina V e PI. Con le medesime metodiche è stato valutato la

neoangiogenesi indotta da trombina e gli effetti di dabigatran, valutando l'espressione di proteine coinvolte nel processo angiogenetico come Twist e Gro- α . Infine, mediante camera di Boyden è stato quantificato il ruolo di trombina e dabigatran sulla chemotassi come pure abbiamo valutato il processo di neoformazione vasale su Matrigel.

Abbiamo osservato come trombina determini proliferazione di cellule di adenocarcinoma mammario MCF-7 e che questa proliferazione si accompagna ad elevata espressione della ciclina D1 unitamente alla diminuzione della proteina p27, molecole chiave nella progressione del ciclo cellulare. La presenza di dabigatran si è dimostrata efficace nell'antagonizzare la proliferazione indotta da trombina come pure l'espressione delle proteine coinvolte nel ciclo cellulare. Abbiamo inoltre dimostrato che la formazione di neovasi stimolata dalla presenza di trombina si accompagna ad un aumento significativo dell'espressione di proteine regolatrici della neoangiogenesi, Twist e Gro- α . Trombina si è dimostrata anche in grado di determinare chemoattrazione di cellule neoplastiche e endoteliali. Tutti questi effetti pro-tumorali indotti da trombina sono stati significativamente inibiti da dabigatran.

Abbiamo pertanto confermato che la trombina è attiva in molti processi favorenti la crescita neoplastica, dalla proliferazione, alla migrazione, fino alla neoangiogenesi. Dabigatran, un inibitore della trombina, si è dimostrato efficace nell'antagonizzare tali effetti pro-neoplastici. Anche se i nostri dati dovranno essere confermati da osservazioni cliniche, l'impiego di dabigatran come anticoagulante in pazienti con cancro e trombosi potrebbe rivelarsi efficace anche nel contrastare la progressione neoplastica. Inoltre i nostri dati indicano nel recettore PAR-1 un possibile target di futuri farmaci antiproliferativi.

Abstract

Background: venous thromboembolism, a common complication of several malignant diseases, is a cause of poorest prognosis for the patients with respect to patients suffering for thrombus manifestation only. This occurs in the presence of a hypercoagulability state caused by coagulation factor that activate a number of pathways involved in tumor progressions. Among this factors, thrombin, a serine-protease implicated in the coagulation of fibrin, showed several physiologic and pathologic features and controls several cellular functions, including mitogenesis, cell adhesion, and angiogenesis. All this cellular responses are mediated by the thrombin-induced activation of PAR-1, a protease activated receptor expressed on the membrane of different cell types. Dabigatran is a new oral anticoagulant used in clinics for venous thromboembolism that inhibits effects of thrombin in a reversible manner by directly binding thrombin and altering its conformation.

Aim: This study aims to evaluate the modulatory effects of dabigatran on tumor progression induced by thrombin. Moreover, we aim to study the effects of dabigatran in the regulation of cell cycle and proliferation in different tumor cell lines and of the neoangiogenesis induced by thrombin, with particular emphasis on the expression of Twist and Gro- α .

Materials and methods: the tumor cell lines MCF-7 and U87-MG, from breast cancer and glioblastoma, respectively, and the endothelial cell line HUVEC, were used to evaluate the effects of dabigatran on thrombin-induced proliferation (MTS assay), cell cycle (propidium iodide, PI, and BrdU assay) and expression of p27 and cyclin D1 by western blot, both proteins involved in regulation of cell cycle. Cell death of cells under

treatment with thrombin and thrombin + dabigatran was evaluated by flow cytometry with PI and annexinV. We also evaluated the expression of Twist and Gro- α on tumoral cell lines, treated as above described, by real time PCR and western blot. Furthermore, we evaluated the effect of dabigatran on chemiotaxis (boyden chamber) and cord formation on matrigel.

Results: This study demonstrated that thrombin induced an increased proliferation, the upregulation of cyclin D1 expression and the downregulation of p27, a protein regulating the cell cycle by increasing the amount of cells in S phase, on MCF-7 cells, effects reversed by treatment with dabigatran. On the contrary, U87-MG cells showed a reduced proliferation and an increased escape from cell death, following thrombin treatment. With regards to the vessel formation, thrombin upregulates the mRNA and protein expression of Twist and Gro- α and enhanced chemiotaxis of MCF-7, U87-MG, and HUVEC cells and stimulated tube formations in HUVEC cells, all effects hampered by the treatment with dabigatrans.

Discussion: Thrombin stimulates cell proliferation, migration of tumor cell and tube formation in HUVEC endothelial cell line. dabigatran reduced cell proliferation, by modulating the expression of cyclin D1 and p27, both proteins involved in cell cycle regulation. Furthermore dabigatran inhibited neoangiogenesis and migration by reducing the expression of Twist and Gro- α on tumor and endothelial cell lines, and significantly decreased tube formation and chemiotaxis. Our data indicated that dabigatran could be used not only as an anticoagulant, but also as an anti-proliferative and anti-angiogenic drug to prevent tumor progression in patients suffering for different tumors.

Elenco delle abbreviazioni

- $Na_2B_4O_7$ Sodio Tetraborato
- AA Ascorbic Acid, Acido Ascorbico
- Arg Arginine, arginina
- Asp Aspartic acid, acido aspartico
- *BFGF* Basic Fibroblast Growth Factor, Fattore di Crescita dei fibroblasti Basale
- BrdU Bromo Deossi-Uridine
- *BSA* Bovine Serum Albumin, albumina sierica di bovino
- *DMEM* Dulbecco Modified Eagle's Medium
- *DMSO* DiMetilSolfOssido
- DNA deossiribonucleic acid, acido deossiribonucleico.
- DVT Deep Vein Thrombosis, Trombosi Venose Profonde
- *EBM* Endothelial Basal Medium, Terreno di Coltura Endoteliale Basale
- ECL Enhanced chemiluminescent, stimolatore chemiluminescente
- *EGF* Epidermal growth Factor, Fattore di Crescita Epidermale
- EGFR Epidermal growth factor receptor, recettore del fattore di crescita epidermale
- *FBS* Fetal Bovine Serum, Siero Fetale Bovino
- *FCS* Fetal Calf Serum, Siero Fetale di Vitello
- FITC Fluorescein Isothiocyanate, marcatura di colore verde
- Gly Glycine, Glicina
- GRO- α Growth Regulated Oncogene- α , Regolatore della crescita oncogenica- α
- GTPase Guanidin trifosfato
- *HC* Hydrocortisone; Idrocortisone

- *HCl* Hydrogen Chloride, Acido Cloridico
- *HEP* Heparin, Eparina
- *HUVEC* Human Umbilical Vein Endothelial Cells, Cellule endoteliali umane della vena ombelicale linea primaria
- *IGF* Insulin Growth Factor, Fattore di Crescita Insulinico
- *LMWH* Low molecular weight heparin, eparina a basso peso molecolare
- *MCF-7* Michigan Cancer Foundation-7, linea cellulare immortalizzata di cancro alla mammella
- MFI mean of fluorescence intensity, media dell'intensità di fluorescenza
- mRNA Messenger ribonucleic acid, Acido ribonucleio messaggero
- MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS]
- PAR ProteaseactivatedReceptor, Recettore Attivato da Proteasi
- *PBS* Phosphate buffered saline, buffer salino fosfato
- PCR Polymerase chain reaction, Reazione di Polimerizzazione a Catena
- PE Pulmonary Embolism, Embolismo polmonare
- PI PropidiumIodide, PropidioIodide
- PI-3K Phosphatidil Inositol 3 kinase, fosfatidilinositolo 3 chinasi
- *PM* Peso molecolare
- RNA ribonucleic acid, Acido ribonucleio
- TBS Tris-buffered saline, buffer di lavaggio salino a base di Tris
- TGF- β Tumor Growth Factor- β , fattore di crescita tumorale β
- *U87-MG* Human glioblastoma, Cellule della linea cellulare di glioblastoma umano immortalizzata

- *VEGF* VascularEndhotelialgrowthFactor, Fattore di crescita dell'endotelio vascolare
- VTE Venous Thromboembolism, Tromboembolismi venosi

INTRODUZIONE

Trombosi e cancro

Esiste una stretta correlazione tra trombosi e cancro che aumenta la mortalità nei pazienti affetti da tali malattie (Gresele P. 2008); questa correlazione è conosciuta sin dal 1865, quando Trousseau descrisse per primo, dopo un'autodiagnosi di tromboflebite e tumore gastrico, che “nel cancro c'è una condizione speciale del sangue che predispone a coagulazione spontanea anche in assenza di reazione infiammatoria” (Trousseau 1865). Negli stessi anni Billroth identificò la presenza di cellule tumorali all'interno di trombi (Billroth 1877-78). Gli studi sono proseguiti fino ai giorni nostri, confermando che in pazienti con tumore e tromboembolismi venosi (VTE), possono avere una prognosi infausta (Lee A.Y.Y. 2003).

In questi anni sono state valutate quali siano le manifestazioni venose principali coinvolte nelle trombosi associate al cancro che includono trombosi venose profonde (DVT) embolismi polmonari (PE), come le trombosi venose viscerali o splanchniche, che vengono tutte descritte come VTE. Inoltre, si sono riscontrati pazienti che hanno avuto occlusioni arteriose, infarti e sintomi anginali con una possibile relazione alla predisposizione genetica. (Elyamany G. 2014). Sulla base di studi retrospettivi a lungo termine, si riscontra anche che pazienti affetti da forme tumorali che sviluppano un evento di trombotico possiedono un rischio di 4-8 volte maggiore di mortalità rispetto ai pazienti senza il cancro. L'incidenza di questo evento è maggiormente osservabile in alcune tipologie tumorali: è più elevata in quelli che coinvolgono i polmoni (21% dei casi), il colon (18%), la prostata (17%) e il seno (18%) (Lee A.Y.Y. 2003, Rickle F.R. 2001), ma non si esclude che altri tipi tumorali abbiano questa correlazione con un'incidenza relativamente più bassa (cervello, pancreas, ovaio, stomaco).

E' stato anche valutato che pazienti che hanno il cancro nel 4-20 % dei casi hanno un avuto VTE con un'incidenza annuale di 0,5% paragonata alla popolazione generale che ha il 0,1% e che le complicanze trombotiche sono la seconda più frequente causa di mortalità in pazienti con il cancro. (Elyamany G. 2014).

In letteratura si possono riscontrare molti casi in cui si è descritta la presenza di cancro e la possibilità di avere VTE (Rickle F.R. 2001, Lee A.Y.Y. 2003). Tuttavia, anche in assenza di VTE, i pazienti oncologici con tumori solidi e leucemie hanno comunemente i valori di coagulazione sanguigna in vitro anomali, caratterizzati da diversi gradi di coagulazione con condizioni subcliniche di ipercoagulabilità (Caine G.J. 2002). Questo porta a concludere che c'è una relazione tra cancro e coagulazione, poiché si possono frequentemente riscontrare delle problematiche coagulative nei pazienti in presenza di cancro (Rickle F.R. 2001, Lee A.Y.Y. 2003); questa ipercoagulabilità è legata a diversi fattori che controllano la coagulazione e l'emostasi fisiologica, ma la fisiopatologia non è del tutto compresa (Elyamany G. 2014).

Tra questi fattori ritroviamo:

- Il fattore tissutale (TF) che regola e modula l'attivazione della coagulazione. Molti tumori hanno dimostrato che possono attivare la coagulazione sanguigna attraverso l'espressione anomala di TF che viene espresso in maniera costitutiva sulle cellule tumorali, mentre fisiologicamente è espressa dalle cellule vascolari, monociti e macrofagi solo nel caso di induzione causata da citochine infiammatorie, da lipopolisaccaridi batterici o da danno vascolare (Elyamany G. 2014, Caine G.J. 2002). Quando viene espresso sulla membrana cellulare dei tumori va ad attivare il FVII, formando con lui un complesso che va a sua volta attiva il FX con successivo clivaggio di protrombina in trombina. Quest'ultima interagisce con le cellule attraverso il recettore PAR clivandolo, attivando

così le varie vie di segnale interne. Inoltre la presenza del fattore tissutale va a stimolare la formazione di neovasi, upregolando il *vascular endothelial growthfactor* (VEGF) (Rickles F.R. 2003, Rak J. 2009). Come dimostrato dal gruppo di Contrino et al l'espressione a livello dell'endotelio vascolare di TF nel tumore alla mammella è strettamente correlato con l'iniziazione angiogenetica (Contrino J. 1996).

- Le piastrine, che sono presenti nel sangue e che, se attivate facilitano la crescita tumorale attraverso il rilascio di fattori di crescita e di citochine come il trombossano A₂, il fattore piastrinico 4, il fattore derivante dalla crescita piastrinica (PDGF), il fattore di crescita trasformante (TGF- β) e altre chemochine meno rilevanti. Quando vengono attivate danno la possibilità di formare piccoli coaguli al cui interno possono essere presenti cellule tumorali, facilitando così il trasporto e la formazione di metastasi lontane dal sito del tumore primario. Vanno inoltre a migliorare l'efficienza metastatica del tumore, promuovendo l'adesione alle pareti vascolari e il passaggio al di fuori di esse, proteggono dalla risposta antitumorale, stimolano la neoangiogenesi e, non meno importante, aumentano la produzione di trombina (Metha P. 1984). In pazienti con una malattia tumorale avanzata si è riscontrata un'elevata attivazione piastrinica che è dimostrata da un turnover maggiore e da una minor sopravvivenza delle piastrine. Questo perché i resti di cellule tumorali in circolo o sostanze prodotte da loro portano ad aggregare le piastrine ed ad avere un aumento dell'incidenza della formazione di trombi in pazienti neoplastici (Hara Y. 1980). Altre cause che aumentano la attivazione piastrinica nel cancro includono la generazione di trombina indotta dal cancro stesso, dall'adenosin 5' difosfato e dalla proteinasi simile alla catepsina B prodotta dalle cellule tumorali e inoltre elevati livelli di fattore di von Willebrand (Karpatkin S. 1996).

- La Trombina discussa successivamente.

La trombina

La trombina (39 KDa) è una Serin proteasi, chiamata anche Fattore II (FII), il cui ruolo principale è svolto all'interno della coagulazione. Fa parte della famiglia chiamata chimotripsina che include enzimi digestivi coinvolti nel processo di degradazione, enzimi coinvolti nella coagulazione del sangue, nella morte cellulare, nella immunità cellula-mediata, nella fibrinolisi, nel complemento, nella fecondazione e nello sviluppo embrionico (Di Cera E. 2008). Il ruolo della trombina non è solo legato alla coagulazione, poiché si occupa di stimolare e regolare anche altre vie e altre funzioni all'interno dell'organismo umano (Fenton J.W. 1998). È prodotta come pre-propeptide dal fegato e rilasciata in circolo dopo aver subito molte modificazioni post traslazionali. Si trova sul cromosoma 11 ed è organizzata in 14 esoni, che formano così un cDNA di 26929 paia di basi (Goldsack N.R. 1998). L'emivita della trombina nel siero è di circa 14 secondi poiché viene velocemente catturata dai suoi inibitori: antitrombina, α_2 macro-globulina, cofattore eparinico II, la proteasi nepsina-1 e α_1 anti tripsina (Goldsack N.R. 1998)

L'attivazione di questa proteasi è strettamente regolata: di solito la protrombina circolante viene clivata in due siti per essere trasformata in trombina dopo che è avvenuto un danno tissutale. L'attivazione proteolitica della trombina può essere mediata dal complesso di protrombinasi formato da fattore X attivato(FXa), Fattore V attivato (FVa) e dai fosfolipidi che hanno carica negativa e vengono esposti dal danno tissutale (chiamati anche fattore piastrinico 3), ed è importante anche la presenza di ioni Ca^{2+} . Dopo che il complesso di protrombinasi cliva la protrombina in trombina, quest'ultima converte il fibrinogeno in fibrina per andare a formare il coagulo (Hongbao M. 2008).

Fisiologicamente e biologicamente, come già accennato, ha diversi ruoli ed interagisce con diverse cellule all'interno del corpo umano (Goldsack N.R. 1998) (FENTON1998).

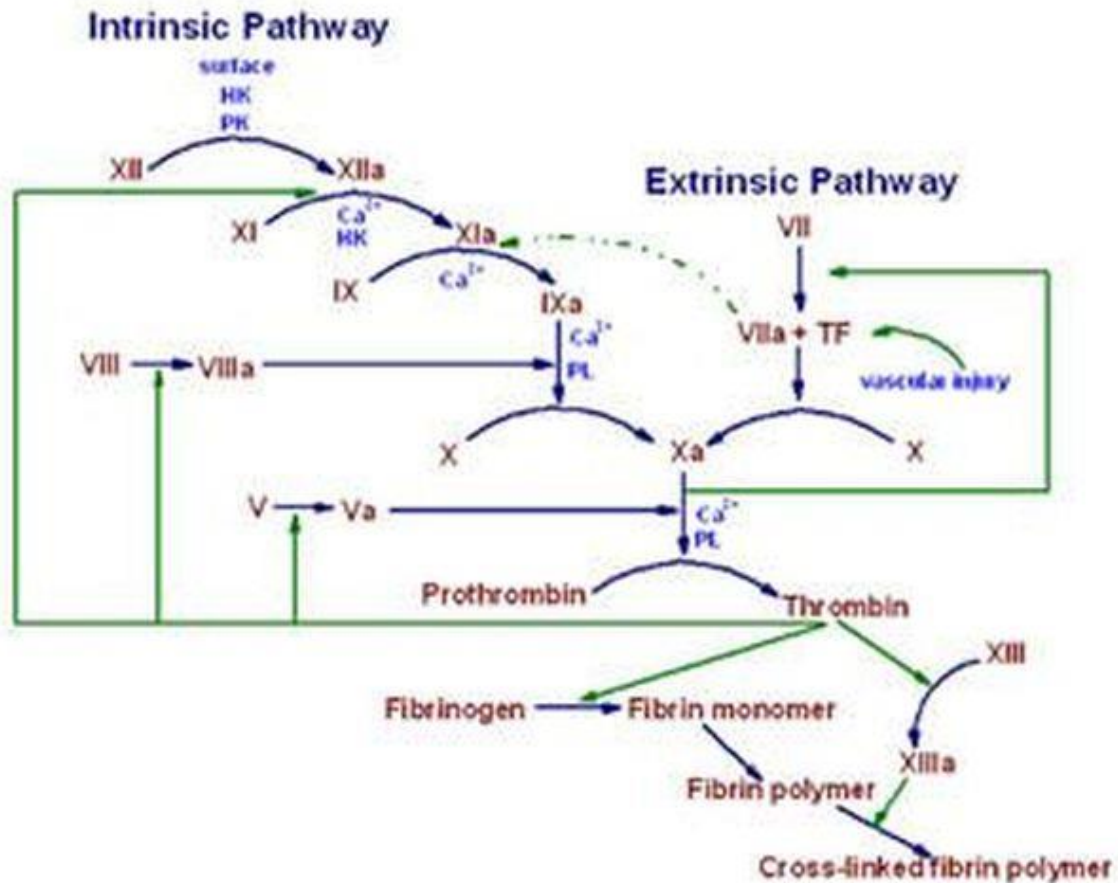


Figura 1. Cascata coagulativa e ruolo della trombina . Sono mostrate la via intrinseca ed estrinseca della coagulazione (frecche blu) e le vie in cui la trombina va a stimolare la produzione di Trombina(verde).

Il ruolo principale che ha la Trombina è nella cascata coagulativa, dove è il mediatore finale (Fig. 1). Dopo che la cascata coagulativa ha inizio, la trombina viene attivata dal Fattore Xa e va a trasformare il fibrinogeno in fibrina, facilitando così la formazione del coagulo. Successivamente la fibrina, in presenza di laminina e fibronectina, proteine della matrice extracellulare, forma il letto provvisorio per la migrazione delle cellule mesenchimali e endoteliali che sono coinvolte nell'angiogenesi (Goldsack N.R. 1998).

L'efficienza della cascata coagulativa dipende dal bilanciamento tra le vie del segnale pro-coagulanti e quelle anticoagulanti. La trombina ha un ruolo di arbitro su questo bilanciamento derivato dal suo ruolo bivalente e ha quindi ricevuto massima attenzione negli studi di struttura e funzione per l'importanza che può avere se considerata per la terapia anticoagulante (Di Cera E. 2008).

Proprio per il ruolo bivalente, oltre a produrre fibrina, ha il ruolo di controllo stimolatorio e inibitorio della coagulazione (Hongbao M. 2008); difatti dopo che la cascata è stata attivata e la fibrina ha iniziato a prodursi, la trombina va a stimolare a monte diversi fattori coagulativi (V, VIII, XI) per facilitare il mantenimento della cascata attiva e per stimolare maggiormente la produzione di Fibrina. I processi stimolatori che la trombina attiva sono differenti e alla base della cascata coagulativa: l'attivazione del FV, che va ad attivare il FX aumentando la produzione di trombina; l'attivazione del FVIII che associato al FIX tagliano e rendono attivo il FX che a sua volta la protrombina in trombina; ed in ultimo l'attivazione del il FXI che stimola l'attivazione diretta del FX con attivazione della Trombina. Questo fa sì che ci sia una up-regolazione della cascata e una produzione maggiore di fibrina, pur partendo da uno stimolo iniziale relativamente piccolo. Il ruolo stimolatorio della trombina non è concluso dall'attivazione della trombina stessa, poiché controlla anche l'inibizione della lisi del coagulo formato e agendo sulle carbossipeptidasi presenti nel sangue, che inattivano il proenzima inibitore della fibrinolisi, che, a sua volta, viene attivato dalla Trombina. L'inattivazione del proenzima fa sì che le parti carbossiterminali della fibrina non siano tagliate e che non ci sia così la degradazione del coagulo appena formato (Hongbao M. 2008).

La trombina ha anche un'azione inibitoria sulla produzione di fibrina e avviene principalmente attraverso il legame con una proteina, la trombosmodulina, che è espressa sulle cellule dell'endotelio vascolare. Questo legame porta all'attivazione della proteina

C, che inattiva i fattori coagulativi FV e FVIII che portano a una diminuzione dell'espressione della trombina e un'inibizione sulla formazione di fibrina, sull'attivazione del FXIII, sulle piastrine e sulle proteine che stimolano la produzione di trombina. Oltre a questo processo inibitorio, la Trombina va a chemioattrarre i neutrofili, che degradano il coagulo di fibrina, e stimola gli inibitori del plasminogeno, che producono plasmina che va a lisare i trombi. Questa è una regolazione rigorosa che mantiene bilanciata l'emostasi e previene emorragia e/o un eccesso coagulativo (Fenton J.W. 1998).

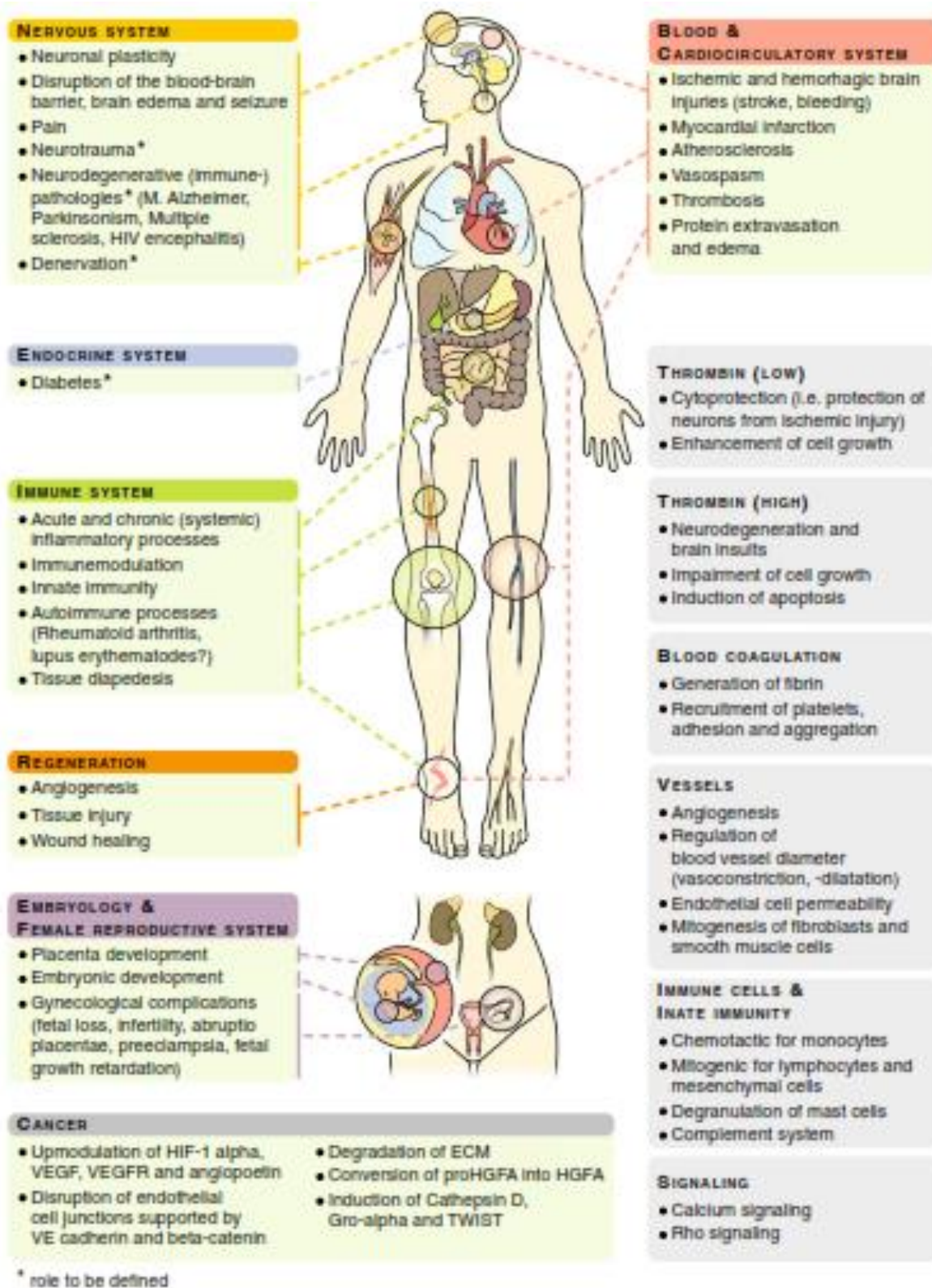


Figura 2. Interazione fisiologica e patologica della trombina all'interno dell'organismo, il suo effetto stimolatorio e le vie del segnale attivate.

Oltre ad avere un'importanza nella coagulazione, la trombina ha effetti stimolatori e inibitori ad ampio spettro su altri tipi cellulari, che vengono spiegati dalla sua attività come serin proteasi.(fig.2); infatti è il più importante agonista per l'attivazione piastrinica, stimola l'aggregazione piastrinica e il rilascio di mediatori attraverso il legame con il recettore attivato dalle proteasi(PAR).Questi mediatori sono il trombossano A2, il fattore piastrinico 4, PDGF, TGF- β e altre chemochine, e questi sono tutti coinvolti nella stimolazione di vie di segnale su altri tipi cellulari. La trombina ha un ruolo centrale anche nell'immunità innata; attivando il recettore PAR che viene espresso da molte cellule che sono coinvolte nel sistema immunitario come i monociti, macrofagi, cellule dendritiche, linfociti e mastociti. Su queste cellule la trombina stimola diverse funzioni implicate nella immunità, come la chemioattrazione per i monociti, la regolazione della produzione di chemochine sui fibroblasti e ha ruolo mitogenico per linfociti e cellule mesenchimali (Danckwardt S. 2013). Nel sistema del complemento la trombina genera direttamente C5a e salta la via classica di attivazione del complemento (Danckwardt S. 2013). La trombina ha un ruolo anche nel riparo tissutale e nel processo infiammatorio acuto e cronico, poiché stimola l'espressione di molecole coinvolte nell'adesione sulla superficie delle cellule endoteliali e aumenta la permeabilità vascolare per lasciar passare leucociti, stimola la proliferazione di fibroblasti, delle cellule epiteliali e delle cellule vascolari muscolari lisce (Goldsack N.R. 1998; Hongbao M. 2008).

Oltre a stimolare fisiologicamente le cellule all'interno dell'organismo, la trombina ha una rilevanza dannosa in diversi sistemi patofisiologici come nell'emostasi, nell'infiammazione, nella proliferazione e nella regolazione vasomotoria. La Trombina, come spiegheremo successivamente, ha anche un ruolo nella progressione tumorale e stimola la proliferazione, la crescita tumorale, la metastasi, l'angiogenesi, e preserva le cellule tumorali dormienti, prevenendo l'eradicazione dall'ospite.

Nei processi infiammatori cronici e acuti la trombina va a stimolare la proliferazione e regola la permeabilità vascolare. Difatti, nell' artrite reumatoide la trombina, attivata dal collagene, ha un duplice ruolo: aumenta l'espressione di PAR-1 nella giuntura infiammata e attiva lo stesso recettore per stimolare l'iperproliferazione sinoviale e la distruzione infiammatoria (Danckwardt S. 2013).

E' stato invece dimostrato che nell' Alzheimer valori elevati di trombina portano a stimolare la retrazione delle cellule neuronali, inibendo la proliferazione, attraverso l'inattivazione di alcune serin proteasi (nessina -1). La trombina, in questa sindrome, va anche a stimolare la produzione della proteina amiloide precursore (APP) che è la causa principale della degenerazione neuronale e si deposita poi nelle cellule neuronali. Sia nell'artrite reumatoide che nell'Alzheimer il processo infiammatorio incontrollato è guidato dalla trombina, principalmente con l'attivazione del recettore PAR e si pensa, che porti ad una degenerazione della malattia cerebrale con danno tissutale neuronale, apoptosi e un'inappropriata proliferazione gliale. Oltre a questo ruolo nocivo la trombina causa la formazione di edema attraverso la regolazione della permeabilità vascolare portando a emorragie intracerebrali, demenza vascolare e perdita di memoria, ma può avere un ruolo neuro-protettivo, specie se presente a basse concentrazioni e con uno stimolo attivatorio di bassa durata, attribuendo così una funzione dicotomica per le diverse concentrazioni (Danckwardt S. 2013).

Nell'arteriosclerosi la trombina ha una funzione cruciale nella patogenesi poiché attiva le piastrine e le vie che promuovono la risposta infiammatoria che fanno proliferare e migrare diversi tipi cellulari, come cellule muscolari lisce e macrofagi; stimola la produzione di citochine; aumenta l'adesione cellulare e aumenta la permeabilità vascolare portando così a stimolare l'avanzamento del processo arteriosclerotico e la formazione della placca (Hongbao M. 2008). Se invece la concentrazione di trombina è ridotta viene

attenuata la formazione della placca aterosclerotica e promuove la sua stabilità. Studi hanno comprovato che l'utilizzo di anticoagulanti diretti inibitori della trombina e o che causano un'inibizione del recettore PAR portano ad una nuova strategia terapeutica interferendo con il ruolo che la trombina ha nell'aterosclerosi e diminuendo così il rischio di morte per problematiche cardiovascolari e eventi ischemici (Morrow D.A. 2012), anche se si è visto che l'utilizzo di farmaci inibitori della trombina causano un rischio moderato e severo di sanguinamento e che la terapia deve essere ottimizzata per interferire con l'iniziazione, progressione e destabilizzazione della placca aterosclerotica.

Si è osservata l'importanza della trombina nello sviluppo embrionale e nell'angiogenesi in studi in vivo su topi. Difatti i risultati su topi knockout in cui la trombina è deficitaria si sono evidenziati come questi topi avessero anomalie coagulative e alta letalità embrionica e neonatale (Sun W.Y. 1998). Una bassa concentrazione di trombina va quindi a stimolare lo sviluppo embrionale normale, mentre valori più alti sono richiesti per il controllo emorragico. In altri studi eseguiti dal gruppo di Zoubine viene dimostrato come la presenza della trombina ad alte concentrazioni è importante per il rimodellamento sinaptico, la denervazione muscolare e lo sviluppo cerebrale, suggerendo che la trombina ha un ruolo nella plasticità neuronale (Zoubine M.N. 1996). Altro ruolo della trombina è il controllo della rigenerazione tissutale andando a stimolare il ciclo cellulare nel luogo della ferita e iniziando il lento procedimento di rigenerazione. Nell'uomo va a stimolare le cellule staminali ematopoietiche e diversi processi differenziativi, come quello delle cellule muscolari lisce e delle cellule progenitrici endoteliali, e può essere sovramodulata in caso di danno alla colonna spinale o altri casi di neurotraumi (Danckwardt S. 2013).

Nella biologia tumorale la trombina ha un ruolo cruciale poiché interagisce con differenti processi associati alla progressione e disseminazione tumorale tra cui:

Proliferaazione cellulare e crescita tumorale

Già negli anni settanta si conosceva il ruolo mitogenico della Trombina per alcuni studi eseguiti su fibroblasti embrionali. In studi più recenti si è visto come la Trombina va a stimolare la proliferazione cellulare attraverso il fattore nucleare kappa β in situazioni fisiologiche(NF- $\kappa\beta$). Lo stimolo proliferativo indotto da Trombina è stato studiato anche in linee tumorali dai gruppi di Snyder e Sayyah dimostrando come la Trombina aumenta la proliferazione cellulare in linee tumorali di glioma e glioblastoma in maniera dose dipendente e che questo stimolo proliferativo veniva bloccato dall'utilizzo di un inibitore della trombina, l'Irudina (Snyder K. M. 2008) o attraverso small interfering RNA coinvolti nella via del segnale della proteina Rho A (Sayyah J 2014). In altre linee si è visto, con differenti metodiche, che la trombina ha effetti differenti sulla proliferazione. In uno studio su linee di tumore prostatico eseguito dal gruppo di Liu, si è visto come le linee immortalizzate di prostata si comportino in maniera differente: La linea immortalizzata PNT1A e LNCaP hanno un aumento iniziale, fino alle 48 ore, con una concentrazione di 1 U/ml di trombina mentre alle 72 ore la proliferazione viene inibita; per la linea DU145 invece le alte concentrazioni di trombina sembrano inibire inizialmente la proliferazione, e dopo la linea riprende a proliferare (Liu J. 2003). Anche in linee cellulari di osteosarcoma, TE85 e 143B, la trombina aumenta la proliferazione (Ichikawa J 2012). Il gruppo di Fujimoto, inoltre ha dimostrato che la trombina, attraverso il recettore PAR-1 stimola la proliferazione nelle linee cellulari MKN29 e MKN45 transfettata con il recettore PAR-1 (Fujimoto D. 2010). Questo avviene attraverso l'attivazione della via del segnale NF- $\kappa\beta$ e l'iniziale fosforilazione del recettore del fattore di crescita epidermiale (EGFR) che viene attivato dalla attivazione del recettore PAR-1 causata dalla trombina (Fujimoto D. 2010).

Questo effetto proliferativo indotto dalla Trombina nelle linee tumorali avviene attraverso il controllo delle proteine che regolano il ciclo cellulare (I. S. Hu L. 2009, Green D. 2010). Difatti alcuni studi di espressione eseguiti sulla linea tumorale LNCaP di diverse proteine del ciclo cellulare hanno dimostrato che la trombina va a downregolare la p27 nel tempo, la quale se espressa è coinvolta nel bloccaggio delle cellule nella fase G0-G1; mentre al contrario le proteine Skp2, ciclina D1 e ciclina A vengono upregolate e accelerano il passaggio alla fase S del ciclo (Massanguè J. 2004)I. S. Hu L. 2009). Questi dati sono stati confermati anche attraverso citofluorimetria con Bromo deossiuridina (BrDU) e Propidio Iodide (PI) con un aumento delle cellule in fase di sintesi nel trattamento con trombina (Green D. 2010)(I. S. Hu L. 2009). Il gruppo di Schiappacassi, conferma l'importanza dell'espressione della proteina inibitoria del ciclo p27 che se viene upregolata all'interno di cellule tumorali, nel loro caso quelle di glioblastoma, induce un arresto del ciclo e dell'invasione locale e della formazione di neovasi indotta dal tumore (Schiappacassi M. 2008).

L' adesione cellulare alla matrice endoteliale e extracellulare

Un' importante avvenimento nella progressione tumorale è l'adesione delle cellule tumorali alle piastrine, alle cellule endoteliali, alla fibronetina e al fattore di von Willebrand. In questo modo le cellule tumorali possono superare il vaso ed entrare in circolo, legandosi così alle piastrine e a vari fattori per essere trasportate lontane dal sito primario del tumore.

Importante è il legame che le cellule tumorali hanno con le cellule endoteliali. Nella circolazione infatti la trombina e altri agenti secreti attivano le cellule endoteliali all'espressione sulla membrana di P-selettina che lega in maniera debole le cellule

tumorali che hanno il recettore che lega il ligando della P-selettina. Questo porta all'attivazione delle piastrine e ad aumentare il legame delle cellule tumorali a P-selettina. Questa aumentata combinazione di piastrine e cellule tumorali sviluppa una produzione di trombina causando l'attivazione delle proteine coinvolte nella coagulazione e portando le cellule tumorali a legarsi fermamente alle piastrine attraverso il recettore piastrinico Integrina $\alpha_{IIb} \beta_3$ e i recettori espressi dalla cellula tumorale come VWF, fibronectina, e

altri ligandi. (Melnikova V.O. 2008). Questo avvenimento è stato anche ben studiato in vivo su topi ed in vitro su linee cellulari tumorali B16F10 e CT26, rispettivamente di melanoma e di colon del topo dal gruppo di Karparkin. Nei risultati ottenuti su questi due tipi tumorali in presenza di trombina, c'è un aumento della loro adesione alle piastrine e a tutti gli altri fattori coinvolti, portando così ad una veloce metastatizzazione e ad una sopravvivenza maggiore delle cellule tumorali nel circolo (Nierodzik M.L. 1998). Ciò accade poichè la trombina attiva sia le piastrine che le cellule tumorali favorendo la loro adesione attraverso la glicoproteina IIb/IIIa (integrina $\alpha_{IIb} \beta_3$), fibronectina, fattore di von

Willebrand e altre proteine di membrana coinvolte nell'adesione, formando così emboli che vanno poi a metastatizzare. In questo modo le cellule tumorali aumentano la loro sopravvivenza in circolo e preservano la dormienza tumorale, (Nierodzik M. L. 2006). Durante l'aggregazione e la formazione di emboli, le piastrine si attivano e rilasciano fattori che stimolano la crescita tumorale, l'angiogenesi, l'invasività cellulare e le metastasi (Nierodzik M. L. 2006).

Studi in vitro su linee cellulari di topo hanno mostrato che la trombina ha nel suo sito attivo una sequenza peptidica di Arg-Gly-Asp (RGD) che viene esposta in presenza di plasmina e cellule che esprimono eparan solfato su membrana (Bar-Shavit R. 1995). Questo perché la trombina può agire come molecola di adesione attraverso l'attivazione

dell'integrina $\alpha_5\beta_3$, promuovendo l'adesione. Si è valutata la progressione tumorale e lo sviluppo di metastasi utilizzando due linee cellulari di melanoma murino che esprimono in maniera differente potenzialità di adesione e colonizzazione in vitro. Negli studi si è visto che la trombina è l'unica che esprime RGD e che ha un ruolo importante progressione e nel distacco delle cellule metastatiche (Bar-Shavit R. 1995).

Il processo di metastatizzazione

L'invasione e la motilità cellulare sono importanti fattori che regolano la malignità del tumore e la facilità che il tumore ha di colonizzare tessuti limitrofi. Di solito l'invasione cellulare avviene attraverso l'attivazione di due specifiche metallo proteinasi (MMP-2 e MMP-9) coinvolte nel riarrangiamento della matrice extracellulare. E' stato dimostrato che la trombina, attraverso il recettore PAR-1, va ad attivare la MMP-9 aumentando il messaggero e l'attività di gelatinasi in una linea di osteosarcoma (Radjabi A.R. 2008). Sempre gli stessi autori dimostrano che la Trombina stimola l'invasività cellulare attivando la via del fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI-3K) e anche le integrine sono importanti ($\beta_1, \alpha v\beta_5$) in questo in questo processo invasivo (Radjabi A.R. 2008)(Yin Y.J. 2003). Difatti la trombina aumenta l'espressione delle integrine sulla membrana cellulare tumorale facilitando così il passaggio della cellula all'esterno del vaso, e, inoltre, attiva le mmp-9. Altri studi eseguiti su cellule tumorali epiteliali ovariche hanno confermato l'over espressione delle mmp-9 e mmp-2 indotta da trombina e l'up-regolazione di E-caderina, N-caderina e vimentina, proteine coinvolte nella transizione epitelio-mesenchimale, che portano le cellule a migrare ed invadere più facilmente. Queste proteine e la presenza di mmps fanno sì che la trombina causi una alterata morfologia cellulare su la linea SKOV3 portandola ad avere un fenotipo simile ad un fuso

ed aumentando così la possibilità di invasione della cellula (Zhong Y.C. 2013). Nello stesso studio si è visto come l'irudina, inibitore della trombina inibisce l'induzione invasiva indotta dalla trombina (Zhong Y.C. 2013).

Per linee endoteliali primarie HUVEC, vengono attivate altre metallo proteinasi come mmp-1 e mmp-2 (Caunt M. 2006). La migrazione e la motilità funziona al meglio se c'è una sostanza che attrae le cellule tumorali, facendo cambiare la conformazione alle cellule. Questo cambiamento di morfologia viene controllata principalmente attraverso le proteine Rho GTPasi; il clivaggio del recettore PAR-1 attiva le RHO GTPasi (Rho A, Rac1, o Rac2), le quali modificano e polimerizzano i filamenti di f-actina contenuti nel citoscheletro che vanno a modificare la colorazione delle cellule e la possibilità di passare attraverso membrana o vaso (Roussos E.T. 2011). Kin e colleghi hanno dimostrato che bloccando le Rho GTPasi veniva inibita la permeabilità vasale causata da VEGF, fattore importante anche per la neoangiogenesi, non facendo più passare le cellule attraverso il vaso (Kim MH 2009).

Un'altra via che viene attivata dalla trombina attraverso il recettore PAR-1 è stata studiata su la linea cellulare SUM149, linea tumorale della mammella. Quando questa linea è stata trattata con trombina e in presenza o assenza dell'inibitore di EGFR, Erlotinib, o dell'inibitore di PAR-1. Gli effetti che questi due inibitori hanno mostrato che la trombina, se bloccati i due recettori, non può attivare la via del segnale fosforilando EGFR che attiva la chinasi p21 attivata. Questo blocca la migrazione cellulare di SUM 149 e la proliferazione indotta da trombina di queste cellule in vitro

L'Angiogenesi correlata con i tumori

La trombina ha un ruolo fondamentale nella neoangiogenesi e la attiva e la regola, ma questo meccanismo è poco conosciuto. Dopo danno tissutale la trombina, attraverso l'attivazione di PAR-1, stimola la rigenerazione e la formazione di neovasi, usando fibroblasti, cellule muscolari lisce e cellule mesenchimali per la formazione fisiologica dei vasi. Nel caso dei tumori l'importanza è stata rivolta sull'espressione di alcune chemiochine, dei fattori di crescita, e proteine coinvolte nella regolazione vascolare come CXCL1, anche chiamata Growth Regulated Oncogene- α (Gro- α), Twist, VEGF e le mmp. Difatti la Trombina va a upregolare sia le mmp che VEGF per la formazione dei vasi. La letteratura dimostra come anche Gro- α , chemiochina con un ruolo oncogenico è implicata nella formazione di neovasi, aumentandone la formazione, e stimola la formazione di metastasi (Caunt M. 2006). Twist, invece, proteina coinvolta nella regolazione della morfogenesi embrionale, nella migrazione cellulare e nella riorganizzazione tissutale, sembra essere espressa in cellule endoteliali e tumorali maligne (R. J. Hu L. 2008), ha un ruolo importante nella formazione di neovasi. In letteratura è dimostrato come Twist venga up-regolata dalla Trombina e che questa maggiore espressione porti ad una maggior invasività, neoangiogenesi e metastatizzazione in diverse linee tumorali in vitro e in vivo (R. J. Hu L. 2008, Yang J. 2004, Chang L.H. 2010)

La colonizzazione delle nicchie metastatiche

L'importanza della protezione delle cellule tumorali per il mantenimento delle stesse in circolo è stata discussa precedentemente attraverso l'utilizzo da parte delle cellule tumorali della dormienza. (Nierodzik M. L. 2006). Si sa che nella colonizzazione del midollo osseo rientrano fattori legati all'angiogenesi (VEGF, PDGF, altri fattori di

crescita e mmp) che vengono rilasciati dall'attivazione piastrinica e dalle cellule tumorali. Questi fattori facilitano l'attaccamento delle cellule tumorali, attraverso p-selettina e varie integrine, l'extravasazione e la formazione di fibrina nel sito di colonizzazione del tumore. Lo dimostra il gruppo di ricerca di Palumbo che spiega come la trombina stimola la formazione di fibrina attivando le piastrine e facilitando l'aggregazione piastrina-tumore. La formazione di fibrina impedisce che cellule natural killer passano eliminare le cellule tumorali dal circolo, facilitando così il trasporto e il mantenimento in circolo del tumore. (Palumbo JS. 2005). In un altro studio condotto nel 2004 dal gruppo di Camerer si è dimostrato l'importanza dello stimolo della trombina sull'attivazione piastrinica e sulla formazione della fibrina stimolando le metastasi ematogene. (Camerer E. 2004). In studi in vivo su modelli murini hanno dimostrato che le cellule tumorali B16 e 3LL, rispettivamente di melanoma e polmone di topo, che sono state iniettate in intravena hanno abilità di generare trombina e aggregare le piastrine componendo degli emboli che possono diventare poi metastasi (Tohgo A. 1986)

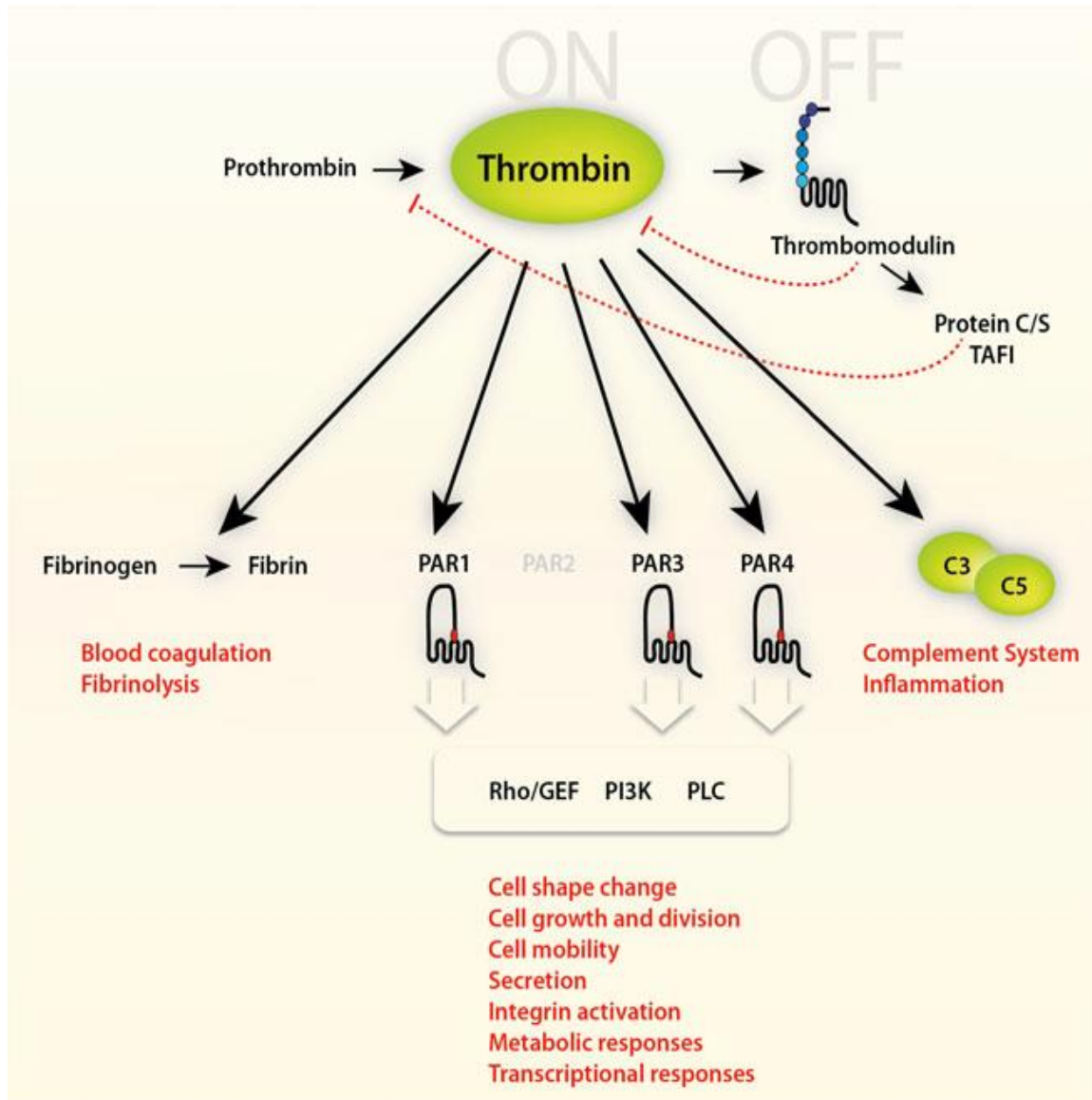


Figura 3. Meccanismi di azione della trombina attraverso i recettori PAR. La trombina attiva, oltre che la coagulazione con la formazione di fibrina e il recettore PAR che va a passare il segnale all'interno della cellula attraverso a proteine-G accoppiate. La trombina è antagonizzata dalla trombomodulina che regola la sua attività e l'espressione nel processo coagulativo.

La maggior parte dei processi fisiologici e patologici che la trombina attiva nell'organismo umano sono trasmessi principalmente alla cellula attraverso il recettore PAR-1 (Fig. 3) che va a attivare le vie del segnale precedentemente citate.

Il recettore PAR-1

Il recettore PAR-1 è un recettore accoppiato alla proteina-G formato da sette catene transmembrana, come la maggior parte dei recettori umani. Fa parte di una famiglia ristretta a 4 recettori, tutti attivati da proteasi, ma solo 3 vengono attivati dalla Trombina. L'unico recettore attivato dalla tripsina o dalla tripsasi è PAR-2, che può anche essere regolato dai fattori coagulativi F VIIa e FXa (Coughlin S.R. 2000). Il recettore PAR-1 viene attivato dalla Trombina clivando la parte N-terminale vicino alla regione SFLLRN facendola esporre in maniera che possa auto stimolarsi al loop numero due, e questo stimolo modifichi la conformazione e permetta così l'accoppiamento delle proteine-G (fig.4) (Coughlin S.R. 2000, Han N. 2011).

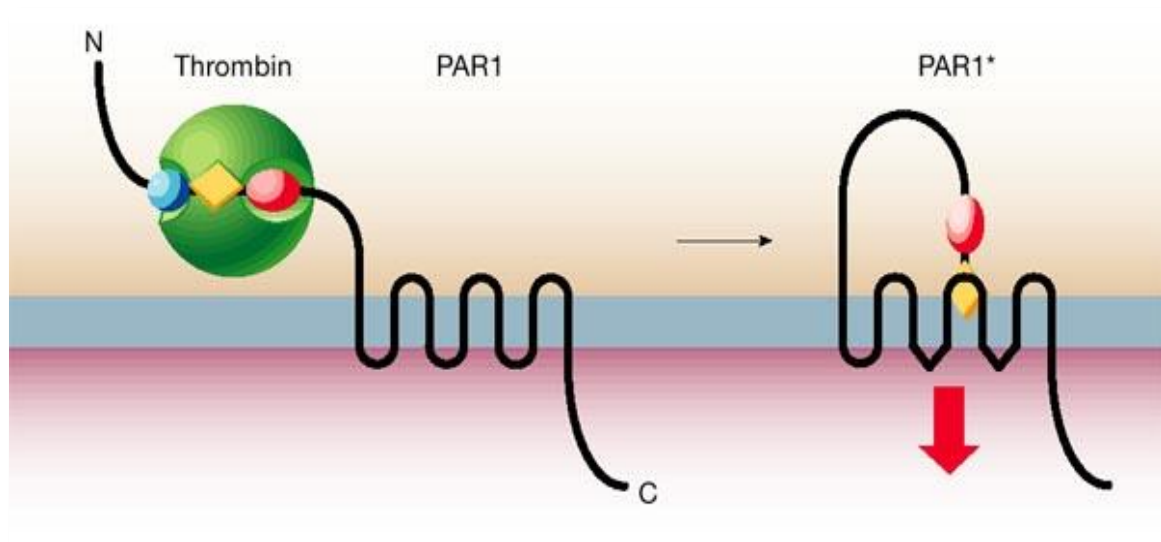


Figura 4. Meccanismo di attivazione del recettore PAR-1. La trombina lega il recettore nella parte N-terminale tra gli amminoacidi Arg41 e Ser42. Questa poi cliva lasciando la regione SFLLRN come parte n-terminale. Particolarità di questi recettori è che la sequenza ligando è sul recettore stesso e va ad attivare il recettore internalizzando l'informazione e attivando le vie del segnale.

Il meccanismo di attivazione del recettore PAR è strettamente controllato; il clivaggio è irreversibile, e il recettore viene rapidamente internalizzato attraverso il meccanismo di fosforilazione dipendente ed, invece di essere riciclato e riportato nuovamente in membrana, viene degradato dai lisosomi (Coughlin S.R. 2000).

PAR-1 viene espresso in numerose cellule del nostro organismo e va a stimolare vie del segnale fisiologiche, ma ha un ruolo importante nella coagulazione, specie per l'attivazione e l'aggregazione piastrinica, per la riparazione della barriera endoteliale, la chemiotassi e l'infiammazione (Macfarlane S.R. 2001). Questo avviene attraverso la fosforilazione delle proteine G accoppiate che vanno ad attivare la fosforilazione di proteine coinvolte in diversi pathway (fig.5).

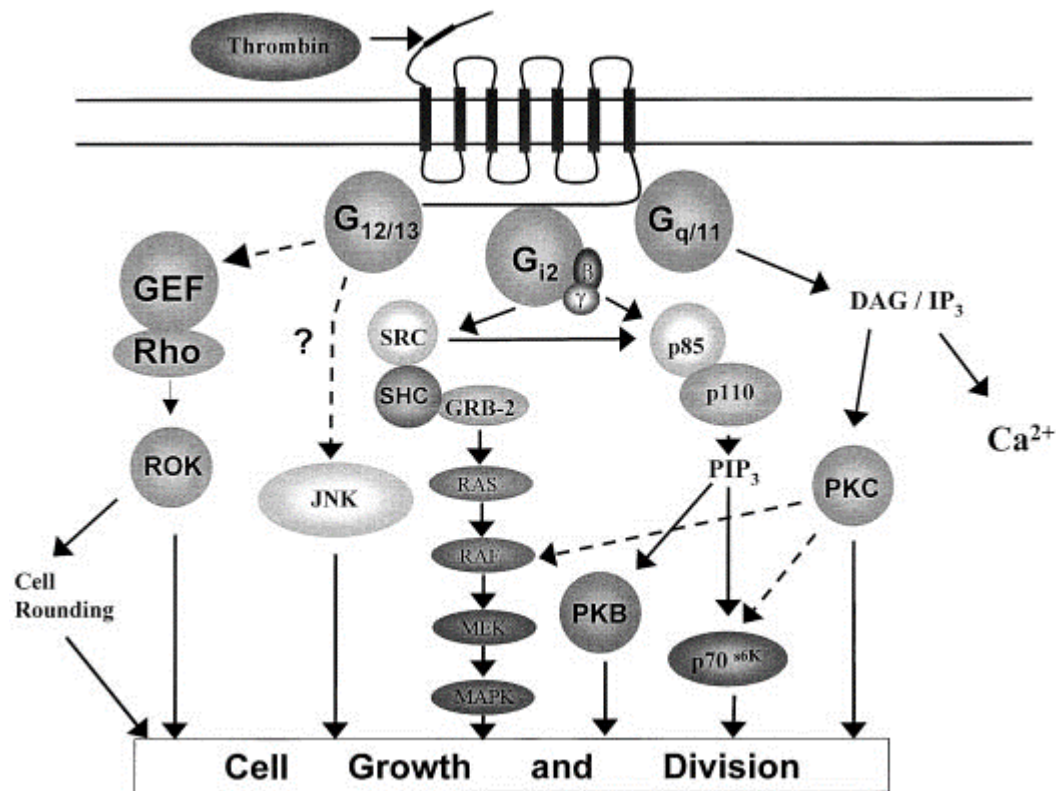


Figura 5. Principali vie del segnale attivate dal recettore PAR-1. Dopo la fosforilazione delle proteine G accoppiate.

PAR-1 viene espresso sulla superficie di molte cellule tumorali ed è coinvolto in problematiche genetiche, come l'anemia refrattaria e la dismegacariocitopoiesi e in problematiche neurologiche. (Macfarlane S.R. 2001) Ha un ruolo patologico nell'infarto al miocardio. Questo recettore viene espresso da cardiomiociti, fibroblasti, cellule muscolari nel cuore, ma un incremento di espressione è stato notato in pazienti che hanno avuto un infarto (Antoinak S. 2011). In più, studi su modelli murini hanno dimostrato un aumento di espressione di PAR-1 dopo lo scompenso cardiaco (Moshal KS 2005). Sempre in studi eseguiti su cellule del cuore in vitro dimostrano come il recettore PAR-1 comanda i flussi di calcio nei cardiomiociti, aumentando la sintesi proteica, la grandezza delle cellule il riarrangiamento del sarcomero e l'espressione di fattori che vanno a

stimolare la crescita ipertrofica (Antoinak S. 2011). Altri studi condotti dal gruppo di Wang dimostrano che PAR-1 ha un ruolo importante anche nelle ischemie cerebrali. Hanno dimostrato che in pazienti adulti con occlusione carotidea o topi deficitari del recettore PAR-1 l'espressione di PAR-1 è aumentata dopo il danno cerebrale. I topi deficitari di Par-1 hanno meno formazione di edema rispetto ai wild type dopo il danno e che questo non induce l'attivazione di chinasi nei topi deficitari, portando a dire che il recettore PAR-1 contribuisce nell'avanzamento dell'ischemia cerebrale attivando anche chinasi mitogeniche (Wang J. 2012).

Ci sono evidenze, in diversi tumori, che l'espressione di PAR-1 porta ad una aggressività maggiore delle cellule tumorali in special modo cellule tumorali di origine epiteliale (Han N. 2011) (Queiroz KC1 2014). Questo è stato dimostrato dai gruppi di Black e Uziely valutando l'espressione del recettore PAR-1 su cellule tumorali pancreatiche e di mammella (Black P.C. 2007) (Uziely B. 2001). In special modo hanno valutato e dimostrato che l'espressione del mRNA di PAR e delle proteine di PAR-1,2 e -4 sono aumentate nella parte tumorale della prostata rispetto all'espressione del tessuto normale e che comparando l'espressione del recettore PAR-1 in tessuti di prostata normale con tessuti di tumore alla prostata si è vista una espressione elevata di PAR sopra espressa sulle cellule tumorali epiteliali (Black P.C. 2007). Questo aumento di espressione dei recettori PAR può essere una fattore predittivo per la ricorrenza tumorale. Invece, il gruppo di Uziely si è concentrato sul tumore alla mammella valutando l'utilizzo del recettore PAR come valore prognostico nel cancro e come questo recettore possa essere usato come target terapeutico. (Uziely B. 2001) Bloccando Par-1 e PAR-2 si vanno a inibire tutti i fattori della progressione tumorale specie l'invasione e la migrazione delle cellule epiteliali.

Nel cancro il recettore PAR-1 va a stimolare la proliferazione (Han N. 2011). Studi in vitro su cellule di carcinoma nasofaringeo (CNE-LMP1) hanno dimostrato come la trombina, attraverso il recettore PAR-1, a basse concentrazioni (0,1 U/ml, 0,5 U/ml) vada a stimolare l'effetto proliferativo delle cellule tumorali in maniera dose dipendente (Zhu Q1 2012). In uno studio eseguito su linee cellulari di adenocarcinoma ai polmoni, l'inibizione del recettore PAR-1 sulla linea cellulare A549 attraverso l'utilizzo di un silencing RNA, ha dimostrato che c'è una diminuzione dell'espressione di mRNA e proteina di PAR-1 porta ad inibizione della crescita e dell'invasione tumorale, bloccando così la progressione della malattia (Wu Z. 2014). L'effetto proliferativo del clivaggio del recettore PAR-1 è anche dimostrato sulle linee cellulari di tumore gastrico MKN29 e MKN45, come già descritto sopra (Fujomoto D. 2010).

Par-1 attiva anche la motilità cellulare, l'invasione e aumenta la potenzialità metastatica della cellula tumorale. (Han N. 2011). Inoltre PAR-1 ha un ruolo nella permeabilità vascolare, l'adesione all'endotelio e alla matrice extracellulare causata dallo stimolo di trombina. In letteratura studi di Zang hanno mostrato, utilizzando colorazioni di immunohistochimica, che in cellule tumorali primarie di prostata si ha un'espressione di PAR-1 e PAR-2, con maggiore espressione del primo recettore sul secondo (Zhang X. 2009). Questi recettori vengono aumentati nello stroma che fa da involucro al tumore sono anche espressi portano. Lo stesso gruppo ha valutato che l'espressione di PAR-1 è up-regolata e over-espressa nelle cellule metastatiche nelle metastasi dell'osso negli stessi pazienti, e che quindi il recettore è coinvolto nel processo metastatico di questo tumore. Sempre su linee cellulari di cancro alla prostata l'espressione e l'attivazione di PAR-1 dalla trombina induce un aumento dell'attività di Rho- A portando ad una riorganizzazione del citoscheletro. In questo modo la trombina promuove l'angiogenesi

attraverso la stimolazione di VEGF e di MMP-2 nelle linee endoteliali vascolari attraverso il recettore PAR-1 (Yuan T.C. 2004).

Anche sul melanoma l'espressione aumentata di PAR-1 porta ad una maggior aggressività e facilità di metastatizzare, attraverso però un'altra via del segnale attivata da connessina 43 che è coinvolta nell'adesione alle cellule endoteliali (Villares G.J. 2009).

Chang e colleghi, invece, hanno dimostrato come la trombina attraverso PAR-1 potesse regolare la motilità aumentando l'espressione di Twist, che può indurre la transizione dell'epitelio mesenchimale, e aumentare le metastasi tumorali nel tumore colon retto. Questo avviene attivando PAR-1 che induce l'espressione di Hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α), che va ad aumentare l'espressione del mRNA di Twist e il suo livello proteico, andando a up-regolare anche proteine coinvolte nell'adesione cellulare, come N-caderina, proteina coinvolta nell'adesione (Chang L.H. 2010). La transizione epitelio-mesenchimale è importante per la morfogenesi e lo sviluppo del tumore e twist è strettamente legato a questo processo che può facilitare il passaggio delle cellule al sistema circolatorio e facilitare il trasporto. L'espressione di twist, infatti, inibisce l'espressione della proteina E-caderina che è inversamente correlata con il grado e lo stadio del tumore, più è espressa e meno legami cellula- cellula vengono spezzati danno così la facilità alla cellula di extravasare (Kang Y. 2004).

Anche in pazienti con carcinoma esofageo è stata valutata l'espressione di PAR-1 e in parallelo con quella delle MMP-1 paragonandola con il tessuto normale con immunohistochimica di tumori primari (Peng H.H. 2012). L'aumentata espressione di MMP-1 e PAR-1 rispetto al tessuto normale in questo tipo di tumore ha dimostrato che i pazienti hanno una prognosi peggiore, aumentando anche la facilità di avere metastasi che coinvolgono i linfonodi limitrofi, e che questa duplice espressione possa essere di

riferimento per predire la prognosi del paziente e la possibile resezione curativa (Peng H.H. 2012). Gonzales et al ha valutato l'effetto della trombina sul recettore PAR-1 per la permeabilità vascolare nell'infiammazione respiratoria. Ha il gruppo ha visto come in tessuto infiammato la presenza di trombina attiva il recettore PAR-1 stimolando le proteine Rho-a che alzano il livello di calcio intracellulare e causano un riarrangiamento del citoscheletro aumentando così la permeabilità vascolare. I loro studi hanno confermato come basse dosi di LMWH inibiscono queste effetto indotto da eparina nelle cellule epiteliali polmonarie di riarrangiamento del citoscheletro (Gonzales J.N. 2014)

In altri studi hanno dimostrato come l'attivazione in cellule aggressive di carcinoma della MMP-1 e di PAR-1 porta ad aumentare la disseminazione di metastasi e l'intravasione. Bloccando l'attività o la produzione di MMP-1 si diminuisce la permeabilità vascolare, intravasione e la formazione di metastasi e diminuisce anche l'espressione di PAR-1 su l'endotelio (Juncker Jensen A. 2013)

L'inibizione del recettore PAR avviene attraverso antagonisti del recettore o pepducina. Quest' ultima è un peptide derivato dal terzo loop intracellulare di PAR-1 e PAR-4 e va a disturbare il passaggio del segnale tra il recettore e la proteina G specifica. La pepducina di PAR-4, Papal10, inibisce il segnale intracellulare nelle piastrine (Antoinak S. 2011).

Al momento non ci sono farmaci utili per bloccare questo recettore, anche se può essere considerato un buon target terapeutico (Morrow D.A. 2012). In letteratura, sono stati studiati altri farmaci anticoagulanti che possono bloccare l'effetto catalitico della trombina. Tra questi l'eparina a basso peso molecolare che ha dimostrato avere effetto sull'inibizione della progressione tumorale sia in vitro che in vivo (Balzarotti M. 2006, Niers T.M.H. 2009, Ichikawa J 2012). Altri autori hanno testato l'effetto del wafarina, ma non si sono avuti effetti simili all'eparina di basso peso molecolare (LMWH). Il gruppo di

ricerca di Stevenson difatti ha dimostrato una diminuzione del legame tra cellula tumorale e cellule/endoteliale piastrina che è mediato da p-selectina (Stevenson J.L. 2005). Nel caso però dell'utilizzo di LMWH l'effetto anticoagulante non è diretto sulla trombina, ma inibisce l'attività del FXa e quindi l'attivazione della trombina successiva, anche se in maniera minore. Invece nel gruppo di Ichikawa, che hanno studiato l'effetto del LMWH su l'osteosarcoma in vitro e in vivo. (Ichikawa J 2012), ha dimostrato che le stesse cellule di osteosarcoma attivano fattori procoagulanti in un meccanismo autocrino che facilita e promuove la crescita tumorale. La formazione di trombina, in questo studio facilita la formazione di trombi e può contribuire alla morbilità della malattia causando trombosi. LMWH va a ridurre in vitro la proliferazione delle cellule di osteosarcoma come la crescita del tumore in vivo (Ichikawa J 2012).

Dabigatran

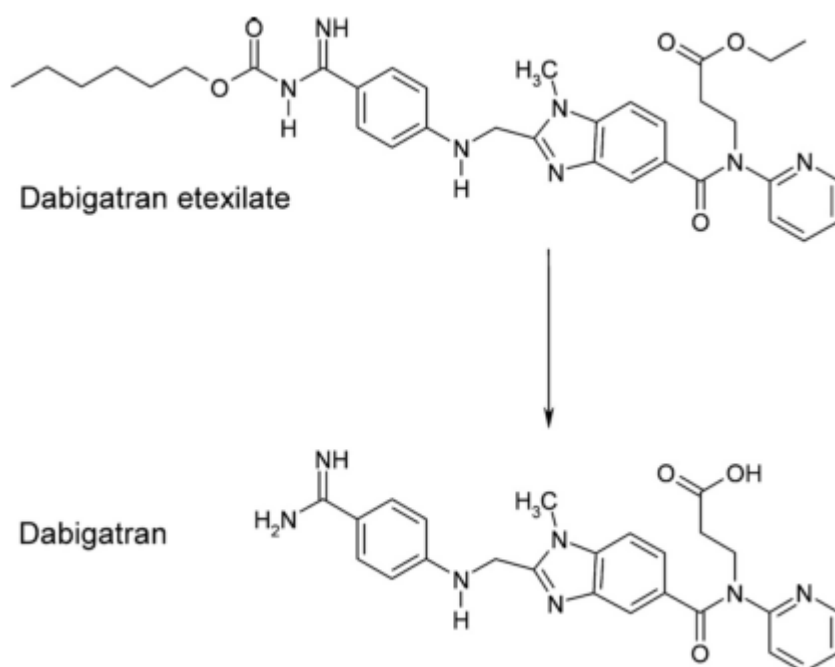


Figura 6. Rappresentazione molecolare e idrolisi metabolica del profarmaco dabigatran etexilate in dabigatran. Questa idrolisi avviene attraverso esterasi presenti in circolo e serve per attivare la funzione anticoagulante in circolo.

Il Dabigatran etexilate (Boehringer Ingelheim) (β alanine, $N - \left[\left[2 - \left[\left[4 - (aminoiminomethyl) phenyl \right] amino \right] methyl \right] 1 - methyl - 1H - benzimidazol - 5 - yl \right] carbonyl \right] - N - 2 pyridinyl -$,

ethyl ester. methanesulfonate) è un pro-farmaco orale già utilizzato in clinica come anticoagulante di nuova generazione (Ebner T. 2010, Soff G.A. 2012) ed è stato già approvato dalla food and drugs administrations (FDA) e dalla European Medicines Agency per l'utilizzo in clinica (Dahl O.E. 2012), Questa molecola dovrebbe sostituire il warfarin nella prevenzione delle trombosi nei pazienti ortopedici per la sostituzione di anca o ginocchio, in pazienti con complicanze di fibrillazione atriale, per tromboembolismi venosi e nella sindrome coronarica acuta (Dahl O.E. 2012, Soff G.A. 2012). Il pro- farmaco dabigatran, ha una bassa biodisponibilità e l'assorbimento è variabile dalla presenza di uno stato acido. Viene assorbito dallo stomaco e intestino tenue, poi catalizzato da esterasi presenti negli enterociti, plasma e fegato attraverso un idrolisi, trasformando così il pro- farmaco in dabigatran (Fig.6) (Brighton T. 2010). Quando viene trasformato il dabigatran ha interazioni limitate con altri farmaci, principalmente interagisce con gli inibitori delle p-glicoproteine, e non coinvolge nella biotrasformazione il citocromo P450 (Lee C.J. 2011, Gerotziafas G.T. 2014). Le reazioni avverse più comuni sono dispepsia e sintomi simili alla gastrite (Gerotziafas G.T. 2014).

Ha un'emivita di circa 12-14 ore, ma l'effetto anticoagulante dura fino a circa 24-36 ore dalla somministrazione. Viene eliminato dai reni (per un 80%) e il rimanente è escreto dal sistema biliare (il rimanente 20%).

Il dabigatran è un farmaco a basso peso molecolare (472 Da) e ha, come già detto, attività anticoagulanti con poche interazioni con altri farmaci. Difatti è un inibitore competitivo reversibile della trombina. Agisce sulla trombina legandosi al sito catalitico e modificando la conformazione del sito in cui il recettore viene riconosciuto (Fig.7), e in questo modo inibisce la produzione della fibrina indotta dalla Trombina e l'auto stimolazione controllando le vie di attivazione attraverso il fattore V e VIII. Oltre a ciò inibisce l'attivazione delle piastrine, bloccando l'attività anticoagulante attraverso l'inattivazione della proteina C (Brighton T. 2010).

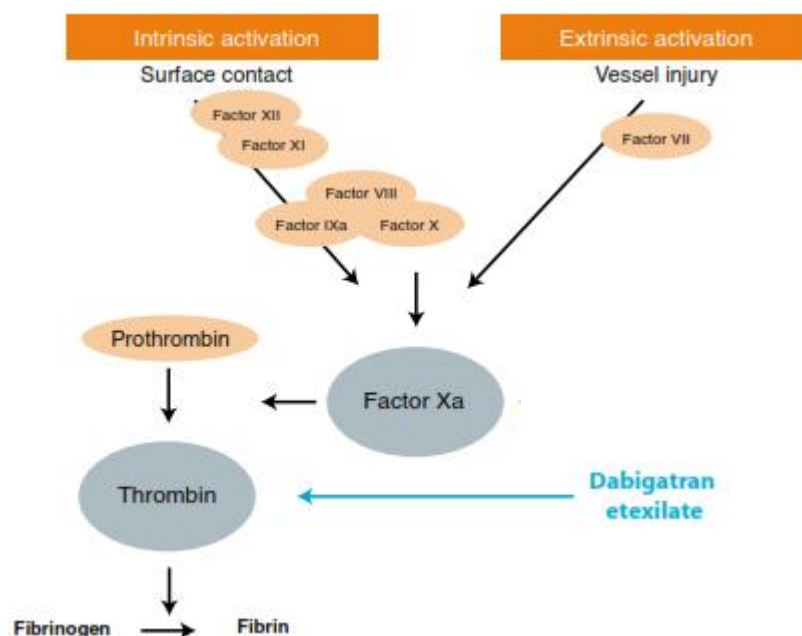


Figura 7. Schema del sito di azione del dabigatran nell'emostasi.

La molecola è stata quindi studiata primariamente per bloccare la formazione di trombi, sia arteriosi che venosi e infarti embolici. Si è visto però, che l'iterazione principale del

dabigatran con la trombina potesse essere utilizzata per studi su pazienti con cancro e VTE per poter inibire alcuni effetti che la trombina ha su la progressione tumorale. In letteratura esistono pochi dati sull'effetto che il dabigatran può avere sulle cellule neoplastiche. Dati già pubblicati dal gruppo di De Feo suggeriscono che l'uso di questo anticoagulante orale diminuisce, nella linee tumorali MDA-MB-231 e 4T1, invasività e metastasi in tumori maligni alla mammella sia in vitro che in vivo (DeFeo K. 2004). Trial clinici, in pazienti con ricorrenti VTE e morte correlata a i tromboembolismi, hanno dimostrato che l'effetto è simile e non inferiore con quello ottenuto con warfarin (2,4 e 2,2 con dabigatran e wafarin) (Lee C.J. 2011, Gerotziapas G.T. 2014). In questo studio, sono stati inclusi anche pazienti tumorali (il 5 % del totale), ma non sono riportate informazioni sull'effetto che il dabigatran potesse avere sulla progressione tumorale (Gerotziapas G.T. 2014). I trial su questo farmaco hanno portato ad avere un'esperienza di 25000 pazienti annui per dimostrare l'efficacia e la sicurezza del dabigatran per la prevenzione di tromboembolismi venosi ed arteriosi. I risultati ottenuti nella chirurgia ortopedica mostrano un'efficacia comparabile simile al valore ottenuto con enoxeparina e che quindi il dabigatran può essere utilizzato fin dal 2008 nella pratica clinica (Dahl O.E. 2012). I risultati del trial RE-COVER e RE-LY hanno mostrato che il dabigatran ha un'efficacia simile al wafarin nella prevenzione di VTE e che ad una concentrazione di 150 mg due volte al giorno riducono il valore di sanguinamento e riducono la possibilità di avere emorragie intracraniche in comparazione con wafarin per la prevenzione a lungo termine di infarti in pazienti con fibrillazione atriale. Il dabigatran sembra avere diversi vantaggi rispetto al wafarin, difatti non ha interazioni con il cibo e con la maggior parte di altri farmaci e può essere utilizzato per l'amministrazione per lunghi periodi senza avere bisogni di monitoraggi regolari di anticoagulazione. Quindi questo farmaco ha portato a migliorare la prevenzione e il trattamento di VTE e la prevenzione degli infarti nei

pazienti con fibrillazione atriale. Altri Trial e studi sono in corso proprio per la valutazione dell'utilizzo in pazienti con tumore dei nuovi anticoagulanti orali e l'utilizzo di questi in pazienti con cancro e tromboembolismi venosi (Short N.J. 2014).

OBIETTIVI GENERALI

Negli ultimi 200 anni, si è dimostrata la stretta correlazione tra coagulazione e cancro e l'importanza di problematiche coagulative, come tromboembolismi venosi, VTE e embolismi polmonari, in pazienti oncologici. Ciò accade per lo stimolo di diversi fattori coagulativi che sono coinvolti nella progressione tumorale come: il fattore tissutale, le piastrine e la trombina. La trombina è una serin proteasi che ha un ruolo sia fisiologico che patologico. Questa va a stimolare, principalmente attraverso la famiglia di recettori PAR, diverse vie del segnale coinvolte nell'organismo tra cui proliferazione, rigenerazione tissutale, chemiotassi e la neoangiogenesi. Il più importante recettore attivato dalla trombina è PAR-1 che viene espresso fisiologicamente su piastrine, cellule neuronali, cellule muscolari, fibroblasti, monociti, macrofagi e linfociti, e patologicamente su cellule tumorali dove può indicare, a seconda della presenza e della sua quantità, il grado di aggressività del tumore. Questo recettore di membrana viene clivato, in maniera irreversibile, e attiva determinate vie di segnale sia fisiologiche che patologiche. In letteratura è stato dimostrato, attraverso l'utilizzo di farmaci anticoagulanti come l'irudina o l'eparina a basso peso molecolare, che la progressione tumorale può essere bloccata inibendo la trombina. Il dabigatran è un anticoagulante di nuova generazione approvato dalla FDA per l'uso clinico in fibrillazione atriale e tromboembolismo venoso. Questo farmaco va ad interagire con la trombina in maniera competitiva e reversibile sequestrandola dal circolo e modificando il sito catalitico che cliva PAR-1, facendo sì che non siano attivate le vie del segnale coinvolte in proliferazione, migrazione, angiogenesi e permeabilizzazione degli endoteli.

Lo scopo dello studio è quello di valutare come il dabigatran si comporta nella progressione tumorale e crescita indotta dalla trombina. In particolare si è voluto verificare:

- 1- Il ruolo del dabigatran nella proliferazione indotta dalla trombina studiando il ciclo cellulare e l'espressione di alcune cicline coinvolte nella regolazione delle varie fasi del ciclo cellulare (p27 e ciclina D1) in cellule tumorali;
- 2- Il ruolo del dabigatran nella neoangiogenesi indotta dalla trombina: In questo caso lo studio si concentra su due proteine coinvolte nella neoangiogenesi, Twist e Gro- α , che sono coinvolte anche nella migrazione cellulare.

MATERIALI E METODI

Linee cellulari, colture e trattamenti

Sono state utilizzate le linee cellulari immortalizzate MCF-7 (carcinoma alla mammella) e U87-MG (Glioblastoma), gentilmente donate dal Prof. Rosato e dal Prof. Basso, e la linea cellulare endoteliale primaria derivante dal cordone ombelicale umano, HUVEC (PromoCell PBI). La linea U87-MG è stata coltivata in DMEM (a bassa concentrazione di glucosio) + 10% Fetal Bovine Serum (FBS) + 1% di penicillina/streptomicina 100X + 1% di L-glutamina 100X 200 nM (tutti Euroclone). La linea MCF-7 è stata coltivata nello stesso terreno della linea precedente a cui però è stato aggiunto 1% HEPES (Sigma Aldrich). Il terreno di crescita utilizzato per le cellule HUVEC è Endothelial cell growth Basal Medium (EBM-2) (PromoCell, PBI) + 10% FBS, 1% di penicilina/Streptomicina al 100X, 0,02 ml/ml Fetal calf serum (FCS), 5 ng/ml di Epidermal Growth Factor (EGF), 0,2 ug/ml Hydrocortisone (HC), 0,5 ng/ml di Vascular endothelial growth Factor (VEGF), 10 ng/ml di Basic Fibroblast Growth Factor (BFGF), 20ng/ml Insulin Growth Factor (R3IGF), 1ug/ml Acido ascorbico (AA) e 22,5 ug/ml Eparina (HEP). Le linee cellulari sono state mantenute in incubatore a 37° con concentrazione di CO₂ al 5%. Il terreno di coltura è cambiato ogni due giorni.

Durante la procedura sperimentale sono stati utilizzati terreni depletati di fattori di crescita (starving medium) ed è stato aggiunto al medium di base lo 0,5% di FBS. La durata della starvazione varia tra le diverse linee cellulari (MCF-7 72 ore, U87-MG 12 /24 ore, HUVEC 4/12 ore).

Gli esperimenti sono stati eseguiti con concentrazioni crescenti di Dabigatran (Boerhing) (50nM, 100nM, 500nM e 1000nM) e di Trombina (Sigma Aldrich) (0,1 e 0,5 U/ml).

Il dabigatran (PM 471,52) è stato disciolto in 950 µl di DMSO e 50 µl di HCl 1M con pH finale della soluzione tra 4-6 per ottenere la soluzione di stock con concentrazione di 10

mM che è stata aliquotata e congelata a -20° C fino all'utilizzo, dove viene successivamente diluita in terreno per le concentrazioni già citate.

La trombina, invece, viene disciolta in 1 ml acqua filtrata e bidistillata per ottenere la soluzione iniziale di 10 U/ml, successivamente viene diluita in terreno alla concentrazione richiesta.

Valutazione dell'espressione del recettore PAR-1 con citofluorimetria nelle 2 linee cellulari tumorali umane:

Le cellule sono lasciate crescere in coltura, staccate con tripsina e, una volta risospese in un volume minimo di PBS (circa 50µl), le cellule sono state fissate con alcol etilico assoluto freddo ed incubate per 15 minuti in ghiaccio. Dopo il lavaggio con PBS-1% BSA le cellule sono state incubate con l'anticorpo primario contro PAR-1 per 1 ora a temperatura ambiente. Sono state successivamente incubate per 30 minuti con l'anticorpo secondario FITC- anti mouse al buio a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio in PBS e la successiva risospensione le cellule sono state acquisite con un citometro FC500 (Beckton Dickinson). Per l'analisi è stato utilizzato il software Kaluza.

Gli anticorpi e le concentrazioni utilizzate per la rilevazione del recettore sono:

-PAR-1 (ATAP SantaCruz) 1:100

-II FITC-antimouse (Sigma-Aldrich) 1:100

Valutazione della proliferazione e vitalità cellulare con metodica MTS:

Dopo aver starvato le diverse linee cellulari, sono state contate attraverso colorazione tripan blu e conta manuale con camera di burker e seminate ad una concentrazione di $1 * 10^4$ cellule per pozzetto in una piastra da 96. Dopo trattamento con dabigatran e/o trombina, a diverse concentrazioni (vedi sopra), le cellule sono, ai diversi tempi di incubazione, state valutate per la proliferazione cellulare (0, 3, 6, 12, 24, 36, 48 ore) utilizzando il kit Cell titer 96 AQueous One solution Cell Proliferation assay (MTS, Promega) come indicato dal produttore. Questo kit colorimetrico va a valutare, attraverso la bio-riduzione del composto di tetrazolium in formazan che viene causata dall'enzima metabolico NADH deidrogenasi presente nei mitocondri, l'attivazione del metabolismo della cellula. Dopo l'incubazione di 20 μ l di MTS nei vari pozzetti per 2 ore a 37° C, viene valutata l'assorbanza usando il lettore di micro-piastre Victor 2 (Perkin Elmer). Sono stati eseguiti 3 esperimenti ed ogni esperimento è stato svolto in duplicato, per ogni esperimento viene fatta la media dei pozzetti a cui viene sottratto il valore di assorbanza del pozzetto incubato con MTS e terreno di coltura.

Valutazione dello stato di apoptosi delle linee cellulari con FACS per Propidio Iodide e Annexina V

Per la valutazione dell'apoptosi, le cellule U87-MG sono state starvate per 24 ore, e trattate successivamente per altre 24 ore con i vari trattamenti di cui sopra. Le cellule poi sono state staccate e incubate con annessina V (1mg/ml, Sigma aldrich) e Propidio Iodide (PI)(1 mg/ml, Sigma Aldrich). Dopo un incubazione a temperatura ambiente per un'ora al buio, le cellule sono state acquisite al citofluorimetro (FC500, Beckton Dickinson) e

analizzate con il software kaluza. Sono stati eseguiti due esperimenti con la lettura di 100000 cellule a trattamento.

Valutazione del ciclo cellulare con citofluorimetria con propidio iodide e bromo deossiuridina (BrdU)

Le diverse linee cellulari sono state starvate per i tempi sopra indicati e trattate per 24 ore con i differenti trattamenti di dabigatran e trombina. 30 minuti prima dello scadere dell'incubazione con il farmaco e la trombina è stata aggiunta BrdU al terreno ad una concentrazione di 10 uM (Upstate, Millipore). Le cellule sono state quindi fissate con etanolo freddo per almeno 12 ore a -20°C., quindi il DNA è stato denaturato utilizzando HCl 2M con 0,5% Triton con un incubazione di 30 minuti, vengono poi lavate con PBS e neutralizzate con sodio tetraborato ($Na_2B_4O_7$) per 2 minuti. Dopo il lavaggio con PBS, l'anticorpo anti-BrdU (LifeSpan Bioscience, 1:50) è stato incubato per 30 minuti a temperatura ambiente in una soluzione di PBS 1X + 0,5% Tween, 1% BSA e 10 mg/ml di RNasi (Sigma-Aldrich). Successivamente le cellule sono state incubate lavate con PBS ed per 1 ora al buio a 4° con un secondario FITC anti-mouse (Sigma Aldrich, 1:100). Le cellule vengono lavate con PBS ed incubate con PI (20 µg/ml, Sigma-Aldrich) per 30 minuti al buio a temperatura ambiente. L'acquisizione è stata eseguita con il citometro FC 500 (Becton Dickinson), e la valutazione analitica, invece, è stata eseguita con il software Kaluza. Sono stati eseguiti due esperimenti con la lettura di 50000 eventi per ogni trattamento.

Valutazione dell'espressione delle proteine coinvolte nel ciclo cellulare e nell'angiogenesi con western blot

Per valutare l'espressione proteica delle proteine coinvolte nel ciclo cellulare e nell'angiogenesi è stata utilizzata la metodica del western blot (WB). Brevemente, dopo aver starvato e trattato le diverse linee cellulari con i vari trattamenti, queste sono state lisate per l'estrazione proteica usando il CellLytic B Cell Lysis reagent (Sigma-Aldrich) in cui è stato aggiunto un inibitore di proteasi alla concentrazione di 1:100 (Sigma-Aldrich) seguendo il protocollo consigliato dalla ditta. Brevemente: la soluzione lisante con l'inibitore di proteasi viene aggiunto al pozzetto per 15 minuti su agitatore a temperatura di 4° C dopo questa incubazione il lisato viene trasferito cercando di portare via tutta la soluzione, all'interno di eppendorf e incubato nuovamente a 4° C per 30 minuti in agitazione, viene successivamente eseguita una centrifuga a 13000 g a 4° C per eliminare la parte lipidica della membrana cellulare. La concentrazione proteica è stata valutata con metodica Bradford (Sigma-Aldrich) utilizzando il lettore di piastre (Biorad). Sono stati diluiti 25ug di proteina in un volume finale di 30ul con Laemmli buffer. Il preparato è stato fatto cuocere per 7 minuti a 105° C e fatto correre in gel Criterion Precast 10-20% Tris HCl (Biorad) per 45 minuti a 200 V e 120 mA. Le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (GE Healthcare) utilizzando un transfert di 2 ore a 70 V e 350 mA. Dopo la corsa si è verificato il trasferimento su membrana con la colorazione di Ponceau, viene eseguito il bloccaggio dei siti aspecifici per 1 ora in una soluzione di TBS + 0,5% Tween e 5% di latte, e successivamente la membrana è stata incubata overnight (ON) a 4°C con un anticorpo primario. È stata lavata con TBS 0,5% Tween, incubata 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario adatto, rilavata per 3 volte con TBS+ 0,5% Tween quindi è stata sviluppata su pellicola fotografica (GE healthcare) usando il substrato chemiluminescente ECL (Lumiglo,KPL).

La lista degli anticorpi primari e secondari utilizzati:

Ciclina D1 (SantaCruz):	1:1000
p27 (SantaCruz)	1:1000
GAPDH (SantaCruz)	1:1000
Tubulina (Sigma)	1:2000
Gro- α (Abcam):	1:1000
Twist (SantaCruz):	1:1000
II° HRP anti-mouse (Sigma-Aldrich):	1:5000
II° HRP anti-rabbit (Sigma-Aldrich):	1:10000

Valutazione dell'espressione di geni coinvolti nell'angiogenesi attraverso metodica realtime PCR

L'espressione dei geni Twist e Gro- α è stata valutata tramite real time PCR con Sybr Green (Invitrogen, life technology). Dopo che le cellule sono state starvate e trattate per i diversi tempi, RNA viene estratto con Trizol(Invitrogen,Life Technology). Brevemente, dopo aver eliminato e lavato con PBS il pozzetto dal terreno, è stato aggiunto 1ml Trizol e successivamente, ottenuto un omogenato di cellule e Trizol, raccolto in eppendorff da 1,5 ml, aggiunto cloroformio e centrifugato a 12000 giri per 15 minuti a 4° C. Viene poi recuperata la parte acquosa soprastante e incubata con isopropanolo per 10 minuti a 4° C e viene eseguita una centrifuga per 10 minuti a 12000 G alla temperatura di 4° C. Il pellet ottenuto da questa centrifuga viene lavato con etanolo al 75%, centrifugato per 5 minuti a

7500 G a 4° C, viene risospeso in un volume di acqua RNAsi FREE (senza la presenza di enzimi che possono degradare RNA). Prima della quantificazione l'RNA ottenuto viene purificato utilizzando le colonnine PureLink RNA mini Kit (Invitrogen, Lifetecnology), come consigliato dalla ditta, e quantificato con Qubit. Successivamente 1 µg di RNA è stato retro trascritto usando SUPERSCRIPT VILO come consigliato dalla ditta usando il termo ciclatore GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystem). Diluito il cDNA alla concentrazione di 5 ng/µl, è stato quindi amplificato con il protocollo del Sybr Green utilizzando per termociclature ABI PRISM 2600 (Applied Biosystem). Gli esperimenti sono stati eseguiti in duplicato con una numerosità di 3 e l'analisi dei dati è stata eseguita con il software SDS 2.4(Applied Biosystem).

I primers utilizzati sono:

β-Actina(housekeeping)

Primer Forward: 5' GGGACGACATGGAGAAAATCTG 3'

Primer Reverse: 5' CACGCAGCTCATTGTAGAAGGT 3'

Gro-α:

Primer Forward: 5'TTCACCCCAAGAACATCCAAAG 3'

Primer Reverse: 5'CAAACACATTAGGCACAATCCAGG 3'

Twist:

Primer Forward: 5' GGAGTCCGCAGTCTTACGAG3'

Primer Reverse: 5' TCTGGAGGACCTGGTAGAGG3'

Valutazione delle chemiotassi con camera di Boyden

Dopo il periodo di starving stabilito per le varie linee cellulare, le cellule sono state staccate dalla plastica, contaminate ad un numero di $5 * 10^4$ con la camera di burker e sono state seminate all'interno della camera di Boyden in terreno depleto di fattori di crescita, mentre i terreni trattati con i chemioattrattanti sono stati inseriti nella camera di contenimento, come mostrato in Fig.8. Passata l'incubazione di 4 ore a $37^{\circ} C$ con CO_2 costante, i filtrini sono stati rimossi dal terreno e la parte soprastante alla camera è stata pulita con un cottonfioc per rimuovere le cellule che non hanno passato il filtro. Le cellule passate, sono state fissate in metanolo per 5 minuti a temperatura ambiente, quindi è stata colorata con 0,05 % di cristal violetto (Sigma-Aldrich) diluito in soluzione acquosa con il 20% di Metanolo per 5 minuti e lavato con PBS ed acqua. Questo passaggio serve a rimuovere i cristalli che si formano con i sali della soluzione salina e il cristal violetto per evitare falsi positivi. Il filtro è stato ritagliato dal supporto e montato su un vetrino con Eukitt (Bio-Optica). Sono state quindi scattate 10 foto casuali del filtro con microscopio ottico ad un ingrandimento al 10X (Leica). Le foto sono analizzate attraverso la conta manuale usando il programma ImageJ . I risultati mostrati sono la media delle cellule presenti per campo per ogni esperimento. Sono stati eseguiti 3 esperimenti per ogni linea cellulare e nella linea endoteliale i passaggi utilizzati sono stati il 2, 3, 4.

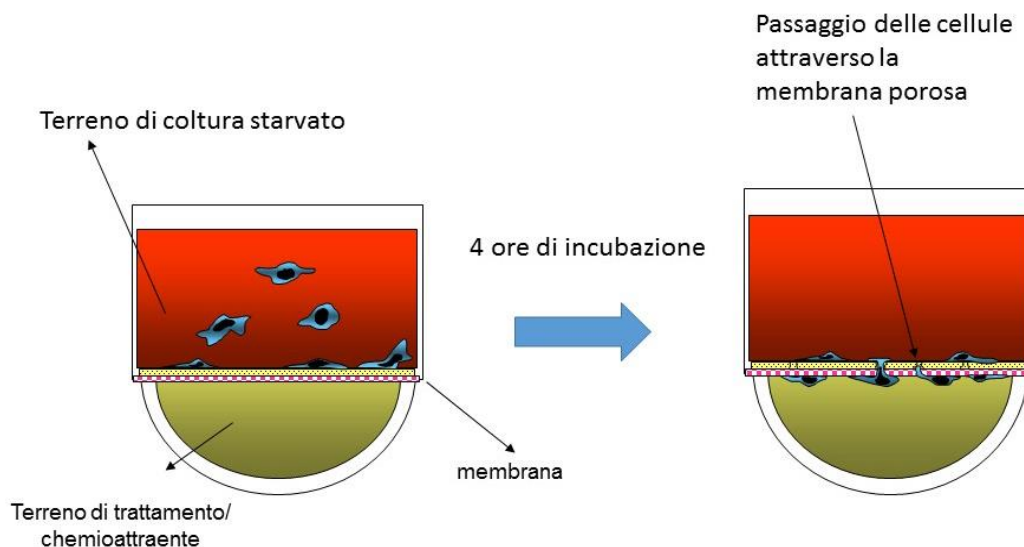


Fig.8: Protocollo di semina e chemio-attrazione con camere di Boyden. Le cellule vengono seminate in terreno privo di fattori di crescita all'interno della cameretta, mentre il terreno che sta nella parte sotto del filtro contiene la sostanza chemio-attraente o da testare. Dopo un incubazione a 37° C con CO₂ al 5% le cellule passano il filtro e vengono poi fissate e colorare.

Formazione dei vasi con cellule endoteliali primarie HUVEC.

50 ul di matrigel (BD Bioscience) è stato aggiunto a una piastra con 96 pozzetti e fatto solidificare a 37° C in incubatore per almeno un'ora. Questa sostanza è una mistura di proteine gelatinose che viene estratta dal sarcoma di topo. Questo tumore è ricco di proteine della matrice extracellulare, tra cui la laminina, collagene IV, proteoglicani eparan solfato e contiene anche chemiochine coinvolte nella crescita cellulare, come tumor growth factor- β (TGF- β), IGF, EGF, FGF, e l'attivatore del plasminogeno tissutale (Hughes C.S. 2010). Le cellule HUVEC, dopo essere state contaminate con l'utilizzo della camera di burker, vengono seminate $5 * 10^4$ per pozzetto e, dopo 1 ora di incubazione a

37° per facilitare l'adesione sulla matrice, sono state trattate con trombina e dabigatran a diverse concentrazioni. Dopo 24 ore di incubazione sono state scattate 4 foto random per pozzetto con il microscopio ottico invertito con ingrandimento 10X. Le foto sono state analizzate con il programma ImageJ valutando:

- Il numero di nodi formati per foto
- Il numero di rami formati per foto

Sono stati eseguiti 4 esperimenti in duplicato e il passaggi utilizzati sono stati il 2,3,4.

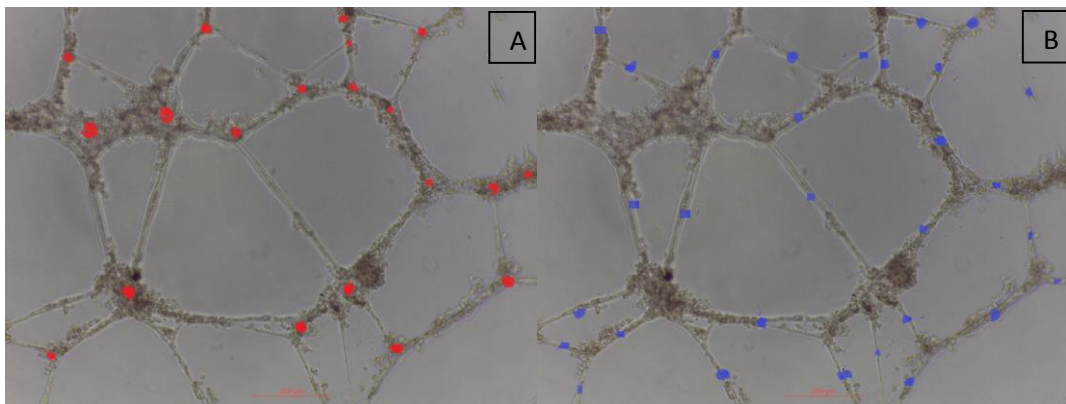


Fig.9: Visualizzazione della formazione di cordoni delle cellule HUVEC. Sono stati segnati in rosso la formazione di nodi(A) in blu il numero di bracci(B).

Analisi statistica

I valori indicati nella tesi sono tutti espressi normalizzati e come medie di due o tre esperimenti, eseguiti in duplicato, con l'aggiunta del dato della deviazione standard(+/-).

La significatività è espressa $p < 0,05$ e $p < 0,01$, è stata calcolata con il t test a due code ed è segnata per ogni figura rappresentata nel testo.

RISULTATI

Le linee cellulari umane di glioblastoma U87-MG e tumore mammario MCF-7 esprimono il recettore PAR-1.

E' stato dimostrato che il recettore PAR-1 è espresso in diverse neoplasie umane. Abbiamo pertanto valutato l'espressione di PAR-1 nelle linee cellulari utilizzate per lo studio. L'analisi citofluorimetrica di cellule di glioblastoma U87-MG e di adenocarcinoma mammario MCF-7 ha dimostrato che le cellule neoplastiche esprimono elevati livelli di PAR-1 (Fig. 10 A,B)

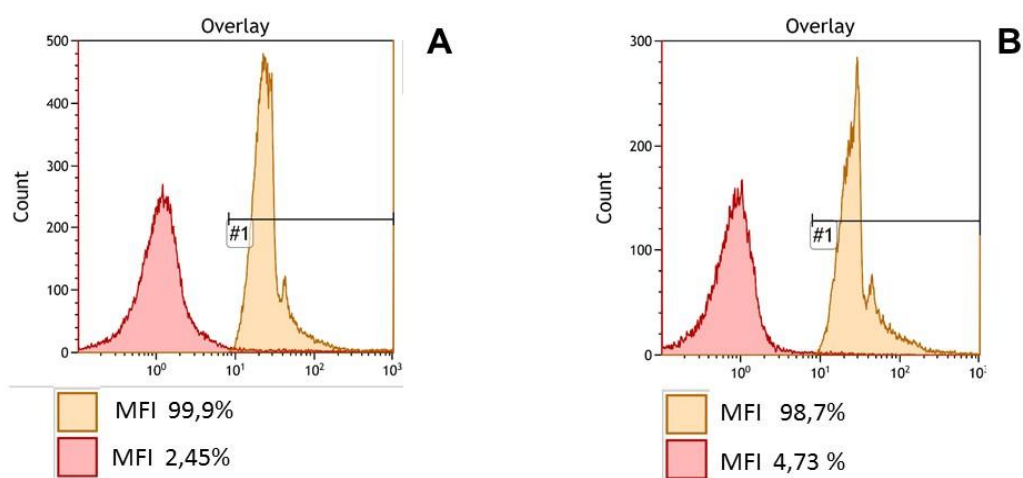


Figura 10: Espressione di membrana del recettore PAR-1 di cellule U87-MG (A) e MCF-7 (B). Istogramma rosso: Isotipo di controllo; istogramma arancio: PAR-1

Effetti della trombina sulla proliferazione cellulare neoplastica

E' stato dimostrato in maniera convincente da precedenti studi che la trombina esercita effetti proliferativi su cellule neoplastiche. Abbiamo pertanto valutato se questa proprietà della trombina sia riproducibile sui sistemi cellulari utilizzati nel nostro modello sperimentale. La proliferazione di cellule MCF-7 è stata quantificata mediante metodica colorimetrica MTS. Un effetto di incremento della proliferazione tempo dipendente è

stato confermato (Fig. 11) alla concentrazione di trombina pari a 0,5 U/ml. I dosaggi superiori non hanno mostrato differenze significative.

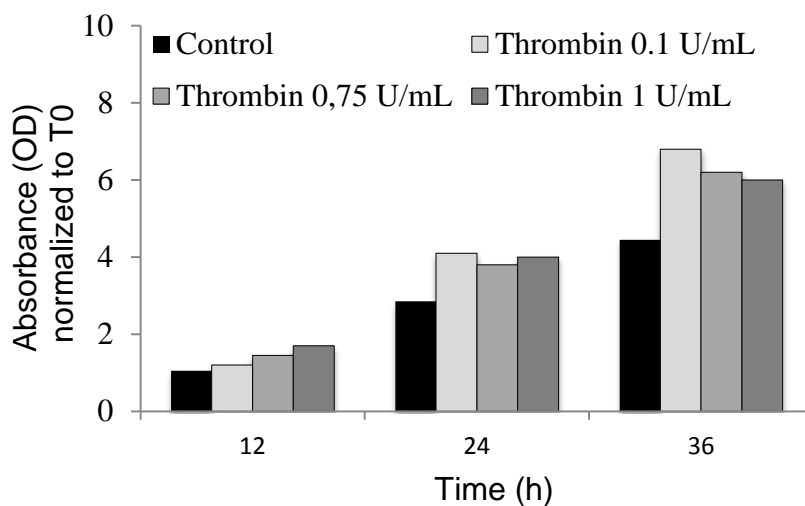


Figura 11: Effetto delle diverse concentrazioni di trombina sulla proliferazione della linea cellulare di adenocarcinoma mammario MCF-7.

Effetto del dabigatran sulla proliferazione cellulare indotta da trombina

Nel precedente esperimento abbiamo dimostrato che la proliferazione di cellule neoplastiche *in vitro* è aumentata in presenza di trombina. Dabigatran, legandosi al sito attivo della trombina, la rende indisponibile al legame con PAR-1. Pertanto, oltre a prevenire la conversione del fibrinogeno in fibrina, dabigatran blocca il signaling di PAR-1 indotto trombina. Questo meccanismo potrebbe determinare pertanto un antagonismo del dabigatran anche nei confronti degli effetti proliferativi della trombina sulle cellule neoplastiche. Abbiamo pertanto valutato tale ipotesi in cellule MCF-7 stimulate con trombina. Come mostrato in figura 12 b, in assenza di trombina il dabigatran non modifica il pattern di crescita *in vitro* delle cellule MCF-7. Al contrario, quando

dabigatran è stato co-incubato con trombina, si è osservata una significativa inibizione della proliferazione indotta da trombina, evidente dalla ventiquattresima ora di incubazione, con un effetto dipendente dalla concentrazione di dabigatran ($p < 0,05$ e $0,01$ rispettivamente) (Fig.12 a).

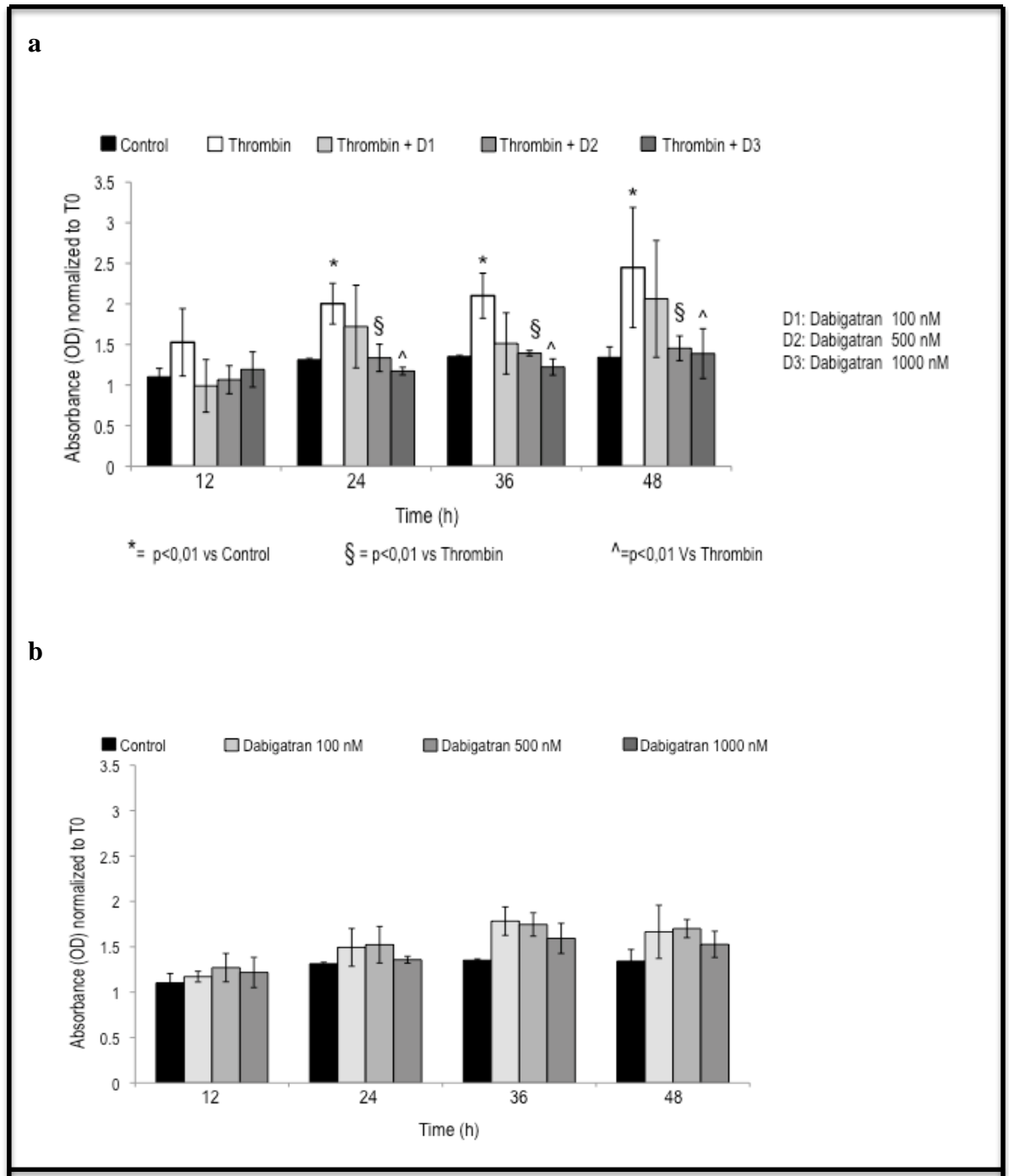


Figura 12. Dabigatran inibisce la proliferazione di cellule MCF-7 indotta da trombina. Cellule MCF-7 sono state coltivate in presenza di trombina, trombina e dabigatran (a) o solo dabigatran (b). La proliferazione è stata quantificata a diversi timepoints con metodica MTS.

L'effetto di trombina e dabigatran sulla proliferazione neoplastica in vitro è stata valutata anche in una seconda linea cellulare, la linea U87-MG di glioblastoma. I risultati ottenuti con le cellule di adenocarcinoma MCF7 non sono stati tuttavia confermati. Infatti, la trombina non si è dimostrata in grado di indurre maggiore proliferazione rispetto al controllo U87-MG (Fig.13 a). Al contrario, la proliferazione si è dimostrata inferiore nelle coltura esposte a trombina. Inoltre, anche la presenza di solo dabigatran ha determinato inibizione della proliferazione rispetto al controllo, particolarmente marcata ad elevate concentrazioni (Fig.13 b).

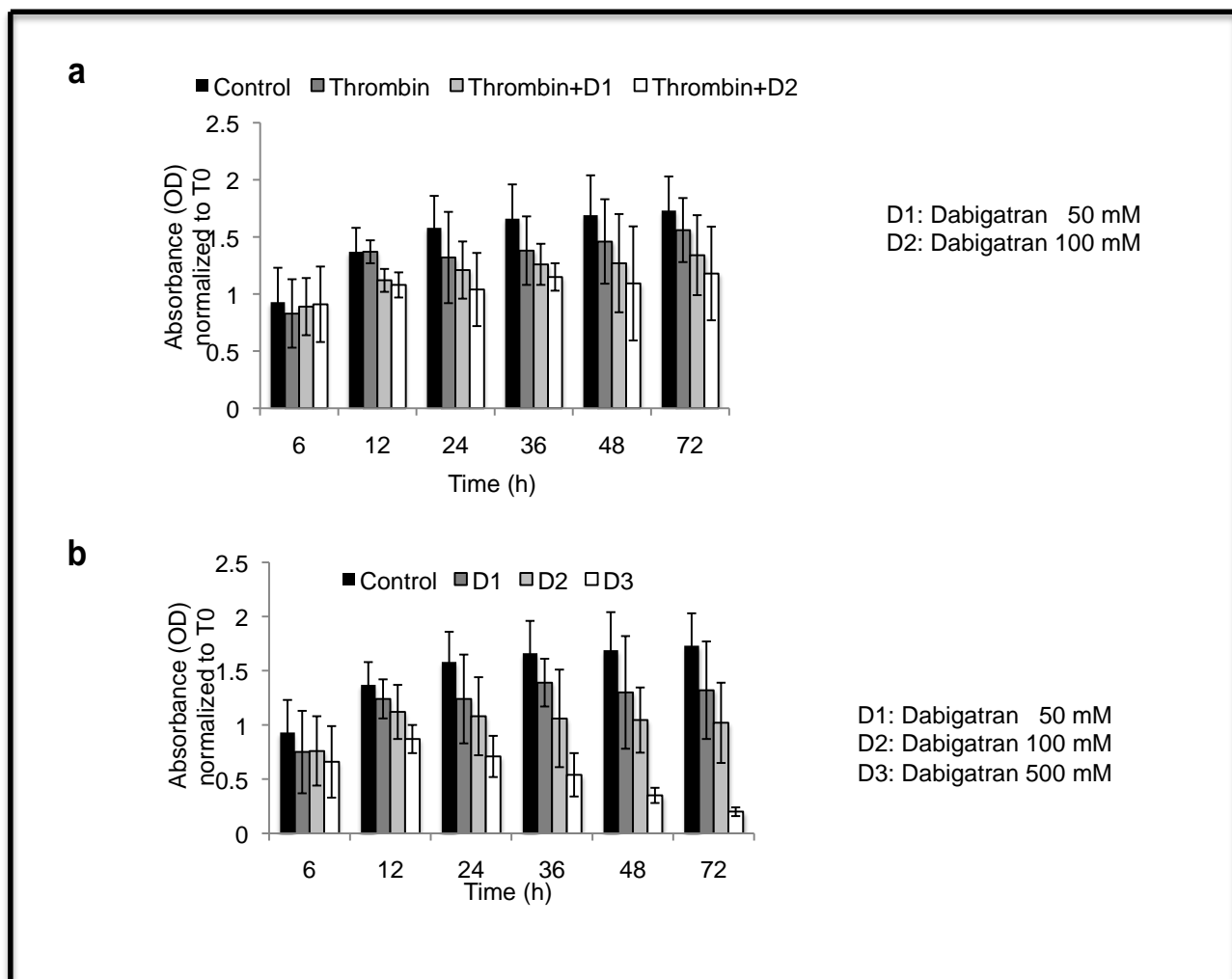


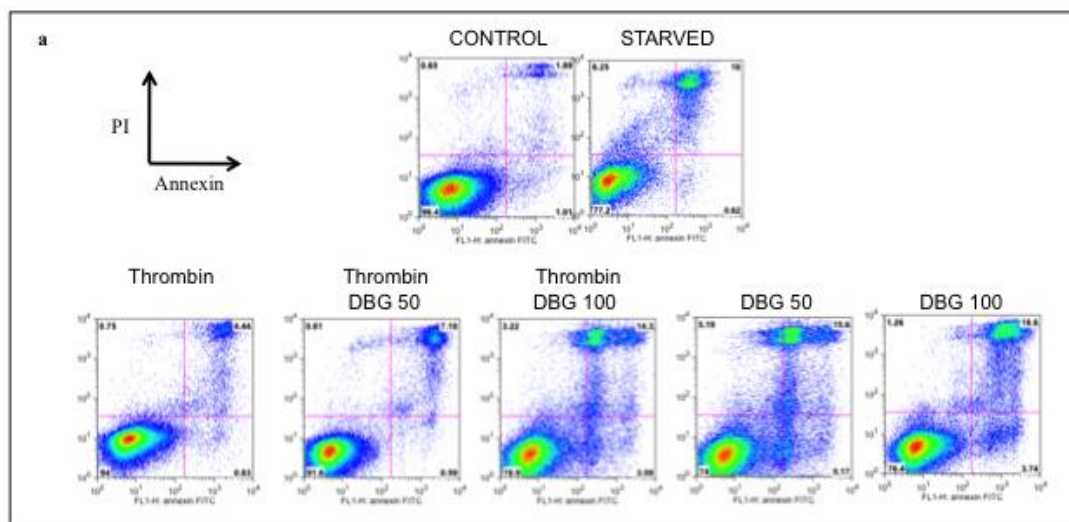
Figura 13. Effetto di trombina e dabigatran (a) o solo dabigatran (b) sulla linea cellulare U87-MG. Sia trombina che dabigatran riducono la proliferazione rispetto a colture di controllo.

Valutazione citofluorimetrica dell'apoptosi indotta da deplezione di siero e effetti di Trombina e Dabigatran

Nel corso dei precedenti esperimenti è stato notato che le cellule di glioblastoma U87-MG andavano incontro a morte se le colture venivano allestite in deplezione di siero. Questa osservazione unitamente alle evidenze della letteratura di effetti protettivi esercitati dalla trombina sulla morte cellulare, mediati da attivazione di protein-chinasi,

ha fornito lo spunto per questa parte sperimentale. Ci siamo pertanto chiesti se anche nel nostro sistema sperimentale la trombina esercitasse questo effetto protettivo. Abbiamo quindi valutato l'apoptosi mediante metodica citofluorimetrica con l'impiego di propidio ioduro e annessina V. Come mostrato in Fig. 14, la frazione delle cellule U87-MG positive a propidio ed annessina è risultata significativamente inferiore in presenza di trombina rispetto alle cellule di controllo incubate con basse concentrazioni di siero, a conferma che la trombina riduce la morte cellulare in vitro. L'effetto di protezione veniva perduto nelle colture co-trattate con trombina e dabigatran, con ritorno alla frazione di cellule doppie positive osservate nel controllo questo effetto viene progressivamente perso con ripristino della quota di apoptosi osservata nei controlli.

a



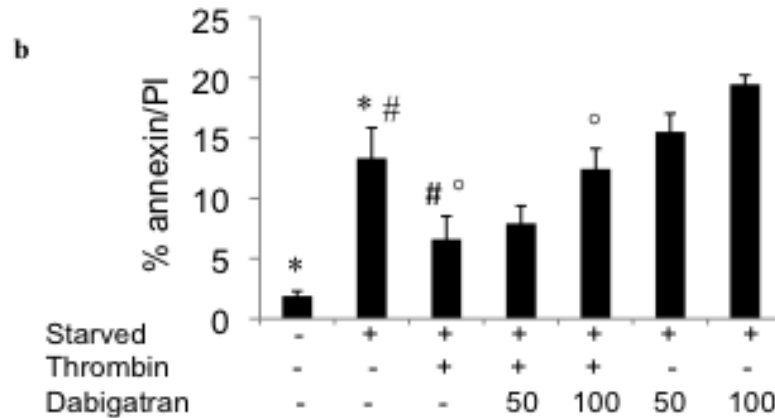


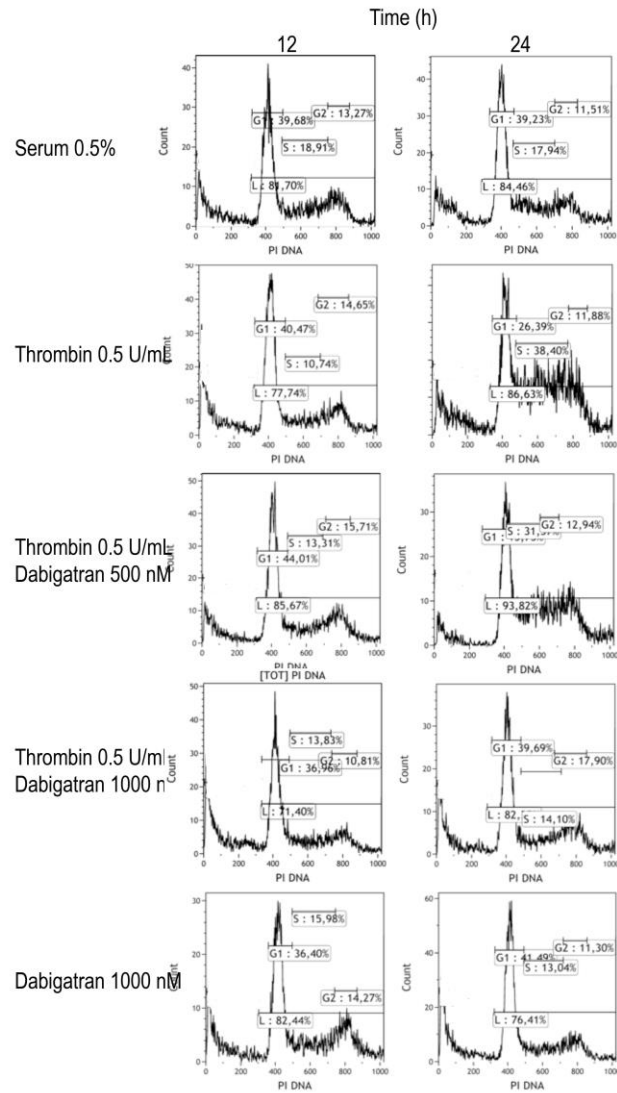
Figura 14. Cellule U87-MG sono state coltivate in condizioni di deplezione di siero, in assenza (controllo) o presenza di trombina (0.5 U/ml), trombina e dabigatran (50 and 100 mM), o solo dabigatran (a). L'analisi citofluorimetrica per propidio ed annexina è stata eseguita a 72 ore. I risultati di due esperimenti sono riassunti nel pannello (b). * $p < 0.001$; # $p < 0.01$; ° $p < 0.01$.

Effetti di Trombina e Dabigatran sulle fasi del ciclo cellulare di cellule neoplastiche.

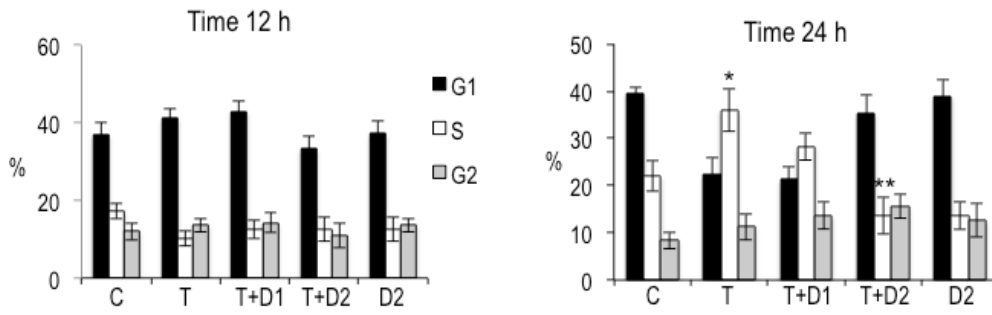
E' stato precedentemente osservato che la trombina è in grado di far progredire cellule neoplastiche arrestate alla fase G0 del ciclo cellulare verso la fase G1 e successivamente le fasi S e G2 (Hu L.,2009).

Abbiamo pertanto studiato gli effetti della trombina sulla progressione del ciclo cellulare in linee cellulari di neoplasia umana. La quantificazione delle fasi del ciclo cellulare è stata effettuata mediante analisi citofluorimetrica di cellule neoplastiche marcate con propidio ioduro. La figura 15 a mostra gli istogrammi rappresentativi di 3 esperimenti a due diversi tempi di coltura mentre la figura 15 b mostra i risultati cumulativi.

a



b



C: serum 0.5%
 T: thrombin 0.5 U/mL
 D1: dabigatran 500 nM
 D2: dabigatran 1000 nM

* p<0.05
 ** p<0.01

Figura 15. Dabigatran previene la progressione del ciclo cellulare indotto da trombina di cellule MCF-7. (a) Dopo trattamento, le cellule sono state marcate con propidio iodide e analizzate con metodo citofluorimetrico per le diverse fasi del ciclo cellulare. (b) Risultati cumulativi di tre esperimenti indipendenti. Le cellule sono state coltivate in pozzetti in condizioni di starving medium, successivamente trattate con Trombina e Dabigatran.

Il trattamento delle colture cellulari con trombina (0,1 U/ml e 0,5 U/ml) ha determinato un aumento significativo, rispetto al controllo, della frazione di cellule in fase S, con parallela riduzione della frazione di cellule in G1 ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ rispettivamente per concentrazioni di trombina pari a 0.1 e 0.5 U/ml) (fig. 15 a,b). Nel trattamento combinato con trombina e dabigatran a diverse concentrazioni si ha un ritorno alle proporzioni delle diverse fasi del ciclo osservato nel controllo. Il trattamento con solo dabigatran non ha mostrato variazioni significative nelle fasi del ciclo cellulare.

Effetti di trombina e dabigatran sull'espressione di proteine regolatrici il ciclo cellulare, p27 e ciclina D1.

I dati precedenti confermano un ruolo della trombina come induttore della progressione nel ciclo cellulare. Abbiamo successivamente studiato i meccanismi che possono favorire tale progressione da parte della trombina. In particolare, ci siamo focalizzati su due proteine implicate nella regolazione del ciclo cellulare, la proteina p27^{Kip1} con funzioni regolatrici inibitorie e la ciclina D1 la quale promuove la progressione dalla fase G1 alla fase S del ciclo.

Abbiamo pertanto valutato, mediante metodica WB, l'espressione della ciclina D1 e di p27 in cellule U87-MG(Fig.15) e MCF-7(Fig.16) esposte a trombina a diversi timepoints. Come mostrato dalla figura 16, rispetto a cellule di controllo coltivate in condizioni di deprivazione di siero, nelle cellule trattate con trombina l'espressione di p27 è risultata ridotta mentre si è osservata una maggiore espressione di ciclina D1. Quando le cellule trattate con trombina venivano co-trattate con dabigatran si è osservato il ripristino del pattern di espressione ottenuto nelle colture di controllo. L'espressione di entrambe le proteine non ha mostrato modifiche di rilievo nelle colture con solo dabigatran.

Analogamente a ciò che succede nella linea di glioblastoma, nella linea cellulare MCF-7 l'espressione delle due proteine studiate ha dimostrato che la Trombina va a stimolare l'espressione della ciclina D1 in maniera significativa ai tempi 12 e 24 ($p < 0,05$) (Fig.17), mentre p 27 viene ridotto significativamente a tutti i tempi ($p < 0,05$ per i tempi 3 e 12 $p < 0,01$ ai tempi 6, 24, 36). Il doppio trattamento con trombina e dabigatran riduce l'espressione proteica indotta dalla Trombina della Ciclina D1 ($p < 0,05$ per tempi 12 e 24) e aumenta a livelli simili al controllo quella del p27 in maniera significativa ($p < 0,05$ per i tempi 3,12, 24 e 36). Nel Trattamento con solo dabigatran abbiamo un'espressione proteica, sia per p27 che per la Ciclina D1, simile al controllo non trattato (fig. 16).

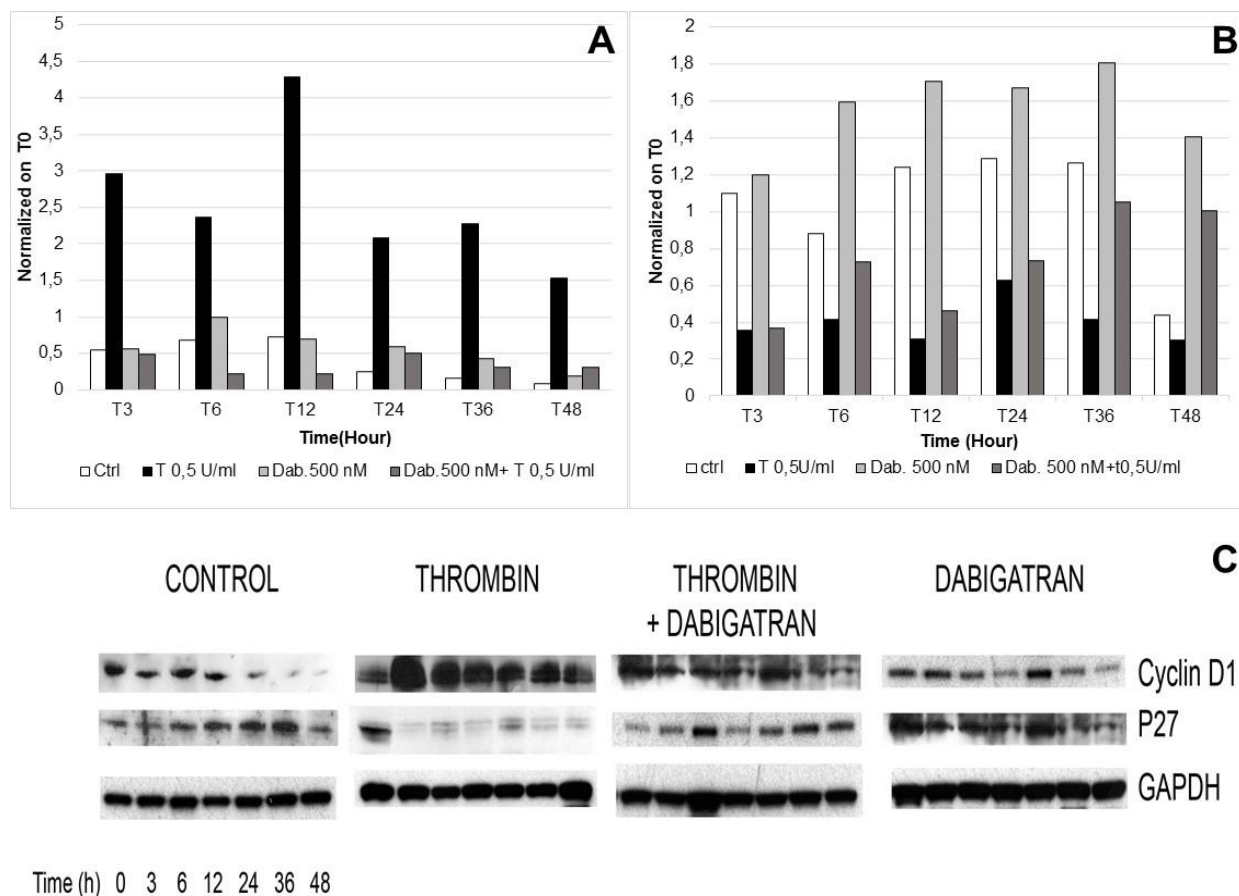


Fig. 16: Quantificazione dell'espressione di Ciclina D1 (A) e p27 (B) e blot rappresentativo (C) nella linea cellulare U87-MG in presenza di trombina (0,5 U/ml), dabigatran (500 nM) o entrambi.

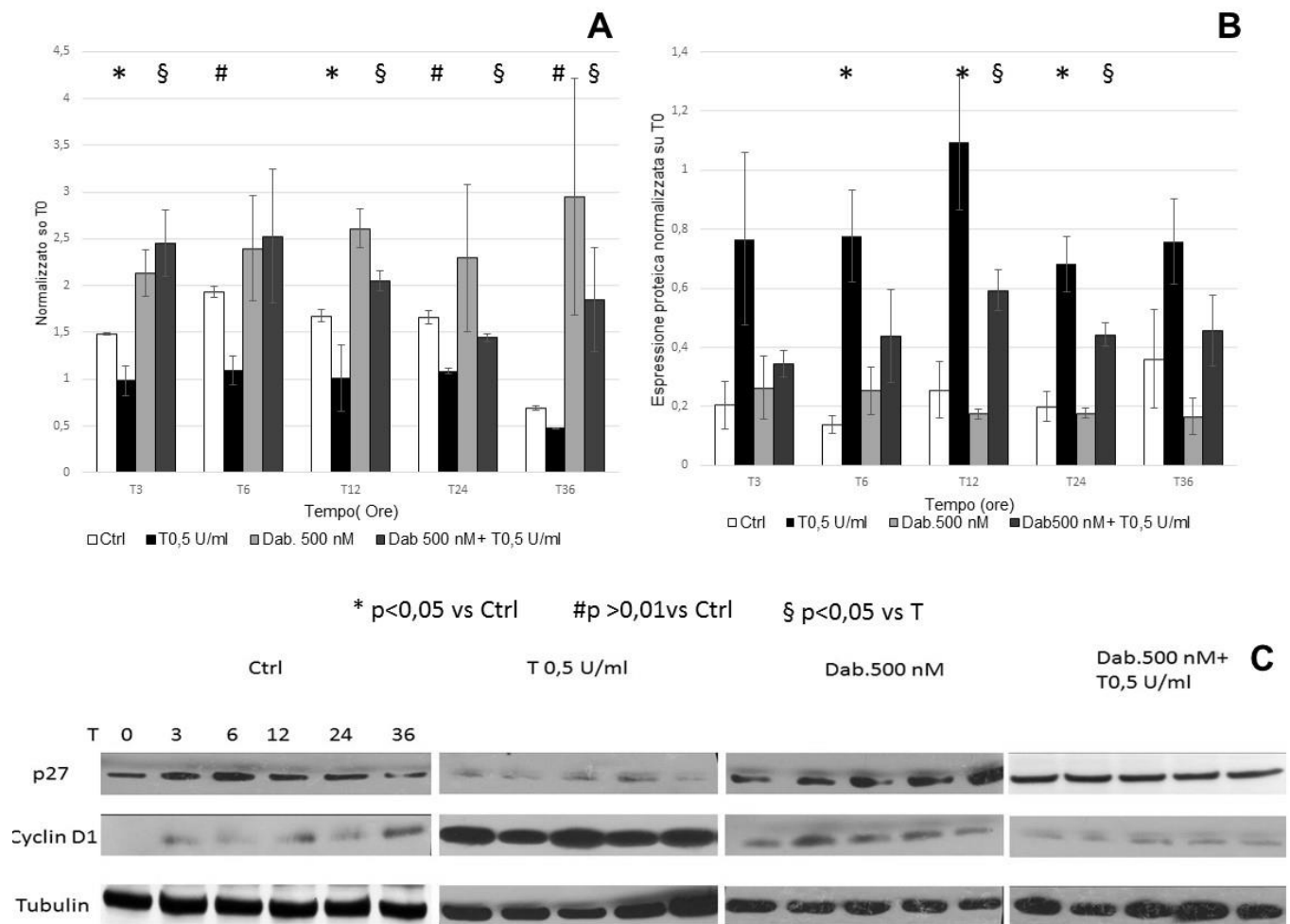


Fig.17: Quantificazione dell'espressione di p27 (A) ciclina D1 (B) e blot rappresentativo dell'espressione di queste due proteine nella linea cellulare MCF-7 in presenza di Trombina (0,5 U/ml), dabigatran (500 nM) e di entrambe. Il trattamento con trombina aumenta in maniera significativa l'espressione della ciclina D1 (* $p < 0,05$ ai tempi 6, 12 e 24), mentre downregola in maniera significativa p27(* $p < 0,05$ ai tempi 3 e 12 e # $p < 0,01$ ai tempi 6, 24 e 36). Il co-trattamento dabigatran e trombina porta ad un'espressione delle due proteine simili a quelle del controllo non trattato, con significativa riduzione dell'espressione di ciclina D1($p < 0,05$ ai tempi 12 e 24) e aumento dell'espressione di p27($p < 0,05$ ai tempi 3, 12, 24 e 36).

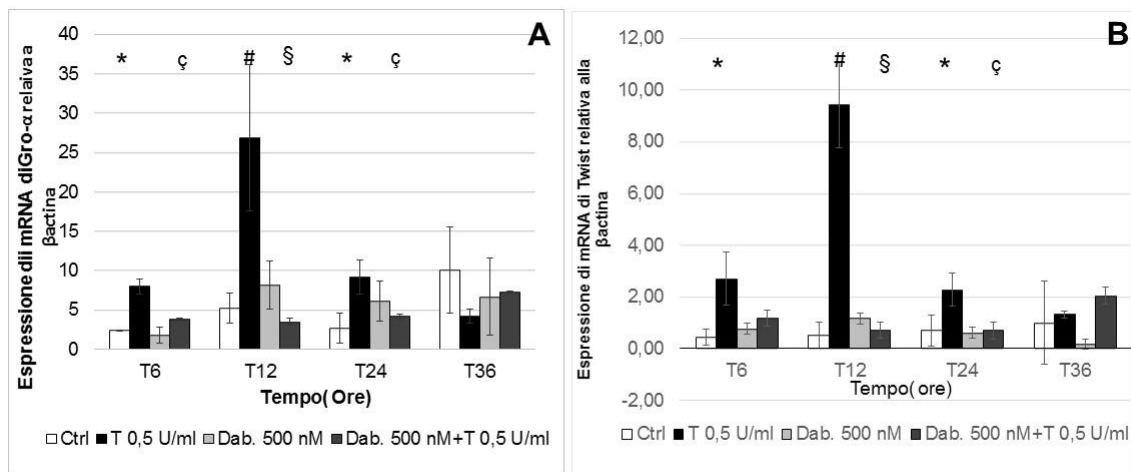
Effetti di trombina e dabigatran sull'espressione di proteine implicate nell'angiogenesi, TWIST e GRO- α

L'espressione della proteina Twist è stata dimostrata correlare con una maggiore invasività cellulare e neoplastica e con la stimolazione della neoangiogenesi. L'espressione di TWIST e di GRO- α , una chemochina con potere angiogenetico e di stimolazione del potere oncogenico, è stato pertanto valutato su cellule MCF-7 e su cellule HUVEC esposte a trombina e dabigatran, mediante RT-PCR (fig. 18-19) e WB (fig. 20-21). L'esposizione a trombina si è dimostrata efficace nell'indurre espressione di Gro- α con entrambe le metodiche sulle linee cellulari MCF-7 e HUVEC (Fig.17A-18A-19-20). Parallelamente abbiamo osservato un aumento dell'espressione di Twist su entrambe le linee (Fig.17B-18B-19-20). L'espressione è risultata significativamente aumentata ai diversi timepoints sia per Gro- α ($p < 0,05$ a 6 e 24 ore; $p < 0,005$ a 12 ore per le MCF-7, mentre per le HUVEC $p < 0,05$ per 6 e 36 ore; $p < 0,005$ per 12 e 24 ore), che per Twist ($p < 0,05$ a 6, 24 ore; $p < 0,001$ a 12 ore per le MCF-7; mentre per le HUVEC $p < 0,05$ per 6 e 36 ore; $p < 0,005$ per 12 e 24 ore).

Nelle cellule co-trattate con trombina e dabigatran abbiamo osservato una riduzione significativa dell'espressione di Gro- α ($p < 0,05$ a 6 e 24 ore; $p < 0,01$ 12), come pure di Twist ($p < 0,001$ a 12 ore; $p < 0,05$ a 24 ore) rispetto al trattamento con sola trombina (Fig. 17 A, B). Le cellule HUVEC hanno mostrato un profilo di espressione simile alle MCF-7 ($p < 0,01$ a 6 12 ore mentre $p < 0,05$ a 24 ore per Gro- α , mentre Twist $p < 0,01$ a 12 ore, mentre $p < 0,05$ a 6 e 36 ore) (Fig. 18 A, B).

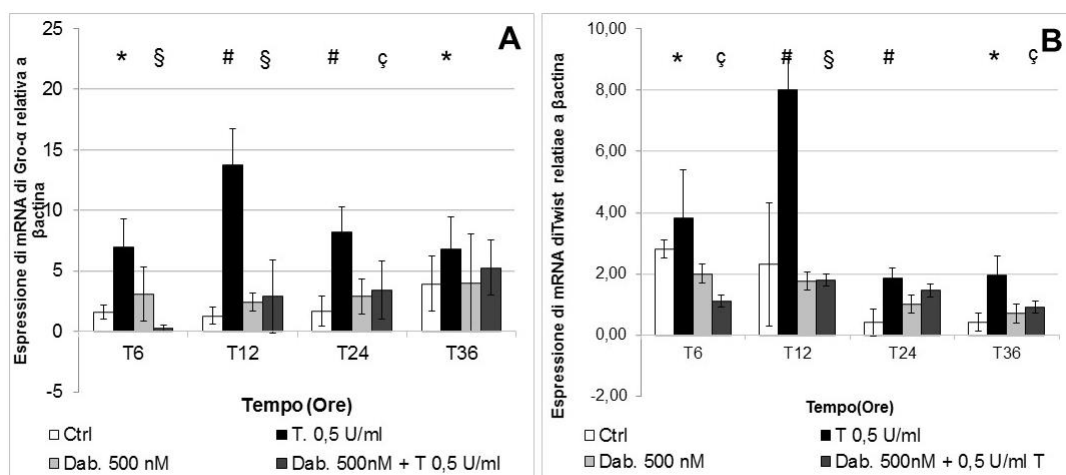
Analogamente a ciò che si è dimostrato per l'espressione del messaggero per MCF-7 e HUVEC, anche l'espressione proteica delle proteine Gro- α e Twist indotte da trombina sono aumentate, in maniera significativa, rispetto al controllo (fig.19-20). L'effetto indotto

dalla Trombina viene inibito significativamente dall'utilizzo del dabigatran, portando ad una minima espressione che può essere causata dal farmaco.



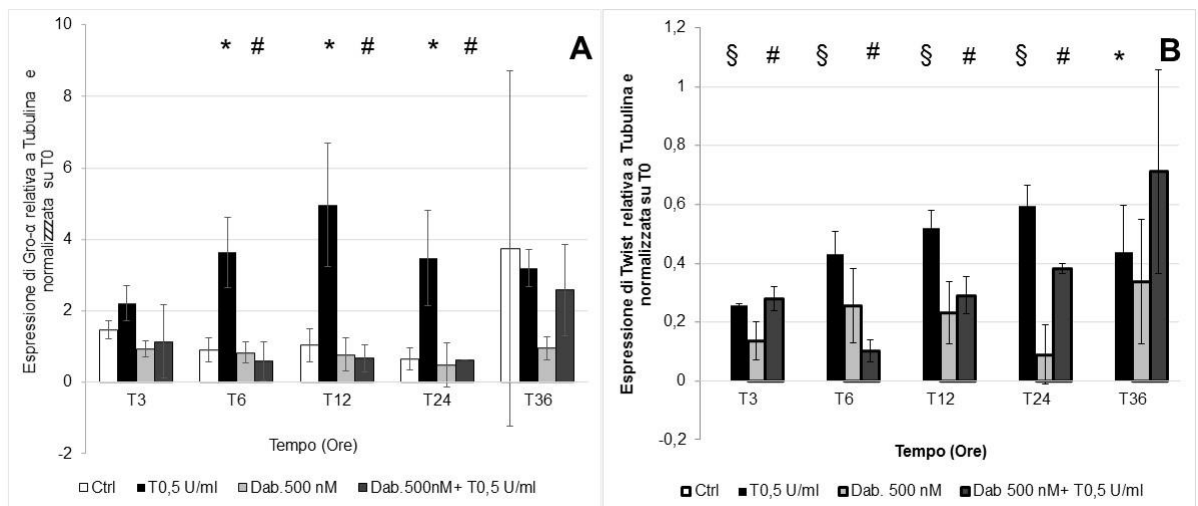
* $p < 0,05$ vs Ctrl # $p < 0,005$ vs Ctrl § $p < 0,01$ vs T 0,5 U/ml ç $p < 0,05$ vs T 0,5 U /ml

Figure 18: Espressione di mRNA di Gro- α in cellule MCF7. In presenza di trombina l'espressione di Gro- α raggiunge la massima intensità a 12 ore di esposizione (A). L'espressione viene ripristinata su livelli simili al controllo in cellule esposte a trombina e dabigatran (A). Un profilo analogo è stato osservato per l'espressione di Twist (B) (n=3).



* $p < 0,05$ vs Ctrl # $p < 0,005$ vs Ctrl § $p < 0,01$ vs T 0,5 U/ml ç $p < 0,05$ vs T 0,5 U /ml

Figura 19. Espressione del mRNA di Gro- α in cellule HUVEC. In presenza di trombina l'espressione di Gro- α (A) raggiunge la massima intensità a 12 ore di esposizione (A). L'espressione viene ripristinata su livelli simili al controllo in cellule esposte a trombina e dabigatran (A). Un profilo analogo si osserva per l'espressione di Twist(B)(n=3).



* p < 0,05 vs Ctrl

§ p < 0,005 vs Ctrl

p < 0,05 vs 0,5 U/ml T

C

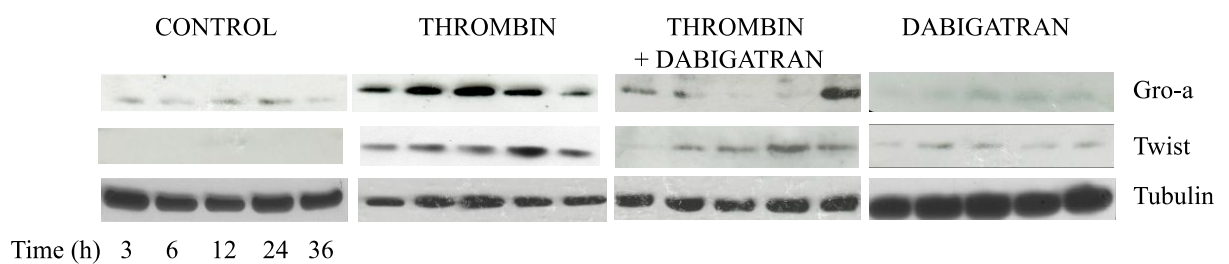


Figura 20: Quantificazione dell'espressione proteica di Gro- α (A)e Twist (B) in cellule MCF-7) con western blot rappresentativo(C). In presenza di trombina (0,5 U/mL) l'espressione di entrambe le proteine aumenta in maniera evidente fino al tempo 12 per Gro- α e al 24 per Twist, significatività ai diversi tempi (p < 0,05 per i tempi 6,12 e 24 per

Gro- α mentre per Twist $p < 0,005$ per tutti i tempi). L'espressione indotta dalla trombina viene inibita in maniera significativa in presenza di dabigatran (500 nM) ($p < 0,05$ per i tempi 6, 12, 24 di gro- α , e 3, 6, 12, 24 ore per Twist) ($n=2$).

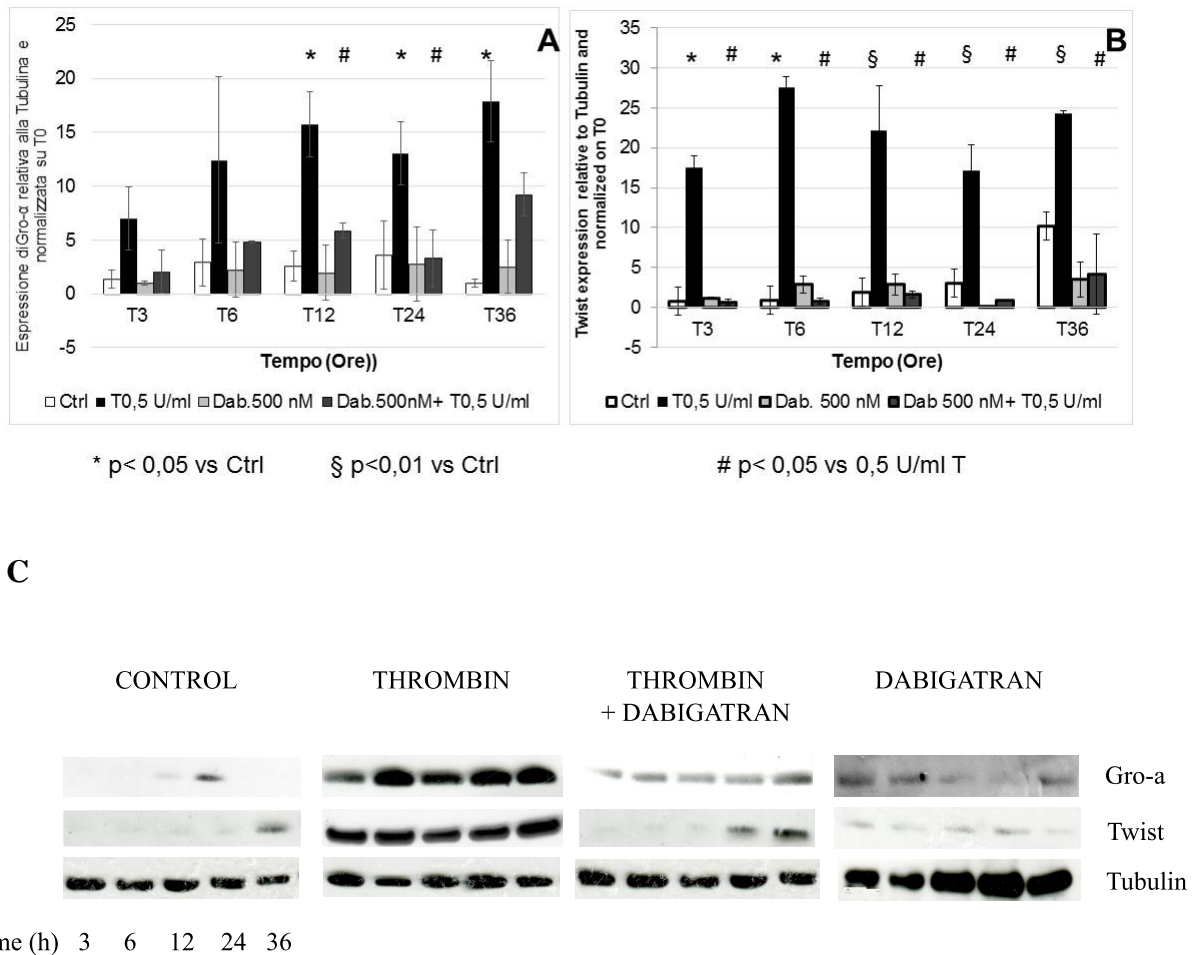


Figura 21: Quantificazione dell'espressione proteica di Gro- α (A) e Twist (B) in cellule HUVEC con western blot rappresentativo(C). In presenza di trombina (0,5 U/mL) l'espressione di entrambe le proteine aumenta in maniera evidente con il picco al tempo 12 per Gro- α e al tempo 6 per Twist($p < 0,05$ per 12,24 ,36 di Gro- α , mentre per Twist $p < 0,05$ al tempo 3, 6; $p < 0,01$ 12, 24,36). L'espressione viene ripristinata su livelli simili al controllo in cellule esposte a trombina e dabigatran (500 nM) con una diminuzione

significativa rispetto alla trombina ($p < 0,05$ per i tempi 12,24 per Gro- α e per tutti i tempi di Twist) ($n=2$).

Il dabigatran inibisce l'effetto chemotattico della trombina su cellule neoplastiche e su cellule endoteliali

La trombina ha un ruolo importante nell'invasione vascolare, step fondamentale per la metastatizzazione. Questo processo è influenzato anche dall'attivazione del recettore PAR-1 il quale modula l'attività delle proteine Rho GTPasi, coinvolte nel riarrangiamento del citoscheletro, e dell'espressione di MMPS, coinvolte nel movimento cellulare attraverso la matrice extracellulare (Radjabi A.R. 2008, Roussos E.T. 2011). L'effetto chemioattrattivo della trombina è stato valutato utilizzando camere di Boyden (Fig.22-23-24 A, B). La trombina ha dimostrato un significativo aumento della chemoattrazione di cellule U87-MG (Fig. 22) rispetto alle cellule non trattate ($p < 0,01$), mentre il trattamento con solo dabigatran a diverse concentrazioni non ha mostrato effetti significativi sulla motilità direzionale rispetto al controllo. Il trattamento combinato con dabigatran e trombina si è dimostrato efficace nel ridurre la transmigrazione delle cellule rispetto alla condizione con sola trombina. Analoghi risultati si sono osservati con la linea cellulare MCF-7 (Fig. 23), ($p < 0,0005$). Sulla linea MCF-7, abbiamo voluto valutare queste concentrazioni poiché non tossiche e con un effetto di riduzione della transmigrazione maggiore rispetto al trattamento di 100 nM che non è risultato significativo, mentre nella U87-MG il farmaco a concentrazioni alte, come mostrato nello studio di citofluorimetria con PI e annessina V, sembra avere un effetto stimolante l'apoptosi. Nelle due linee, nessuna differenza è stata osservata nella chemoattrazione indotta dal solo dabigatran rispetto al controllo.

Come osservato con le linee tumorali, l'effetto chemoattrattivo della trombina si è dimostrato attivo anche su cellule endoteliali, in maniera significativa rispetto al controllo non trattato ($p < 0,00005$), e ancora, il doppio trattamento dabigatran e trombina ha determinato una riduzione significativa del numero di cellule migrate nella camera inferiore della camera rispetto alle cellule trattate con sola trombina ($p < 0,001$) (Fig. 24). Il solo trattamento con dabigatran non ha influenzato la chemotassi anche nel caso delle cellule HUVEC.

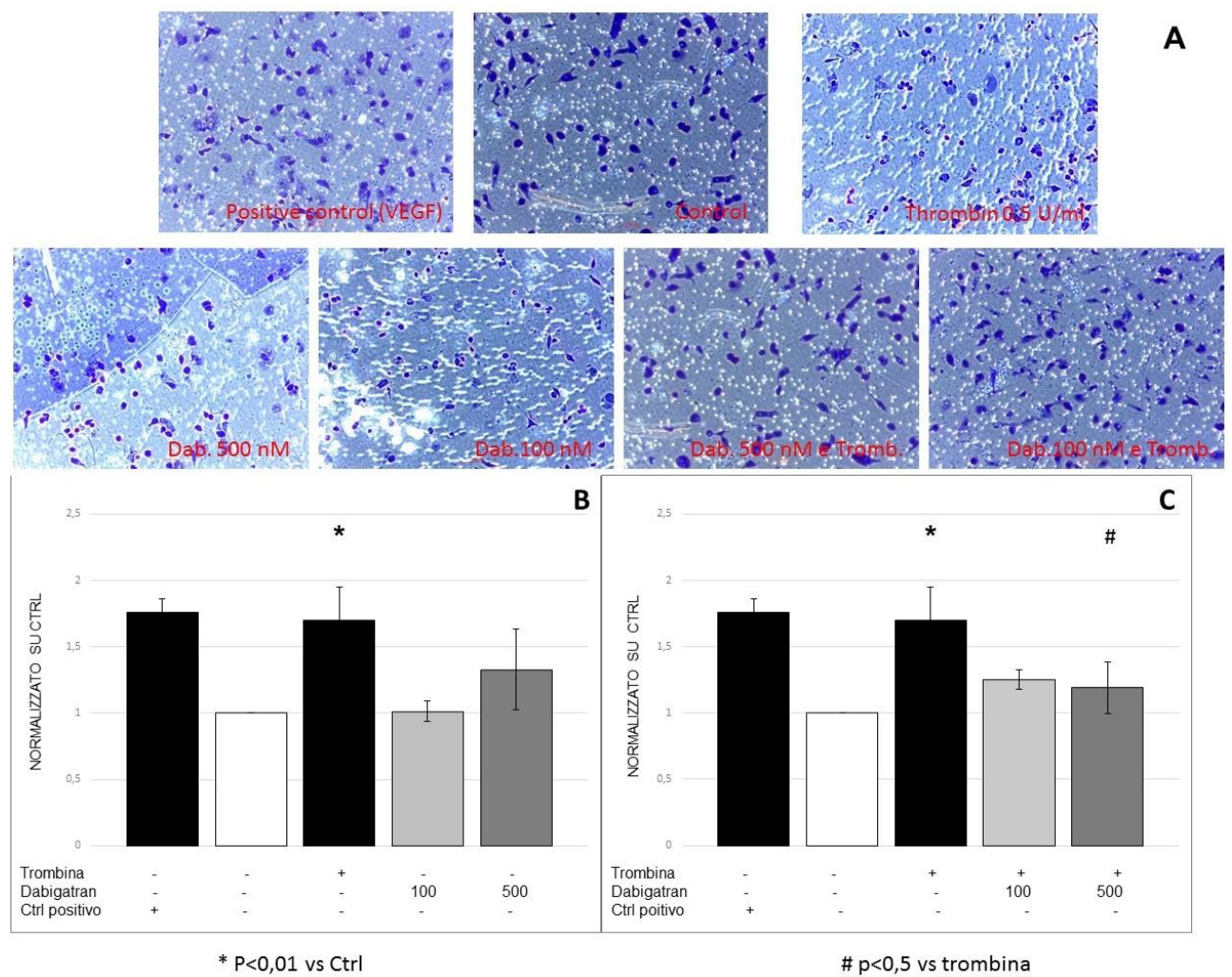


Figura 22. Effetto della trombina e del dabigatran sulla chemotassi della linea cellulare U87-MG. Nel pannello A sono mostrate immagini (x10) rappresentative dei transwells nei vari trattamenti eseguiti. Il grafici (B, C) mostrano invece la conta per campo

fotografico normalizzata sul controllo. La trombina determina un significativo ($p < 0,01^*$) aumento dell'attrazione delle cellule, incremento che viene annullato nel trattamento combinato con trombina e dabigatran ($p < 0,05$). Non sono stati significativi cambiamenti tra i trattamenti con dabigatran e il controllo non trattato ($n=3$).

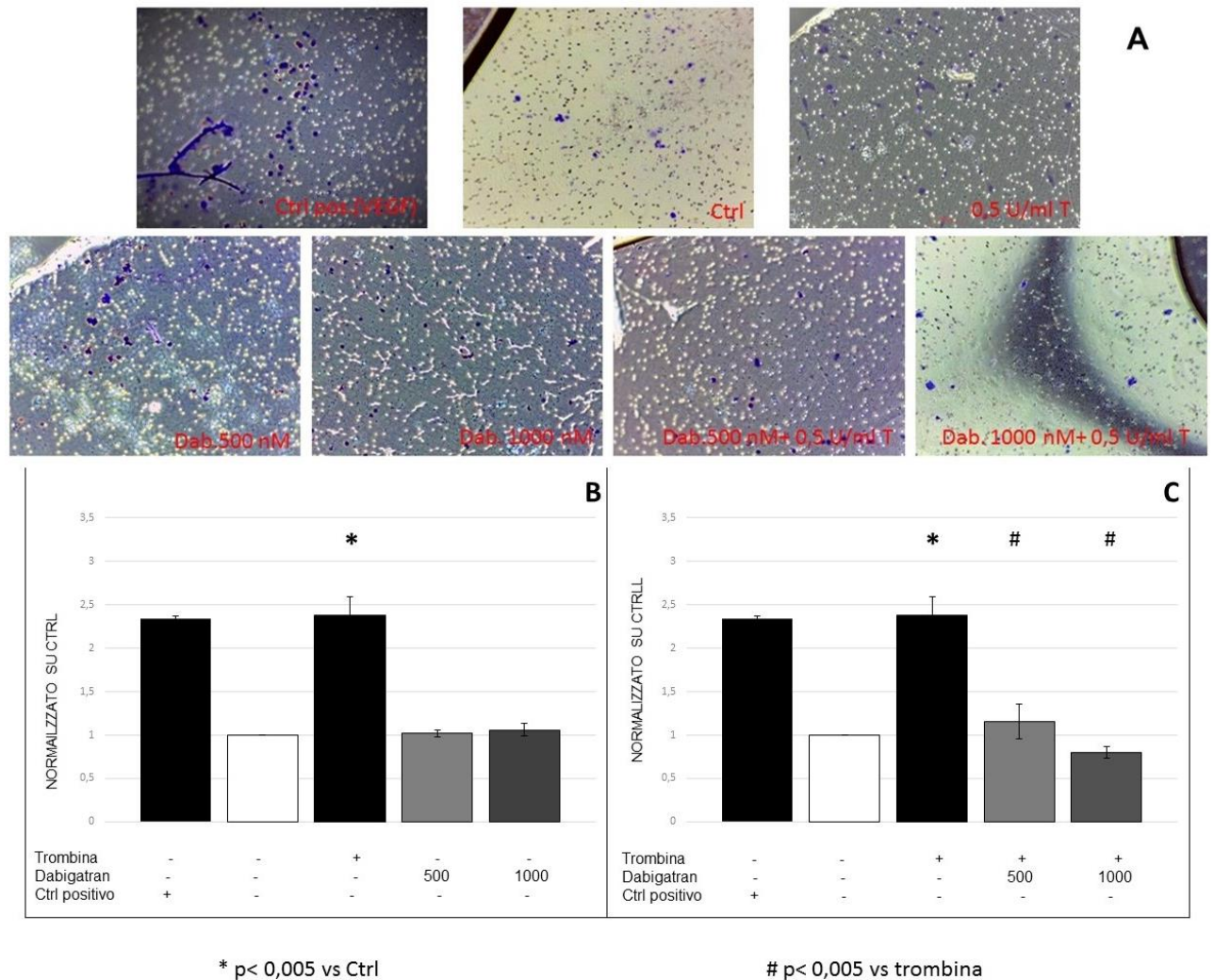


Figura 23. Effetto della trombina e del dabigatran sulla chemotassi della linea cellulare MCF-7. Nel pannello A sono mostrate le foto scattate al 10 X delle transwell per i vari trattamenti eseguiti (A). Il grafico (B e C) mostrano invece la conta per campo fotografico normalizzata su il controllo. Si ha una significatività $p < 0,005^*$ per l'aumento di attrazione della trombina, mentre nel caso del trattamento con trombina e dabigatran la

diminuzione è significativa per $p < 0,005$ (#) (C). Il dabigatran solo non ha alcun effetto di chemioattrazione rispetto al controllo(B) (n=3).

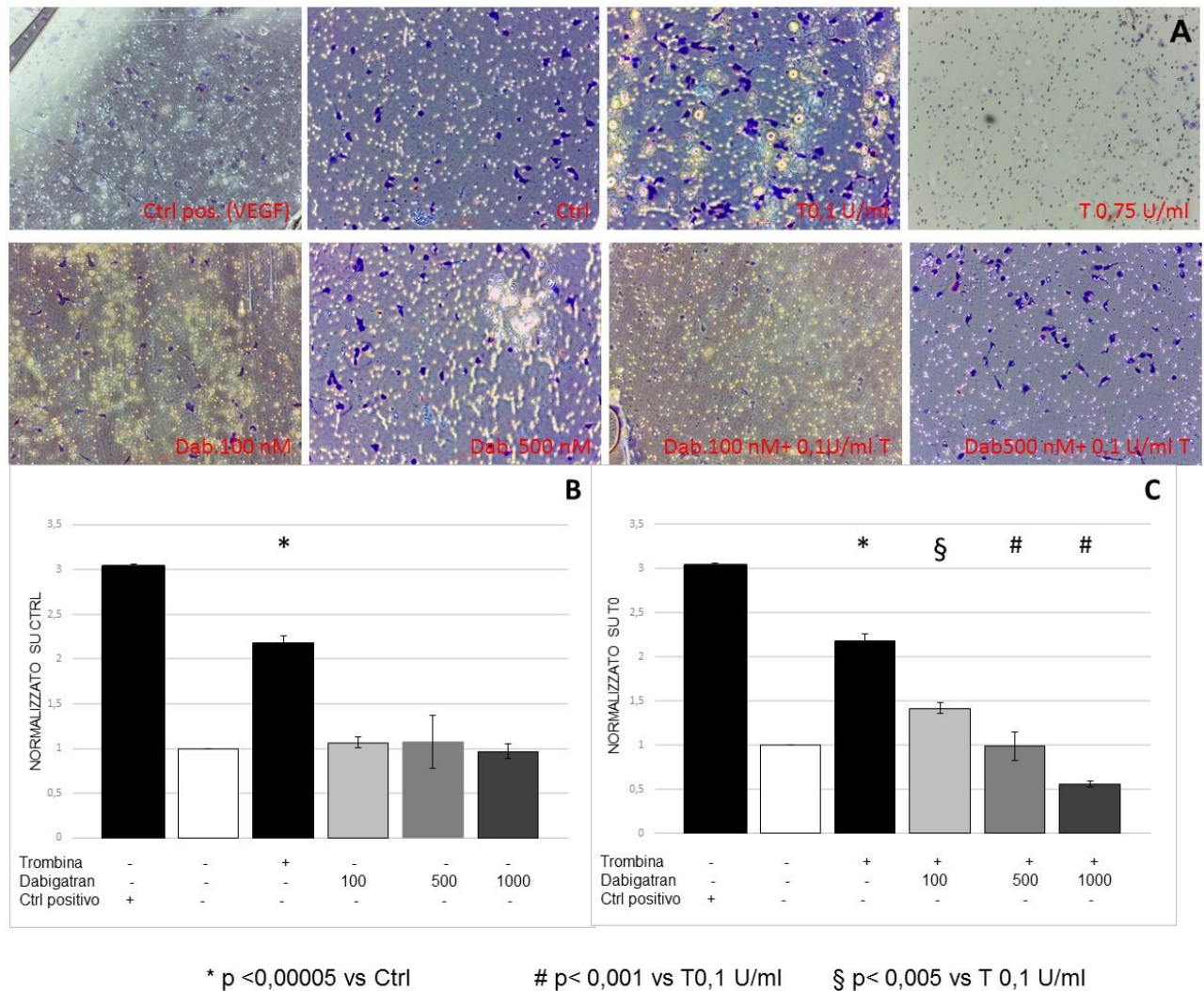


Fig. 23: Effetto della trombina e del dabigatran sulla chemotassi della linea cellulare HUVEC. Nel pannello A sono mostrate le foto scattate al 10 X delle transwell per i vari trattamenti eseguiti (A), alcuni trattamenti non sono stati mostrati. Il grafico (B, C) mostra invece la conta per campo fotografico normalizzata su il controllo. Si ha una significatività $p < 0,00005$ (*) per l'aumento di attrazione della trombina (B e C), mentre nel caso del trattamento con trombina e dabigatran la diminuzione è significativa e dose dipendente(C), mentre il dabigatran non ha riportato nessuna variazione rispetto al controllo (n=3).

Effetto di trombina e dabigatran sulla neoangiogenesi.

La trombina sembra stimolare, oltre che all' extravasazione delle cellule tumorali e il richiamo di quelle endoteliali, la formazione di neovasi. Questo è stimolato dall'espressione di Twist e Gro- α che vanno a regolare il riarrangiamento interno per formare i vasi in vivo (Caunt M. 2006).

Abbiamo pertanto valutato l'effetto di trombina e dabigatran sulla formazione di neovasi utilizzando cellule HUVEC. L'esposizione delle cellule a trombina per 24 ore ha indotto un aumento significativo sia di nodi che delle ramificazioni rami ($p < 0,001$ e $0,005$ rispettivamente). Anche in questo setting, l'effetto della trombina è risultato massimale a concentrazioni più basse ($0,1$ U/ml). Infatti, il trattamento con la Trombina $0,5$ U/ml ha mostrato solo un trend di aumento della formazione di vasi senza tuttavia raggiungere la significatività. Quando dabigatran veniva aggiunto alle colture in presenza di trombina, la formazione di neovasi si riduceva in maniera significativa rispetto alle colture con sola trombina (Fig. 24).

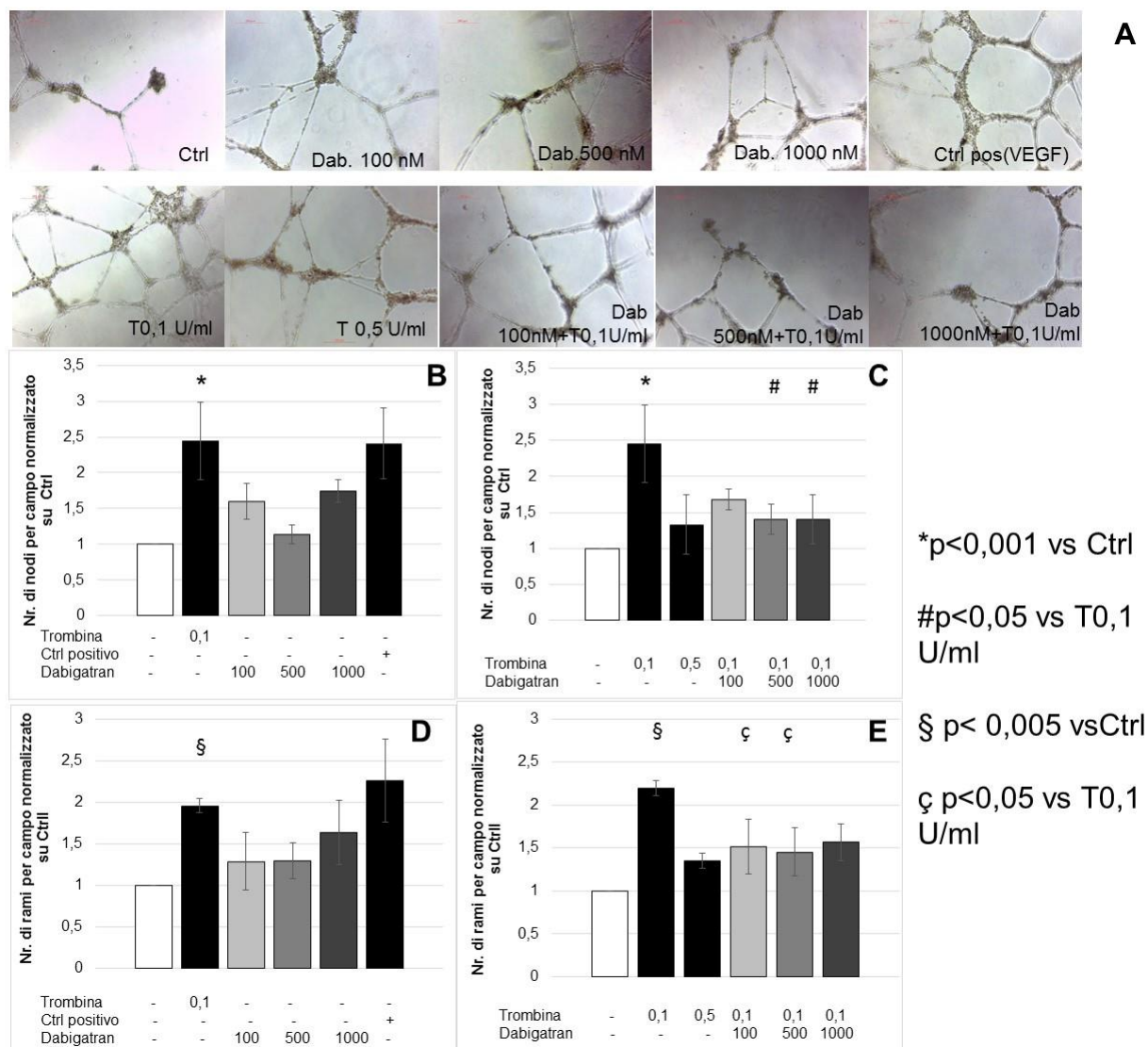


Fig. 24: Formazione dei cordoni in cellule HUVEC. Il pannello A mostra le immagini rappresentative di 3 esperimenti (x10). Il numero di nodi quantificati per foto e normalizzati sul controllo sono raffigurati nei grafici B e C. La trombina (0,1 U/mL) determina un significativo aumento della formazione di nodi (*p<0,001), mentre l'aggiunta di dabigatran (500 nM) alle colture trattate con trombina annulla tale incremento (#p<0,05). Gli istogrammi D ed E mostrano la quantificazione dei rami e confermano anche in questo ambito un aumento significativo in presenza di trombina (§ p< 0,005), non più presente nelle colture con trombina e dabigatran (100 e 500 nM) (ç p<0,05).

DISCUSSIONE

Già dal 1865 è stata riconosciuta una correlazione tra trombosi e cancro. Tale correlazione è dicotomica: un evento trombotico isolato può rappresentare la prima manifestazione di una neoplasia occulta come pure pazienti con neoplasia presentano una prognosi particolarmente infausta nel caso il decorso della malattia si associ a manifestazioni trombotiche. (Trousseau 1865) (Milsom C. 2007).

Nel corso degli anni dettagli sono stati forniti sui meccanismi biologici che potrebbero sostenere il mutuo ruolo patogenetico tra cancro e trombosi. Se è vero che il cancro, in particolare alcune neoplasie come quelle polmonari, del colon, prostata e mammella, è in grado di sbilanciare il sistema coagulativo in senso protrombotico favorendo quindi lo sviluppo eventi trombotici, esistono anche evidenze a sostegno di un ruolo di supporto da parte del processo coagulativo in favore della proliferazione neoplastica (Rickle F.R. 2001) (Lee A.Y.Y. 2003).

In maggior dettaglio, le neoplasie avanzate correlano con l'attivazione della coagulazione e per tale fenomeno è stato coniato il termine coagulopatia del cancro. La trombina è una serin-proteasi plasmatica con un ruolo fondamentale nella cascata coagulativa. La trombina infatti, dopo attivazione, determina clivaggio del fibrinogeno in fibrina, ultima tappa nella formazione del trombo. Tuttavia la funzione della trombina non si limita alla coagulazione. Essa è anche implicata nella promozione della crescita neoplastica e nella metastatizzazione come risultato del suo coinvolgimento nella regolazione di molti processi cellulari critici come la proliferazione cellulare, l'adesione cellulare, l'angiogenesi e l'invasione (Rickles F.R. 2003, Hongbao M. 2008). La trombina ed altri fattori della coagulazione esercitano le loro funzioni attraverso "recettori attivati da proteasi" o PAR (Coughlin S.R. 2000). PAR-1, il recettore prototipico della famiglia, viene attivato dalla trombina come conseguenza del clivaggio del suo dominio amino terminale extracellulare. Il clivaggio di PAR-1 libera un nuovo dominio amino terminale il

quale funziona da ligando per lo stesso recettore, innescando così una via di segnale intracellulare mediata da diverse proteine G eterotrimeriche. L'attivazione di tale signaling attiva diverse vie come la fosfatidil-inositolo 3-chinasi (PI3K), la cascata della protein-chinasi mitogeno-attivata (MAPK), la chinasi Rho, la fosfolipasi C beta, tutte in grado di promuovere la proliferazione, migrazione e adesione cellulare (Caunt M. 2006) (Nierodzik M. L. 2006) (I. S. Hu L. 2009) . Non è pertanto sorprendente che PAR-1 giochi un ruolo rilevante nella promozione della progressione neoplastica in diversi tipi di cancro come il melanoma, le neoplasie prostatica, mammaria e polmonare (Contrino J. 1996) (Caunt M. 2006) (Fujomoto D. 2010) (Liu J. 2003) (Radjabi A.R. 2008)

I nostri dati sperimentali confermano in parte precedenti osservazione relative agli effetti proliferativi della trombina. Gli effetti mitogenici della trombina sono stati osservati per la prima volta negli anni 70 e successivamente confermati sia in cellule normali che in cellule neoplastiche (Chen L.B. 1975).

Nel nostro modello sperimentale abbiamo osservato una induzione della proliferazione cellulare utilizzando la linea cellulare di tumore mammario MCF-7, mentre tale effetto non è stato osservato su cellule derivate da glioblastoma umano. In queste cellule neoplastiche la trombina non ha dimostrato effetti sulla proliferazione a basse concentrazione mentre, inaspettatamente, ha dimostrato effetti opposti di inibizione della proliferazione in-vitro quando utilizzata a concentrazioni crescenti. Vi sono diverse possibili spiegazioni a questo risultato. Il test MTT utilizzato per quantificare la proliferazione cellulare in vitro, misura la proliferazione come aumento dell'attività mitocondriale della cellula. E' possibile che tale attività venga rapidamente saturata dalle piccole dimensioni del pozzetto utilizzato per gli esperimenti. In alternativa è possibile che la linea cellulare di glioblastoma sia meno resistente alle condizioni di deprivazione

di siero o starving, necessaria prima di indurre la proliferazione per sincronizzare le cellule in fase G0-G1, favorendo quindi una successiva proliferazione della maggior parte delle cellule in coltura. Questa ipotesi è supportata dalla nostra osservazione preliminare di aumento significativo della morte cellulare delle cellule U87 sottoposte a starving prolungato, mentre la linea MCF-7 si è dimostrata più resistente a tale deprivazione. In realtà, in letteratura altri ricercatori hanno osservato una risposta bimodale della crescita di cellule neoplastiche esposte alla trombina in-vitro (Zain J 2000) hanno descritto gli effetti proliferativi della trombina su linee cellulari di melanoma solo per concentrazioni fino a 0.5 /mL, mentre per concentrazioni superiori si osservava una inibizione della proliferazione rispetto ai controlli. A queste concentrazioni la trombina si è dimostrata responsabile di arresto del ciclo cellulare e induzione di apoptosi. I meccanismi responsabili di questo effetto dicotomico non sono stati chiaramente elucidati ma sembrerebbe importante la durata della stimolazione di PAR-1 da parte della trombina stessa.

Dabigatran è un inibitore diretto della trombina che si lega in maniera reversibile al sito attivo della trombina prevenendo in questo modo la conversione del fibrinogeno in fibrina (Dahl O.E. 2012). La trombina legata al dabigatran non è in grado di attivare PAR-1, a sua volta non in grado di attivare le complesse vie di signaling responsabili di multipli effetti biologici cellulari. Tra questi meccanismi, alcuni controllano la proliferazione cellulare, confermati nel nostro modello nel quale dabigatran si è dimostrato efficace nel prevenire la proliferazione cellulare neoplastica indotta da trombina. Vi sono chiare evidenze sperimentali tale meccanismo di inibizione della proliferazione del dabigatran sulla trombina non sono mediate direttamente dal PAR-1 ma da una inattivazione della trombina *per se* (Bogatkevich G.S. 2009). Tale osservazione si è confermata anche nei nostri esperimenti nei quali l'incubazione delle cellule neoplastiche con dabigatran in

assenza di trombina non ha fatto osservare effetti significativi sulla proliferazione cellulare

Le concentrazioni di dabigatran necessarie all'effetto inibitorio della crescita cellulare indotta da trombina è risultato tra 100 e 500 nM, nel range delle concentrazioni plasmatiche necessarie per l'effetto anticoagulante della molecola (Li Y.Z. 2013).

Se è vero che vi sono evidenze di una induzione di apoptosi da parte della trombina a concentrazioni elevate, i nostri dati sperimentali indicano che la stessa proteasi è in grado di proteggere cellule neoplastiche dalla morte cellulare e che dabigatran è in grado di ripristinare la sensibilità di base delle stesse cellule. La protezione da morte cellulare in presenza di trombina è già stata osservata e riportata in letteratura e trova basi molecolari nella inibizione dell'espressione di proteine pro-apoptotiche come Bim da parte della trombina (Chalmers C.J. 2003). E' pertanto possibile in un microambiente neoplastico, non solo la proliferazione ma anche la morte cellulare possa essere oggetto di modulazione da parte della proteasi. Anche in questo meccanismo favorente la crescita neoplastica, il dabigatran si è dimostrato efficace nel contrastare gli effetti della trombina.

In letteratura esiste un solo studio nel quale siano stati dimostrati meccanismi diretti da parte della trombina nell'induzione della proliferazione cellulare. I nostri risultati pertanto sono importanti anche per confermare o meno precedenti osservazioni. Uno studio importante al riguardo aveva dimostrato effetti diretti della trombina sul ciclo cellulare. In particolare, la trombina agirebbe inducendo l'attivazione del ciclo cellulare e la progressione dalla fase G0-G1 alla fase S. (Hu L. I. S., 2009) Nel nostro studio abbiamo confermato che la trombina favorisce la progressione verso la fase S e che tale effetto è probabilmente mediato da una down-regolazione della proteina inibitrice del ciclo

cellulare, p27^{Kip1}, e da un aumento dell'espressione della ciclina D1. L'espressione della ciclina D1 è un importante meccanismo alla base della proliferazione neoplastica (Massaguè, 2004). Oltre ad avere confermato tale meccanismo indotto da trombina, i nostri dati indicano chiaramente che dabigatran è in grado di spegnere la proprietà di attivazione del ciclo cellulare e progressione verso la fase S della trombina, ripristinando così una crescita cellulare basale.

Gli effetti di progressione neoplastica della trombina si sono dimostrati attivi anche nel processo di metastatizzazione. Cellule neoplastiche preincubate con trombina presentano maggior potere metastatico in modelli animali (Nierodzik ML1 1992)). Una delle ipotesi è che la trombina favorisca l'acquisizione di potere metastatico da parte di cellule neoplastiche già programmate in questo senso. Vi sono tuttavia anche dati a dimostrazione di un incremento delle capacità adesive delle cellule neoplastiche a cellule endoteliali, processo che potrebbe poi favorire la transmigrazione delle cellule stesse e la disseminazione a distanza.

E' dibattuto se la trombina induca anche un movimento cellulare direzionale in presenza di gradiente ovvero agisca da agente chemotattico. Henrikson et al hanno osservato un aumento della capacità di invasione da parte di cellule neoplastiche trattate con trombina ma senza capacità chemotattiche alla luce del fatto che l'invasività aumentata in assenza di gradiente. La trombina agirebbe quindi da stimolatore della motilità senza direzionalità (Henrikson K.P. 1999). I nostri dati non sono completamente concordanti con queste osservazioni poiché in presenza di gradiente, la trombina è in grado di aumentare il passaggio delle cellule neoplastiche attraverso il filtro della camera di transmigrazione. Questo non può essere attribuito solo ad un aumento *random* della motilità poiché l'annullamento del gradiente ottenuto aggiungendo trombina ad entrambe le camere

superiore ed inferiore del sistema di transmigrazione, annulla l'incremento del numero di cellule in grado di attraversare il filtro rispetto alla condizione chemotattica della trombina presente solo nella camera inferiore.

L'effetto chemotattico della trombina è stato osservato sia nelle cellule tumorali sia nella transmigrazione di cellule endoteliali. Queste ultime hanno dimostrato una maggiore sensibilità a basse concentrazioni di trombina, dato non completamente inaspettato alla luce di dati pubblicati in passato i quali, anche se in un ambito diverso, dimostrano un effetto di stimolazione su cellule endoteliali a basse concentrazioni, stimolazione che si trasforma in inibizione quando le concentrazioni superano 0,3 U/ml (Haralabopoulos, 1997). In tutti i sistemi studiati, dabigatran si è dimostrato efficace nel prevenire la migrazione cellulare indotta da trombina.

Il processo di progressione neoplastica dipende oltre che dalla capacità della cellula di proliferare e acquisire potenzialità invasive, anche sulla trasformazione del microambiente sede di metastatizzazione. La neoangiogenesi, a questo scopo, rappresenta un processo critico e la trombina si è dimostrata in grado di favorire tale processo. In particolare, la trombina è in grado di influenzare l'espressione di regolatori come Twist e di fattori di crescita come Gro- α . I nostri dati confermano questa proprietà della trombina e dimostrano soprattutto l'effetto antagonizzante di dabigatran sull'espressione di queste proteine, efficace nel ridurre la formazione di neovasi.

I nostri dati sperimentali unitamente alla consistente produzione scientifica sull'argomento sostengono un ruolo della trombina nella progressione neoplastica. Tuttavia tali osservazioni debbono essere translate nella pratica clinica per assumere maggiore rilevanza e fornire potenziali targets terapeutici. Quali sono le evidenze cliniche che supportano la rilevanza delle nostre osservazioni? Vi sono sufficienti evidenze al

riguardo. In particolare, è stato osservato in studi di significativa numerosità, che pazienti neoplastici trattati con terapia anticoagulante la sopravvivenza era significativamente superiore rispetto a soggetti con analoga neoplasia ma non trattati con anticoagulanti. Tali osservazioni sono state confermate sia con l'uso di anticoagulanti orali tradizionali come la warfarina sia con terapia eparinica. (Zacharski LR 19984); (Lebeau B 1994), (Altinbas M 2004).Altri autori hanno osservato vantaggi sulla progressione neoplastica in paziente trattati con eparina a basso peso molecolare (LMWH) ma non con warfarina (Klerk CP 2005). Questi effetti positivi delle LMWH possono essere spiegati anche da effetti non dipendenti dal potere anticoagulante. Ad esempio, è stato descritto un effetto di inibizione del legame tra cellula neoplastica e cellula endoteliale/piastrina mediato dalla P-selectina (Stevenson J.L. 2005)E' interessante sottolineare che, nel caso delle LMWH, l'effetto anticoagulate predominante è legato all'attività anti-fattore Xa, anche se questi farmaci inibiscono anche la trombina pur in maniera minore. D'altra parte il fattore Xa è necessario alla formazione di trombina e pertanto indirettamente le LMWH potrebbero risultare efficaci nella progressione neoplastica attraverso meccanismi indiretti. Questi dati e i numerosi risultati ottenuti su modelli animali sostengono un ruolo della trombina nel mantenimento del "tumor dormancy" o quiescenza della cellula neoplastica. In altre parole, è verosimile che la trombina favorisca la trasformazione di cellule neoplastiche che altrimenti non raggiungerebbero un fenotipo aggressivo sufficiente ad emergere e progredire. I nostri dati supportano l'efficacia di farmaci inibitori della trombina nel controllo della crescita neoplastica. Tuttavia l'utilizzo di molecole come il dabigatran sarebbe riservato a pazienti con neoplasia che sviluppano fenomeni trombotici. Difficile ipotizzare un impiego di molecole anticoagulanti in pazienti senza trombofilia. Tuttavia le evidenze fornite dal nostro studio, unitamente ai dati della letteratura, forniscono un forte razionale per lo sviluppo di farmaci citostatici con affinità per il PAR-1.

In conclusione, la trombina sostiene meccanismi cellulari che favoriscono la progressione neoplastica. L'inibitore della trombina, dabigatran, annulla tali effetti proliferativi e suggerisce l'utilizzo di nuovi targets contro cui sviluppare nuove molecole da utilizzare nell'armamentario di farmaci antineoplastici.

BIBLIOGRAFIA

- Altinbas M, Coskun HS, Er O, Ozkan M, Eser B, Unal A, Cetin M, Soyuer S. «A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low-molecular-weight heparin in small cell lung cancer.» *J Thromb Haemost* 2 (2004): 1266-1271.
- Antoinak S., Pawlinski R., Nackman R., «Protease-activated Receptors and Myocardial Infarction.» *IUBMB Life* 63 (2011): 383-389.
- Balzarotti M., Fontana F., Marras C., Boiardi A., Croci D., Ciusani E., Salmaggi A., «In vitro study of low molecular weight heparin effect on cell growth and cell invasion in primary cell cultures of high-grade gliomas.» *Onc. Research*, 2006: 245-259.
- Bar-Shavit R., Ginzburg Y, Maoz M, Vlodaysky I, Peretz T. «The involvement of thrombin RGD in metastasis: characterization of a cryptic adhesive site.» *Isr J Med Sci.* 31 (1995): 86-94.
- Billroth, T. «lectures on surgical pathology and therapeutics. a handbook for student practioners.» *New Sindenham society.* 1877-78.
- Black P.C., Mize G.J., Karlin P., Greenberg D.L., Hawely S.J., True L.D., Vessella R.L., Takayma T.K., «Overexression of Protease-activated receptor 1, 2 and 4 (PAR-1,2 and-4) in prostate cancer.» *The Prostate* 67 (2007): 743-756.
- Bogatkevich G.S., Ludwicka-Bradley A., Silver R.M., «Dabigatran, a direct thrombin inhibitor, demonstrates antifibrotic effects on lung fibroblasts.» *Arthritis Rheum.* 60 (2009): 3455-3464.
- Brighton T. «New oral anticoagulant drugs-mechanism of action.» *Australian Prescriber* 33 (2010): 38-41.
- Caine G.J., Stonelake P.S., Lip G.Y.H., Kehoe S.T., «The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate.» *neoplasia*, 2002: 465-473.
- Camerer E., Qazi A.A., Duong D.N., Cornelissen I., Advincula R., Coughlin S.R. «Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis.» *blood*, 2004.
- Caunt M., Hu L., Tang T., Brooks P.C.p, Ibrahim S., Karpatkin S., «Growth-regulated oncogene is pivotal in Thrombin induced angiogenesis.» *Cancer Research*, 2006: 4125-4132.
- Chalmers C.J., Balmanno K., Hadfield K., Ley R., Cook S.J. «Thrombin inhibits Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death) expression and prevents serum-withdrawal-induced apoptosis via protease-activated receptor 1.» *Biochem J.* 375 (2003): 99-109.
- Chang L.H., Chen C.H., Huang D.Y., Pai H.C., Pan S.L., Teng C.M., «Thrombin induces expression of twist and cell motility via the Hypoxia inducible factor-1 alpha translational pathway in colonrectal cancer cells.» *Cellular physiology* 226 (2010): 1060-1068.
- Chen L.B., Buchanan JM. «Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin.» *PNAS* 82 (1975): 132-135.
- Contrino J., Hair G., Kretzer DL, Rickles F.R., «in situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation between the malignant phenotype of breast disease.» *Nat. Med.*, 1996: 2099-215.

- Coughlin S.R. «Thrombin signalling and protease-activated receptors.» *Nature*, 2000: 258-264.
- Dahl O.E. «New oral antithrombotics: focus on Dabigatran an oral, reversible direct thrombin inhibitor for the prevention and treatment of venous and arterial thromboembolic disorders.» *Vascular Health and Risk management* 8 (2012): 45-57.
- Danckwardt S., Hentze M., Kulozik A., «Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: Thrombin in hemostasis, cancer, and beyond.» *J Mol Med* 91 (2013): 1257-1271.
- DeFeo K., Hayes C., Chernick M., Van Ryn J., Gilmour S.K., «Use of Dabigatran etexilate to reduce breast cancer progression.» *Cancer Biology & Therapy* 10 (2004): 1001-1008.
- Di Cera E. «Thrombin.» *Mol aspects Med*, 2008: 203-254.
- Ebner T., Wagner K., Wienen W. «Dabigatran Acylglucuronide, the Major Human metabolite of Dabigatran: In vitro Formation, Stability, and Pharmacological Activity.» *Drug metabolism and disposition* 38 (2010): 1567-1575.
- Elyamany G., Mattar Alzahrani A., Bukhary E., «Cancer-associated Thrombosis: an Overview.» *Clinical Medicine insights: Oncology*, 2014: 129-138.
- Fenton J.W., OFOSU F.A., Brezniak M.A., Hassouna H.I., «Thrombin and antithrombotic.» *seminars in thrombosis and hemostasis* 24 (1998): 87-91.
- Fujimoto D., Hirano Y., Goi T., Katajama K., Matsukawa S., Yamaguchi A., «The activation of protease-activated receptor-1 (PAR-1) mediates gastric cancer proliferation and invasion.» *Cancer*, 2010: 443-452.
- Gerotziakas G.T., Mahè I., Elalamy I., «New orally active anticoagulant agents for the prevention and treatment of venous thromboembolism in cancer patients.» *therapeutics and Clinical Risk Management* 10 (2014): 423-436.
- Goldsack N.R., Chambers R.C., Dabbagh K., Laurent G.J., «Molecules in focus Thrombin.» *The international Journal of Biochemistry & Cell biology* 30 (1998): 641-646.
- Gonzales J.N., Kim K.M., Zemskova M.A., Raflikov R., Heeke B., Varn M.N: Kennedy T.P., Verin A.D., Zemskov E.A., «Low anticoagulant heparin blocks thrombin induced endothelial permeability in a PAR- dependent manner.» *Vasc. Pharmacol* 62 (2014): 63-71.
- Green D., Karpatkin S., «Role of thrombin as a tumor growth factor.» *Cell Cycle* 9 (2010): 656-661.
- Gresele P., Fuster V., Lopez J. A., Page C. P., Vermylen J. *Platelets in hematologic and Cardiovascular disorder*. Cambridge, 2008.
- Han N., Jin K., He K., Cao J., Teng L., «Protease receptors in cancer: a systematic review.» *oncology letters*, 2011: 599-608.
- Hara Y., Steiner M., Baldini M.G., «Characterization of the platelet- aggregating activity of tumor cells.» *Cancer Res.*, 1980: 1217-1220.
- Harabodoulos G.C., Grant D.S., Kleinman H.K., Maragoudakis M.E., «Thrombin promotes endothelial cell alignment in matrigel in vitro angiogenesis in vivo.» *The american Physiological society*, 1997: C239-C245.

- Henrikson K.P., Salazar S.L., Fenton J.W., Pentecost B.T., «Role of thrombin in receptor in breast cancer invasiveness.» *Br J cancer* 79 (1999): 401-406.
- Hongbao M., Young J., Shen C., «Thrombin.» *Nature and science* 6 (2008): 90-93.
- Hu L., Ibrahim S., Liu C., Skaar J., Pagano M., Karparkin S., «Thrombin Induces Tumor Cell Cycle Activation and Spontaneous Growth by Down-regulation of p27Kip1, in Association with the Up-regulation of Skp2 and MiR-222.» *Cancer Res* 69 (2009): 3374-3381.
- Hu L., Roth J.M., Brooks P., Ibrahim S., Karparkin S., «Twist Is Required for Thrombin-Induced Tumor Angiogenesis and Growth.» *Cancer research*, 2008: 4296-4302.
- Hughes C.S., Postovit L.M., Lajoie G., «Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture.» *Proteomics*, 2010: 1886-1890.
- Ichikawa J, Cole HA, Magnussen RA, Mignemi NA, Butler M, Holt GE, O'Rear L, Yuasa M, Pabla B, Haro H, Cates JM, Hamm HE, Schwartz HS, Schoenecker JG. «Thrombin induces osteosarcoma growth, a function inhibited by low molecular weight heparin in vitro and in vivo: procoagulant nature of osteosarcoma.» *Cancer*, 2012: 2494-2506.
- Juncker Jensen A., Deryugina E.I., Rimann I., Zaiac E., Kupriyanova T.A. Engelholm L.H., Quigley J.P., «Tumor MMP-1 activates endothelial PAR-1 to facilitate vascular intravasation and metastatic dissemination.» *Cancer res.* 73 (2013): 4196-4211.
- Kang Y., Massagué J., «Epithelie-mesenchymal Transitions: Twist in development and metastasis.» *cell*, 2004: 277-279.
- Karparkin S., Nierodzik M.L. Klepfish A., «Role of platelets and thrombin in cancer.» *Vessels*, 1996: 17-23.
- Kim MH, Curry FR, Simon SI. «Dynamics of neutrophil extravasation and vascular permeability are uncoupled during aseptic cutaneous wounding.» *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2009: 848-856.
- Klerk CP, Smorenburg SM, Otten HM, Lensing AW, Prins MH, Piovella F, Prandoni P, Bos MM, Richel DJ, van Tienhoven G, Büller HR. «The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy.» *J Clin Oncol* 23 (2005): 2130-2135.
- Lebeau B, Chastang C, Brechot JM, Capron F, Dautzenberg B, Delaisements C, Mornet M, Brun J, Hurdebourcq JP, Lemarie E. *Cancer* 74 (1994): 38-45.
- Lee A.Y.Y., Levine M.N. «Venous Thromboembolism and Cancer: Risk and Outcomes.» *Circulation* 107 (2003): I-17- I-21.
- Lee C.J., Ansell J.E., «Direct Thrombin inhibitors.» *Brit J Clin Pharmacol* 72 (2011): 581-592.
- Li Y.Z., Gong G.Q., Yang W.H., Wang X.H., Jiang M.L., Zhou Y., Yang X.Z., Xu Y.G., He G.W., «Antithrombotic activity of HY023016, a novel Dabigatran prodrug evaluated in animal thrombosis models.» *Thromb Res* 131 (2013): 425-435.
- Liu J., Bastian M., Kohlschein P., Schuff-Werner P., Steiner M., «Expression of functional protease-activated receptor-1 in human prostate cancer cell line.» *urol Re.*, 2003: 163-168.

- Macfarlane S.R., Seatter M.J., Kanke T., Hunter G.D., Plevin R., «Protease activated receptors.» *pharmacol rev*, 2001: 245-282.
- Massanguè J. «G1 cell cycle control and cancer.» *nature*, 2004: 298-306.
- Melnikova V.O., Villare G.J., Bar-Eli M., «Emerging Roles of PAR-1 and PAFR in melanoma metastasis.» *Cancer microenvironment*, 2008: 103-111.
- Metha P. «Potential role of platelets in the pathogenesis of tumor metastasis.» *Blood* 63 (1984): 55-63.
- Milsom C., Yu J., May L., Meehan B., Magnus N., Al-Nedawi K., Luyendyk J., Weitz J., Klement P., Broze G., Mackman N., Rak J., «The role of tumor-and host-related tissue factor pools in oncogene-driven tumor progression.» *Thromb res* 120 (2007): 82-91.
- Morrow D.A., Braunwald E., Bonaca M.P., Ameriso S.F., Dalby A.J., Fish M.P., Fox K.A.A., Lipka L.J., Liu X., Ncolau J.C., et al., «Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events.» *New engl J Med* 366 (2012): 1404-1413.
- Moshal KS, Tyagi N, Moss V, et al. «Early induction of matrix metalloproteinase-9 transduces signaling in human heart end stage failure.» *J Cell Mol Med*. 9 (2005): 704-713.
- Nierodzik M. L., Karpatkin S., «Thrombin induces tumor growth, metastasis and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype.» *Cancer Cell*, 2006: 355-362.
- Nierodzik M.L., Kui Chen, Takeshita K., Li J.J., Huang Y.Q., Feng X.F., D'Andrea M.R., Andrade-Gordon P., Karpatkin S., «Protease-Activated Receptor 1 (PAR-1) Is Required and Rate-Limiting for Thrombin-Enhanced Experimental Pulmonary Metastasis.» *Blood*, 1998: 36894-37000.
- Nierodzik ML1, Kajumo F, Karpatkin S. «Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and tumor metastasis in vivo.» *Cancer Res* 52 (1992): 3267-3272.
- Niers T.M.H., Brüggemann L.W., Klerk C.P.W., Muller F.J.M., Buckle T., Reitsma P.H., Richel D.J., Spek C.A., Van Tellingen O., Van Noorden C.J.F., «Differential effects of anticoagulants on tumor development of mouse cancer cell lines B16, K1735 and CT26 in lung.» *Clinical & experimental metastasis*, 2009: 171-178.
- Pagel C.N., de Niese M.R., Abraham L.A., Chinni C., Song S.J., Pike R.N., Mackie E.J., «Inhibition of osteoblast apoptosis by thrombin.» *Bone*, 2003.
- Palumbo JS., Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, Jirousková M, Degen JL. «Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells.» *blood*, 2005: 178-185.
- pathway, Thrombin stimulation of inflammatory breast cancer leads to aggressiveness via EGFR-PAR-1 PAK1. «Oshiro K., BuiNguyen T.M., Divijndra Natha R.S., Schwart A.M., Levin P., Kumarl R., .» *Int J Biol Markers. ; 27(4): e305–e313. doi:10.5301/JBM.2012.10437. 27* (2013): 305-313.
- Peng H.H., Zhang X., Cao P.G., «MMP-1/PAR-1 signal transduction axis and its prognostic impact in esophageal squamous cell carcinoma.» *Braz J Med Biol Res* 45 (2012): 86-92.

- Queiroz KC1, Shi K, Duitman J, Aberson HL, Wilmink JW, van Noesel CJ, Richel DJ, Spek CA. «Protease-activated receptor-1 drives pancreatic cancer progression and chemoresistance.» *Int J cancer* 135 (2014): 2294-2304.
- Radjabi A.R., Sawada K., Jagadeeswaran S., Eichbichler A., Kenny H.A., Montag A., Bruno K., Lengyel E.. «Thrombin induces tumor invasion through the induction and association of matrix metalloproteinase-9 and beta1-integrin on the cell surface.» *J Biol Chem.*, 2008: 2822-2834.
- Rak J., Milsom C., Magnus N., Yu J.,. «tissue factor in tumor progression.» *Best practice & research clinical haematology* 22 (2009): 71-83.
- Rickle F.R., Levine M.N. «Epidemiology of thrombosis and cancer.» *Acta Haematol* 106 (2001): 6-12.
- Rickles F.R., Patierno R., Fernandez P.,. «Tissue factor, Thrombin and cancer.» *CHEST* 124 (2003): 58s-68S.
- Roussos E.T., Condeelis J.S. Patsialou A.,. «Chemiotaxis in cancer.» *nat rev cancer*, 2011: 573-587.
- Sayyah J, Bartakova A, Nogal N, Quilliam LA, Stupack DG, Brown JH. « The Ras-related Protein, Rap1A, Mediates Thrombin-stimulated, Integrin-dependent Glioblastoma Cell Proliferation and Tumor Growth.» *J Biol Chem.* 289 (2014): 17689-98.
- Schiappacassi M., Lovat F., Canzonieri V., Belletti B., Berton S., Di Stefano D., Vecchione A., Colombatti A., Baldassarre G.,. «p27Kip expression inhibits glioblastoma growth, invasion, and tumor-induced neoangiogenesis.» *moleculare cancer Therapeutics*, 2008: 1164-1175.
- Sedda S., Marafini I., Caruso R., Pallone F., Monteleone G.,. «Proteinase activated-receptors-associated signaling in the control of gastric cells.» *World J Gastroenterol* 20 (2014): 11977-11984.
- Short N.J., Connors J.M.,. «New oral anticoagulant and the cancer patient.» *Oncologist* 19 (2014): 82-93.
- Snyder K. M., Kessler C.M.,. «The pivotal Role of Thrombin in cancer biology and tumorigenesis.» *Sem Thromb Hemost* 34 (2008): 734-741.
- Soff G.A. «A new generation of Oral Direct Anticoagulant.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32 (2012): 569-574.
- Stevenson J.L., Choi S.H., Varki A.,. «-different metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparin-correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity.» *-clin cancer res* 11 (2005): 7003-7011.
- Sun W.Y., Witte D.P., Degen J.L., Colbert M.C., Burkat M.C., Holmback K., Xiao Q., Bugge T.H., Degen S.J.,. «Prothrombin deficiency results in embryonic lethality and fatal neonatal hemorrhage caused by prothrombin deficiency in mice.» *Proc Natl Acad Sci* 95 (1998): 7597-7602.

- Tohgo A., Tanaka N.G., Ogawa H., «Platelet-aggregating activities of metastasizing tumor cells. Effects of cell surface modification on thrombin generation, platelet aggregation and subsequent lung colonization.» *Invasion metastasis* 6 (1986): 58-68.
- Trousseau, A. «Plegmasie alba dolens.» *Clinique Medical de Hotel-Dieu de Paris*. Londra: New Sydenham Society, 1865. 94.
- Uziely B., Turm H., Maoz M., Cohen I., Maly B., Bar-Shavit R., «PAR gene: Molecular Probes to pathological assessment in Breast Cancer Progression.» *Pathology Research International* 2011 (2001).
- Villares G.J., Dobroff A.S., Wang H., Zigler M., Melnikova V.O., Huang L., Bar-Eli M. «Overexpression of Protease Activated Receptor-1 Contributes to Melanoma Metastasis via Regulation of Connexin 43.» *Cancer res* 69 (2009): 6730-6737.
- Wang J., Jin H., Hu Y., Keep R.F., Xi G., «Role of protease-activated receptor-1 in brain injury after experimental global cerebral ischemia.» *Stroke* 43 (2012): 2476-2482.
- Wu Z., Zeng Y., Zhong M., Wang B., «Targeting A549 lung adenocarcinoma cell growth and invasion with protease activated receptor 1 siRNA.» *Mol Med Rep* 9 (2014): 1787-1793.
- Yang J., Mani S.A., Donaher J.L., Ramaswami S., Itzykson R.A., Come C., Savagne P., Gitelman I., Richardson A., Weinberg R., «Twist, a master regulator of morphogenesis plays an essential role in tumor metastasis.» *Cell*, 2004: 827-939.
- Yin Y.J., Salah Z., Grisar-Granovsky S., Cohen I., Cohen Even-Ram S., Maoz M., Uziely B., Peretz T., Bar-Shavit R., «Human Protease-Activated Receptor 1 Expression in malignant epithelial.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003: 940-944.
- Yuan T.C., Lin M.F., «Protease activated receptor-1: a role in prostate cancer metastasis.» *Clinical prostate cancer* 3 (2004): 189-191.
- Zacharski LR, Henderson WG, Rickles FR, Forman WB, Cornell CJ Jr, Forcier RJ, Edwards RL, Headley E, Kim SH, O'Donnell JF, et al. «Effect of warfarin anticoagulation on survival in carcinoma of the lung, colon, head and neck, and prostate. Final report of VA Cooperative Study #75.» *cancer* 53 (19984): 2046-2052.
- Zain J, Huang YQ, Feng X, Nierodzik ML, Li JJ, Karpatkin S. «Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells.» *Blood* 85 (2000): 3133-3138.
- Zhang X., Wang W., True DL., Vessella R.L., Takayama T.K., «Protease-Activated Receptor-1 is Upregulated in Reactive Stroma of Primary Prostate Cancer and Bone Metastasis.» *Prostate* 69 (2009): 727-736.
- Zhong Y.C., Zhang T., Di W., Li W.P., «Thrombin promotes epithelial ovarian cancer cell invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition.» *J Gynecol Oncol* 24 (2013): 265-272.
- Zhu Q1, Luo J, Wang T, Ren J, Hu K, Wu G., «The activation of protease-activated receptor 1 mediates proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells.» *Oncol Rep* 28 (2012): 255-261.

Zoubine M.N., Ma J.Y., Smirnova I.V., Citron B.A., Festoff B.W.,. «A molecular mechanism for synapse elimination: novel inhibition of locally generated thrombin delays synapse loss in neonatal mouse muscle.» *Dev Biol* 179 (1996): 447-457.