

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΣΑΡΚΟΠΕΝΙΑ ΣΤΟΝ
ΚΑΡΚΙΝΟ»**

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΚΟΤΤΟΡΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, *Επιβλέπουσα*

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΗΜΑΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ, μέλος

ΒΑΡΒΑΡΑ ΤΡΑΧΑΝΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, μέλος

ΛΑΡΙΣΑ, 2020

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE



POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”

MASTER’S THESIS
«EPIGENETICS AND CANCER CACHEXIA (SARCOPENIA)»

ANASTASIA KOTTOROU

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα βιβλιογραφική διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Γενετική του Ανθρώπου-Γενετική Συμβουλευτική» του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστώ πολύ την Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κ. Ασπασία Τσέζου, επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, γιατί μου δόθηκε η ευκαιρία να εντρυφήσω σε ένα θέμα πολύ ενδιαφέρον και ζέον για τους ογκολογικούς ασθενείς, όπως είναι η καρκινική καχεξία, για την καθοδήγησή της και την συνολική επίβλεψη της διπλωματικής.

Ευχαριστώ επίσης τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Κωνσταντίνο Δήμα και την Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογία κ. Βαρβάρα Τραχανά για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, ευχαριστώ τον σύζυγό μου, Φωτεινό Δημητρακόπουλο για τη συνεχή στήριξή του σε όλα τα επίπεδα, συμπεριλαμβανομένου και του επιστημονικού επιπέδου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καχεξία, αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό σύνδρομο το οποίο χαρακτηρίζεται από απώλεια σκελετικής μυϊκής μάζας με ή χωρίς ατροφία λιπώδους ιστού, και δεν αναστρέφεται με θρεπτική υποστήριξη, στα πλαίσια χρόνιας συστηματικής φλεγμονής και μεταβολικών διαταραχών. Μεσολαμβάνεται από φλεγμονώδη αντίδραση, και προσβάλλει περίπου το 50% όλων των ασθενών με καρκίνο, λόγω της προφανούς συστηματικής φλεγμονής που σχετίζεται με τη νόσο. Η καρκινική καχεξία χαρακτηρίζεται από την απελευθέρωση προ-καχεκτικών κυτταροκινών και παραγόντων από τα καρκινικά κύτταρα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, απώλεια και ατροφία σκελετικών και καρδιακών μυών, αλλαγές στο ενεργειακό ισοζύγιο, αλλαγές στον ομοιοστατικό έλεγχο στο κεντρικό νευρικό σύστημα και απώλεια λιπώδους ιστού. Η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός των μοριακών μονοπατιών που οδηγούν στην καχεξία είναι πολύ σημαντικά για την κατανόηση της παθογένειας και την αναγνώριση νέων θεραπευτικών στόχων και βιοδεικτών. Τα τελευταία χρόνια, τα ncRNAs, όπως τα microRNAs, φαίνεται να ρυθμίζουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην παθογένεια της καρκινικής καχεξίας. Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει τον ρόλο των miRNAs, καθώς και κάποιων lncRNAs και circRNAs, κυρίως στην απώλεια μυϊκού και λιπώδους ιστού, χρησιμοποιώντας *in vitro* και/ή *in vivo* προσεγγίσεις. Η απορρυθμισμένη έκφραση πολλών microRNAs έχει παρατηρηθεί σε καχεκτικά ποντίκια και ασθενείς, υποδεικνύοντας τη συσχέτισή τους με διαφορετικά χαρακτηριστικά της καχεξίας και τη χρήση τους ως πιθανών βιοδεικτών ή θεραπευτικών στόχων. Επιπλέον, όλο και περισσότερα δεδομένα υπογραμμίζουν την ανάμιξη των κυκλοφορούντων και των εξωσωματικών miRNAs και πρωτεϊνών στην ενεργοποίηση και διατήρηση της συστηματικής φλεγμονής στον καρκίνο και στην καρκινική καχεξία. Η συστηματική φλεγμονή επιδρά αρνητικά στον μεταβολισμό των μυών, ρυθμίζοντας σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη σύνθεση και στην καταστροφή των πρωτεϊνών στους μυς, συμβάλλοντας στην απώλεια μυϊκής μάζας που παρατηρείται στην καρκινική καχεξία. Στο πλαίσιο αυτό, στην παρούσα εργασία γίνεται ανασκόπηση του ρόλου των ncRNAs και των επιγενετικών μηχανισμών γενικότερα, όπως η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών, στην καρκινική καχεξία.

Λέξεις- Κλειδιά: καχεξία, καρκίνος, miRNAs, ncRNAs, μεθυλίωση DNA

ABSTRACT

Cachexia is a multifactorial syndrome characterized by skeletal muscle loss, with or without adipose atrophy which cannot be reversed through nutritional support, in the context of systemic inflammation and metabolic disorders. It is mediated by inflammatory reaction and affects almost 50% of all cancer patients, due to prominent systemic inflammation associated with the disease. Cancer cachexia is characterized by release of pro-cachectic cytokines and factors by cancer and immune cells, skeletal and cardiac muscle loss and atrophy, alterations in energy balance, changes in the homeostatic control in the central nervous system and adipose loss. The identification and characterization of the molecular pathways that lead to cachexia play important role in understanding its pathogenesis and identification of new therapeutic targets and biomarkers. Recently, ncRNAs, like microRNAs, seem to regulate the signaling pathways that are implicated in cancer cachexia pathogenesis. Recent studies have showed the role of miRNAs, as well as some lncRNAs and circRNAs, mainly in muscle and adipose loss, using *in vitro* and/or *in vivo* approaches. MicroRNAs deregulated expression has been observed in cachectic mice and humans, suggesting their association with different cachexia features and their application as possible biomarkers or therapeutic targets. Moreover, there are increasing findings which highlight the involvement of circulating and exosomal miRNAs and proteins in activation and maintenance of systemic inflammation in cancer and cancer cachexia. Systemic inflammation affects negatively muscle metabolism, regulating signaling pathways that are involved in protein synthesis and degradation in muscles, contributing in muscle loss observed in cancer cachexia. In that context, the present study reviews the role of ncRNAs and epigenetics generally, including DNA methylation and histone modifications, in cancer cachexia.

Key words: cachexia, cancer, miRNAs, ncRNAs, DNA methylation

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	10
1. Σαρκοπενία.....	10
1.1. Ορισμός.....	10
1.2. Διάγνωση.....	12
1.3. Διαφορική διάγνωση.....	13
1.4. Επιδημιολογία.....	13
1.5. Παθοφυσιολογία και μοριακοί μηχανισμοί.....	14
1.6. Κατηγορίες σαρκοπενίας.....	16
1.7. Σαρκοπενία και ποιότητα ζωής.....	18
1.8. Θεραπεία.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	20
2. Καρκινική καχεξία.....	20
2.1. Διάγνωση.....	21
2.2. Επιπολασμός.....	23
2.3. Καχεξία στα πλαίσια παχυσαρκίας.....	26
2.4. Παθοφυσιολογία της καχεξίας.....	26
2.4.1. Αλλαγή στο ενεργειακό ισοζύγιο.....	27
2.4.2. Κντταροκίνες και παράγοντες προκαχεξίας.....	28
2.4.3. Ομοιοστατικός έλεγχος στο ΚΝΣ.....	34
2.4.4. Απώλεια λιπώδους ιστού.....	35
2.4.5. Καρδιακή μυϊκή ατροφία.....	36
2.5. Θεραπεία.....	36
2.6. Καχεξία και σαρκοπενία σε ασθενείς με καρκίνο.....	38
2.7. Καχεξία ως προγνωστικός δείκτης στον καρκίνο.....	41
2.8. Καχεξία ως προβλεπτικός δείκτης στον καρκίνο.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	43
3. Επιγενετική.....	43
3.1. Μεθυλίωση DNA.....	43
3.2. Τροποποίηση ιστονών.....	44
3.3. Non-coding RNAs.....	44

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	46
4. Ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στην καρκινική καχεξία.....	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	50
5. Ο ρόλος των ιστονών στην καρκινική καχεξία.....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	53
6. Ο ρόλος των non- coding RNAs στην καρκινική καχεξία.....	53
6.1. miRNAs	53
6.1.1. miRNAs και απώλεια μυϊκής μάζας.....	55
6.1.2. miRNAs και απώλεια λιπώδους ιστού.....	61
6.1.3. miRNAs και έλεγχος ομοιόστασης.....	61
6.1.4. miRNAs και καρκινική καχεξία.....	62
6.1.5. Κυκλοφορούντα miRNAs	68
6.1.5.1. Εξωσωματικά miRNAs στην καρκινική καχεξία.....	72
6.1.5.1.1. Εξωσωματικά miRNAs και μυϊκή απώλεια.....	74
6.1.5.1.2. Εξωσωματικά miRNAs και συστηματική φλεγμονή.....	76
6.2. lncRNAs και καρκινική καχεξία.....	78
6.2.1. lncRNAs και απώλεια μυών.....	79
6.2.2. lncRNAs και απώλεια λιπώδους ιστού.....	81
6.3. Κυκλικά RNAs και καρκινική καχεξία.....	82
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....	85
7. Επιγενετική και θεραπεία της καχεξίας.....	85
7.1. Αναστολείς αποακετυλασών και θεραπεία της καρκινικής καχεξίας.....	85
7.2. Τα miRNAs στη θεραπεία της καχεξίας.....	86
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	89
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	91

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η καχεξία ορίζεται ως μια συνεχόμενη απώλεια μυϊκής μάζας, με ή χωρίς απώλεια λιπώδους ιστού, η οποία οδηγεί σε λειτουργική βλάβη και δεν μπορεί να αντιστραφεί από συμβατική διατροφική υποστήριξη. Το σύνδρομο αυτό στην περίπτωση που σχετίζεται με τον καρκίνο έχει επιπτώσεις στην ποιότητα ζωής των ασθενών, εξαιτίας της σοβαρής αδυναμίας που αισθάνονται, μειώνει την ανταπόκριση των ασθενών στην αντικαρκινική θεραπεία και επομένως αυξάνει τη νοσηρότητα και τη θνητότητα, ενώ τα χημειοθεραπευτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως επιδεινώνουν την καρκινική καχεξία.

Το σύνδρομο της καρκινική καχεξίας χαρακτηρίζεται από την απελευθέρωση προκακεκτικών κυτταροκινών και παραγόντων από τα καρκινικά κύτταρα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, απώλεια και ατροφία σκελετικών και καρδιακών μυών, αλλαγές στο ενεργειακό ισοζύγιο, αλλαγές στον ομοιοστατικό έλεγχο στο κεντρικό νευρικό σύστημα και απώλεια λιπώδους ιστού. Η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός των μοριακών μονοπατιών που οδηγούν στην καχεξία είναι πολύ σημαντικά για την κατανόηση της παθογένειας και την αναγνώριση νέων θεραπευτικών στόχων και βιοδεικτών.

Τα τελευταία χρόνια, τα ncRNAs, όπως τα microRNAs φαίνεται να ρυθμίζουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην παθογένεια της καρκινικής καχεξίας. Η απορρυθμισμένη έκφραση πολλών microRNAs έχει παρατηρηθεί σε καχεκτικά ποντίκια και ασθενείς, υποδεικνύοντας τη συσχέτισή τους με διαφορετικά χαρακτηριστικά της καχεξίας και τη χρήση τους ως πιθανών βιοδεικτών ή θεραπευτικών στόχων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανασκόπηση και καταγραφή της βιβλιογραφίας που αφορά το ρόλο της επιγενετικής, συμπεριλαμβανομένων των ncRNAs, στην καχεξία και συγκεκριμένα στην καχεξία που σχετίζεται με τον καρκίνο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1. Σαρκοπενία

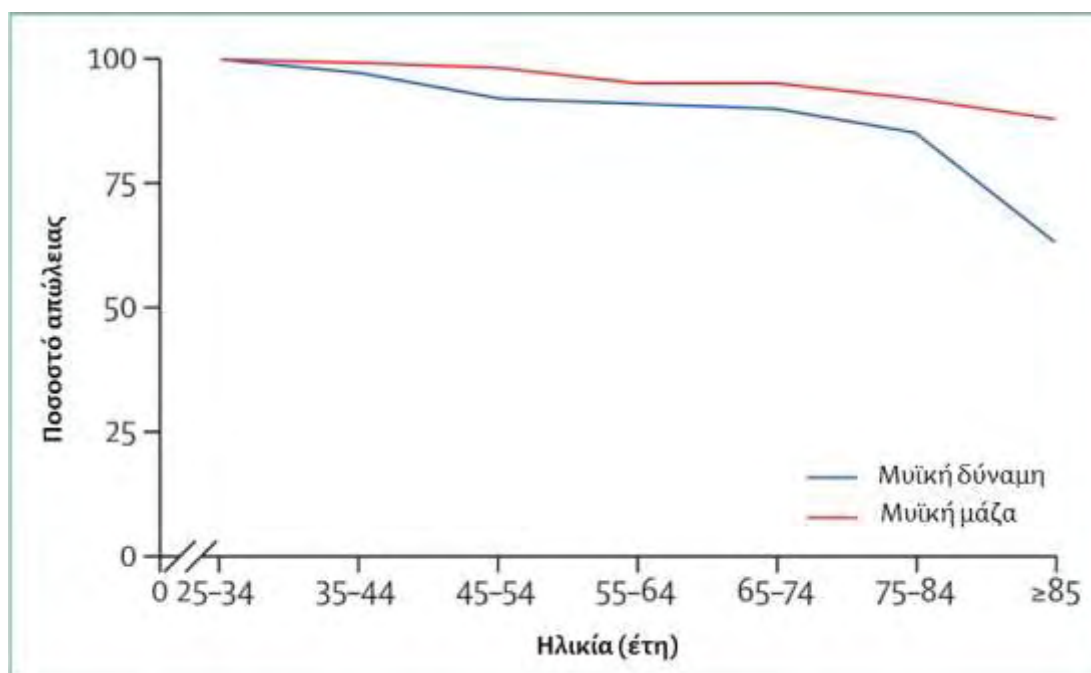
1.1 Ορισμός

Η σαρκοπενία (sarcopenia) πρωτοπεριγράφηκε τη δεκαετία του 1980 ως μια μείωση μυϊκής μάζας σχετιζόμενη με την ηλικία, η οποία επηρεάζει την κινητικότητα, τη διατροφική κατάσταση και την ανεξαρτησία του ατόμου ¹. Η σαρκοπενία ορίζεται ως μία προοδευτική και γενικευμένη σκελετική μυϊκή διαταραχή η οποία περιλαμβάνει μία επιταχυνόμενη απώλεια μυϊκής μάζας και λειτουργίας και έχει ως αποτέλεσμα ανεπιθύμητες ενέργειες όπως πτώσεις, εξασθένιση των λειτουργιών, εξάντληση και θνητότητα ².

Όταν πρωτοχρησιμοποιήθηκε ο όρος σαρκοπενία αναφερόταν σε απώλεια μυϊκής μάζας και λειτουργίας που σχετιζόνταν με την ηλικία ¹. Ωστόσο, για δεκαετίες ο όρος χρησιμοποιείτο για να περιγράψει τη μυϊκή ατροφία (χαμηλή μυϊκή μάζα), χωρίς καμία αναφορά στη λειτουργία, και με αυτή την έννοια χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα, σε πολλές μελέτες για τον καρκίνο ή για άλλες ασθένειες που σχετίζονται με την σαρκοπενία. Ο ορισμός που έχει καθιερωθεί σήμερα έχει προταθεί από την Ευρωπαϊκή ομάδα εργασίας για τη σαρκοπενία στους ηλικιωμένους (European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) ³ και έχει υιοθετηθεί από τις περισσότερες διεθνείς ενώσεις, όπως η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Γηριατρικής (European Geriatric Medicine Society), η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Κλινικής Διατροφής και Μεταβολισμού (The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism), η Ευρωπαϊκή Εταιρεία για τις Κλινικές και Οικονομικές πτυχές της οστεοπόρωσης (The European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis), οι νόσοι της οστεοαρθρίτιδας και του μυοσκελετικού (Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases), το Διεθνές Ίδρυμα οστεοπόρωσης (International Osteoporosis Foundation) και το Ευρωπαϊκό Τμήμα της Διεθνούς Ένωσης Γεροντολογίας και Γηριατρικής (International Association of Gerontology and Geriatrics European Region).

Στην κλινική πράξη, η EWGSOP δηλώνει ότι ένα άτομο με χαμηλή μυϊκή δύναμη και χαμηλή μυϊκή μάζα θα διαγνωσθεί με σαρκοπενία. Η σαρκοπενία μπορεί ευκολότερα να κατανοηθεί ως σκελετική μυϊκή διαταραχή ή ανεπάρκεια. Συνεπώς, μπορεί να εμφανιστεί ξαφνικά (συνήθως στα πλαίσια μίας οξείας νόσου ή ξαφνικής ακινητοποίησης, όπως κατά τη διάρκεια νοσηλείας στο νοσοκομείο) ή στη βάση

κάποιας χρόνιας νόσου. Η μυϊκή μάζα και δύναμη (παράλληλα με την οστική πυκνότητα) φτάνουν την κορύφωσή τους κατά τη νεανική ηλικία και μετά από ένα πλατώ, αρχίζουν μία σταδιακή μείωση με γρήγορη μείωση της δύναμης (Σχ. 1) ⁴.



Σχήμα 1. Ποσοστά απώλειας μυϊκής μάζας και δύναμης με την πάροδο της ηλικίας στους άνδρες (προσαρμογή από ⁵).

Η σαρκοπενία μπορεί κάποιες φορές να συσχετίζεται με την ισχνότητα, αλλά μπορεί επίσης να συνυπάρχει στην παχυσαρκία, οδηγώντας σε αναπηρία ή και θάνατο ⁶. Η σαρκοπενική παχυσαρκία αναγνωρίζεται συνήθως όταν συνυπάρχουν στο ίδιο άτομο χαμηλή μυϊκή μάζα και αυξημένο λίπος, αλλά μπορεί να διαφύγει της προσοχής όταν δίνεται φροντίδα για την παχυσαρκία, οδηγώντας σε δυσμενείς επιπτώσεις ⁷. Στη σαρκοπενία και στην παχυσαρκία εμπλέκονται κάποια κοινά παθοφυσιολογικά μονοπάτια ⁸. Η απώλεια μυών μπορεί επίσης να αυξήσει το κίνδυνο θανάτου και αναπηρίας κατά τη διάρκεια απώλειας βάρους σε παχύσαρκα άτομα ^{9,10}. Επιπλέον, έχει αναγνωριστεί και μία συσχέτιση ανάμεσα στη σαρκοπενία και στη δυσφαγία (σαρκοπενική δυσφαγία), η οποία απαιτεί ειδική προσέγγιση στην κλινική πράξη ¹¹.

1.2 Διάγνωση

Η διάγνωση για τη σαρκοπενία απαιτεί συνδυασμό μέτρησης μυϊκής μάζας, μυϊκής δύναμης και φυσικής κατάστασης. Η διάγνωση ξεκινά με μία μέτρηση μυϊκής δύναμης, συνήθως δύναμη της λαβής, η οποία έχει ένα καλά επικυρωμένο πρωτόκολλο ¹². Εάν η δύναμη λαβής είναι κάτω από τις τιμές αναφοράς, τότε τίθεται η υποψία της σαρκοπενίας. Διαφορετικά, άλλες αιτίες για τη χαμηλή μυϊκή δύναμη είναι η οστεοαρθρίτιδα χειρός και νευρολογικές διαταραχές.

Το επόμενο βήμα στη διαγνωστική διαδικασία είναι η μέτρηση μυϊκής μάζας. Υπάρχουν πολλές τεχνικές για τον υπολογισμό της μυϊκής μάζας, αλλά όλες έχουν περιορισμούς, όπως μεταβλητότητα στα αποτελέσματα, ανακολουθία των ορίων και αδύναμη συσχέτιση μυϊκής μάζας και αρνητικών επιπτώσεων στην υγεία ¹³. Η πιο αποτελεσματική διαδικασία που χρησιμοποιείται σήμερα είναι η χρήση μέτρησης απορρόφησης διπλής ενέργειας με ακτίνες X (dual energy X-ray absorptiometry, DXA), η οποία υπολογίζει τη μυϊκή μάζα. Η ανάλυση βιοηλεκτρικής αντίστασης (BIA), η αξονική τομογραφία και η μαγνητική τομογραφία έχουν επίσης θέση στη διάγνωση της σαρκοπενίας ¹⁴. Από το 2018, το υπερηχογράφημα έχει προταθεί ως εναλλακτική προσέγγιση για τη μέτρηση της μυϊκής μάζας στην κλινική πράξη, παρόλο που δεν έχει ακόμα προτυποποιηθεί και δεν έχει επικυρωμένα όρια ¹⁵.

Η μυϊκή ποιότητα είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται σήμερα διεθνώς, αλλά μπορεί να αναφέρεται σε δύο διαφορετικές έννοιες: τη σχέση ανάμεσα στη δύναμη και τη μάζα, και τα χαρακτηριστικά των μυών που μπορούν να παρατηρηθούν, όπως το ενδομυϊκό και το διαμυϊκό λίπος ¹⁶.

Η φυσική κατάσταση ορίζεται ως η ικανότητα του ατόμου να εκτελέσει σωματικές ασκήσεις, προκειμένου να λειτουργεί ανεξάρτητα στην καθημερινή του ζωή. Περιλαμβάνει τη συνολική λειτουργία του σώματος, παρά τη λειτουργία ενός μόνο οργάνου και δεν εξαρτάται μόνο από τους σκελετικούς μυς, αλλά από ένα ακέραιο μυοσκελετικό σύστημα το οποίο είναι αναπόσπαστο από το κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα και από άλλα οργανικά συστήματα. Στον πιο πρόσφατο ορισμό της σαρκοπενίας σύμφωνα με το EWGSOP2, η φυσική κατάσταση αποτελεί ένα μέτρο για τη σοβαρότητα της σαρκοπενίας ².

Σήμερα, η πιο υποσχόμενη προσέγγιση για τη μέτρηση της σκελετικής μυϊκής μάζας βασίζεται στην αραίωση της από του στόματος d3 creatine A. Αποτελεί ένα μη

επεμβατικό τεστ αραιωμένου ισotόπου, το οποίο προσδιορίζει τη συγκέντρωση της methyl-d3 creatine στα πρωινά ούρα, μετά από μία από του στόματος δόση d3 creatine A¹⁷.

1.3. Διαφορική διάγνωση

Οι τρεις κύριες καταστάσεις στη διαφορική διάγνωση της σαρκοπενίας είναι ο υποσιτισμός, η καχεξία και η αδυναμία¹⁸. Ένα εύρημα μειωμένης μυϊκής μάζας με φυσιολογική μυϊκή δύναμη είναι ενδεικτική περισσότερο του υποσιτισμού παρά της σαρκοπενίας, ενώ η μειωμένη μυϊκή μάζα με διαταραγμένη μυϊκή λειτουργία συγκλίνει προς τη διάγνωση της σαρκοπενίας¹⁹.

Ο όρος καχεξία έχει χρησιμοποιηθεί για δεκαετίες για να περιγράψει τη μεγάλη απώλεια βάρους και μυϊκή ατροφία που σχετίζονται με τον καρκίνο, τον HIV και το AIDS ή τελικού σταδίου οργανική ανεπάρκεια. Η καχεξία και η σαρκοπενία μπορεί να συνυπάρχουν, και κάποιες πτυχές του ορισμού της σαρκοπενίας, και συγκεκριμένα η χαμηλή μυϊκή μάζα, μπορεί να περιλαμβάνονται στους σύγχρονους ορισμούς της καχεξίας²⁰. Η καχεξία έχει μία πολύπλοκη παθοφυσιολογία που περιλαμβάνει τον καταβολισμό και τη φλεγμονή, ενδοκρινικές και νευρολογικές μεταβολές και διαφέρει από αυτή της σαρκοπενίας²¹.

Η αδυναμία ορίζεται ως μια κατάσταση ευπάθειας και διαταραχή της ομοιόστασης μετά από ένα στρεσογόνο συμβάν, ως συνέπεια συσσωρευμένης έκπτωσης πολλών φυσιολογικών συστημάτων²². Η φυσική αδυναμία περιλαμβάνει ακούσια απώλεια βάρους, εξάντληση, αδυναμία (χαμηλή δύναμη λαβής), χαμηλή ταχύτητα στο περπάτημα και χαμηλή φυσική δραστηριότητα²³.

1.4. Επιδημιολογία

Ο επιπολασμός της σαρκοπενίας διαφέρει ανάλογα με τον ορισμό που χρησιμοποιείται. Έτσι, σύμφωνα με τον ορισμό της EWGSOP το 2010 ο επιπολασμός είναι 12,9%, ενώ με παλαιότερο ορισμό της σαρκοπενίας που περιλάμβανε μόνο εκτίμηση της μυϊκής μάζας ο επιπολασμός φτάνει το 40,4%²⁴. Ο επιπολασμός επίσης επηρεάζεται από το

γεγονός ότι πιο συχνά καταγράφονται ασθενείς που προσέρχονται στο νοσοκομείο ή σε μονάδες φροντίδας υγείας, παρά στην κοινότητα ²⁵.

Η επίπτωση της νόσου φαίνεται να αυξάνεται με την ηλικία. Μία μελέτη σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς ανδρών και γυναικών ηλικίας 40-79 ετών έδειξε 1,6%, σύμφωνα με τον ορισμό της EWGSOP ²⁶, 3,4% σε κινεζικό πληθυσμό ανδρών και γυναικών μέσης ηλικίας 72 ετών ²⁷ και 3,6% σε Άγγλους άνδρες και γυναίκες ηλικίας 85 ετών ²⁸.

1.5. Παθοφυσιολογία και μοριακοί μηχανισμοί

Η γήρανση διαταράσσει την ομοιόσταση των σκελετικών μυών, η οποία προϋποθέτει την ισορροπία ανάμεσα στην υπερτροφία και στην αναγέννηση μέσω σύνθετων και όχι πλήρως κατανοητών μονοπατιών και μηχανισμών. Η γήρανση φαίνεται ότι επάγει μία ανισορροπία ανάμεσα στα αναβολικά και στα καταβολικά μονοπάτια των μυϊκών πρωτεϊνών, οδηγώντας σε συνολική απώλεια σκελετικών μυών. Οι κυτταρικές αλλαγές στον σαρκοπενικό μυ περιλαμβάνουν μείωση στον αριθμό και το μέγεθος των μυϊκών ινών, και ιδιαίτερα των ινών τύπου II. Αυτό εν μέρει οφείλεται στη σταδιακή μετάπτωση των μυϊκών ινών από τύπου II σε τύπου I αυξανόμενης της ηλικίας, παράλληλα με ενδομυϊκή και διαμυϊκή λιπώδη διήθηση (μυοστεάτωση) και μειωμένο αριθμό δορυφορικών κυττάρων των τύπου II μυϊκών ινών ^{29,30}. Η παθογόνος σχέση λιπώδους και μυϊκού ιστού παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη σαρκοπενία ³¹. Επιπλέον διαφέρει και η μιτοχονδριακή ακεραιότητα στα μυοκύτταρα ³². Οι μοριακές αλλαγές στον σαρκοπενικό μυ περιλαμβάνουν μεταβολές σε σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία περιλαμβάνουν τους μεταγραφικούς παράγοντες IGF1 (ινσουλινομορφος αυξητικός παράγοντας 1), mTOR (mammalian target of rapamycin), και forkhead box protein καθώς και άλλα αλληλένδετα μονοπάτια ³³. Η νευρολογική σηματοδότηση και οι μηχανισμοί ελέγχου έχουν επίσης σημαντικό ρόλο στη μυϊκή λειτουργία ³⁴. Επίσης, η απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στον σκελετικό μυ, μπορεί να ρυθμίζεται από επιγενετικές αλλαγές και τη δράση των μικρών μη κωδικών μορίων RNA (miRNAs) ³⁵.

Η αλληλεπίδραση μυών -οστών διαμεσολαβείται από ενδοκρινικούς παράγοντες όπως η μουσταΐνη, η ιρισΐνη, η οστεοκαλσΐνη, και άλλοι, αν και η επίδραση της επικοινωνίας αυτής στην παθογένεια της σαρκοπενίας δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί ³⁶. Πρώιμες

ενδείξεις προτείνουν μία συσχέτιση ανάμεσα στη σχετιζόμενη με την ηλικία μείωση της απελίνης, ενός ενδογενούς πεπτιδίου που επάγεται από τη μυϊκή συστολή, και στη μείωση της μυϊκής λειτουργίας, μέσω διαφορετικών μονοπατιών³⁷.

Οι σχετιζόμενες με την ηλικία αλλαγές στον μυ χαρακτηρίζονται από μία σταδιακή απώλεια κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού λόγω απόπτωσης, μειωμένη σηματοδότηση αυξητικών παραγόντων και πρόσληψη πρωτεϊνών, αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων κυτταροκινών, αυξημένο οξειδωτικό στρες κ.ά. Κάποιες απονευρωμένες μυϊκές ίνες επανανευρώνονται μέσω παράπλευρης βλάστησης γειτονικών κινητικών νευρώνων ή κινητικής πλάκας, σχηματίζοντας μεγάλες κινητικές μονάδες. Επομένως, η σχετιζόμενη με την ηλικία απώλεια κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού οδηγεί σε μείωση των μυϊκών ινών σε αριθμό και μέγεθος, με αποτέλεσμα τη χαμηλή μηχανική απόδοση των μυών, το οποίο σημαίνει μειωμένη λειτουργική ικανότητα κατά τη διάρκεια καθημερινών δραστηριοτήτων, όπως το περπάτημα, το ανέβασμα σκάλας, το σήκωμα από την καρέκλα κ.ά.³⁸.

Σχετικά με το ρόλο της χαμηλού βαθμού χρόνιας φλεγμονής στην σχετιζόμενη με την ηλικία αναδιοργάνωση του νευρομυϊκού συστήματος υπάρχουν σήμερα αρκετές ενδείξεις^{3,39,40}. Η συστηματική χαμηλού βαθμού φλεγμονή, ορίζεται ως αύξηση 2 έως 4 φορές των επιπέδων των κυκλοφορούντων προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών και θεωρείται ένας βασικός μηχανισμός της γήρανσης και των ασθενειών που σχετίζονται με την γήρανση. Οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές σχετίζονται άμεσα με την απώλεια μυϊκής μάζας και μείωση μυϊκής δύναμης στους ηλικιωμένους. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και ιδιαίτερα ο TNFα (Tumor Necrosis Factor α), αποτελούν πιθανό ερέθισμα για πρωτεόλυση μέσω του συστήματος ουβικουϊτίνης-πρωτεασώματος. Έχει παρατηρηθεί αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στους ρυθμούς σύνθεσης των βαριών αλυσίδων της μυοσίνης και στους κυκλοφορούντες δείκτες της ανοσιακής απόκρισης⁴¹.

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η θετική ρύθμιση της έκφρασης του TNFα επάγεται κατά την εξέλιξη της γήρανσης εξαιτίας μιας σχετιζόμενης με την ηλικία ανισορροπία οξειδοαναγωγής, η οποία ενεργοποιεί πολλά προφλεγμονώδη μονοπάτια σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένου του μονοπατιού του NF-κΒ⁴². Επιπλέον, οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) εμφανίζονται επίσης να λειτουργούν ως δευτερογενείς αγγελιαφόροι για τον TNFα στον σκελετικό μυ,

αυξάνοντας την ευαισθησία στη μιτοχονδριακή απόπτωση, και μειώνοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα που οδηγεί στη μιτοχονδριακή βιογένεση, όπως για παράδειγμα χαμηλότερα επίπεδα του μεταγραφικού συνενεργοποιητή PGC-1α, ο οποίος είναι απαραίτητος στη μεταβολική διαδικασία ⁴³. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν βασική ενδογενή πηγή ROS, οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή ελαττωματικών πρωτεϊνών, οξειδώνουν τα λιπίδια και προκαλούν βλάβες στο μιτοχονδριακό DNA, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε μιτοχονδριακή και κυτταρική δυσλειτουργία καθώς επίσης να επιταχύνουν την απόπτωση των μυϊκών κυττάρων ⁴⁴. Έχει δειχθεί ότι ο TNFα αποτελεί ένα από τα κύρια σήματα που επάγουν την κυτταρική απόπτωση στον μυ. Η πρόσδεση του TNFα στον υποδοχέα TNFR έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση πρωτεασών απαραίτητων για την επιτέλεση της απόπτωσης. Οι πρωτεάσες αυτές - κασπάσες- όταν ενεργοποιηθούν μετατοπίζονται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και τελικά επάγουν την αποικοδόμηση του DNA, ένα από τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης ⁴⁵. Οι Whitman et al. έδειξαν ότι η τμηματοποίηση του DNA συνοδευόμενη από 60% μείωση της ποσότητας των μυϊκών ινών είναι υψηλότερη στον έξω πλατύ μυ μεγαλύτερων σε ηλικία ατόμων σε σχέση με νεότερα άτομα ⁴⁶. Το κυκλοφορούν ελεύθερο κυττάρων DNA έχει επίσης αναδειχθεί σε ένα νέο βιοδείκτη γήρανσης, αντανακλώντας τη συστημική φλεγμονή, και κυτταρικού θανάτου και έχει προταθεί ότι μπορεί να προάγει την αυτόματη φλεγμονή ^{47,48}.

1.6. Κατηγορίες σαρκοπενίας

Σε κάποια άτομα, η σαρκοπενία αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στη γήρανση, αλλά σε πολλές περιπτώσεις υπάρχουν και άλλα αίτια (Πίν. 1). Η σαρκοπενία θεωρείται πρωτοπαθής (ή σχετιζόμενη με την ηλικία) όταν δεν υπάρχει άλλη προφανής αιτία, ενώ θεωρείται δευτεροπαθής όταν υπάρχουν προφανείς άλλοι αιτιολογικοί παράγοντες, εκτός ή επιπλέον της γήρανσης. Η σαρκοπενία μπορεί να εμφανιστεί δευτεροπαθώς με μία συστηματική νόσο, ιδιαίτερα με αυτές που αιτιώνται σε φλεγμονώδεις διαδικασίες, όπως ο καρκίνος ή η οργανική ανεπάρκεια. Η απουσία φυσικής άσκησης συνεισφέρει επίσης στην ανάπτυξη της σαρκοπενίας, είτε ως τρόπου ζωής, είτε ως ακινησία ή αναπηρία λόγω ασθένειας ⁴⁹. Επιπλέον, η σαρκοπενία μπορεί να αναπτυχθεί ως απόρροια ανεπαρκούς πρόσληψης ενέργειας ή πρωτεϊνών, το οποίο μπορεί να

οφείλεται σε ανορεξία, δυσαπορρόφηση, περιορισμένη πρόσβαση σε υγιεινή τροφή ή περιορισμένη ικανότητα για σίτιση.

Πίνακας 1. Συχνότερα υποκείμενα αίτια σαρκοπενίας (προσαρμογή από ⁵).

Διατροφικά
Χαμηλή πρόσληψη πρωτεϊνών
Χαμηλή πρόσληψη θερμίδων
Έλλειψη ιχνοστοιχείων
Δυσαπορρόφηση και άλλες διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος
Ανορεξία (γήρανση, στοματικά προβλήματα)
Σχετιζόμενα με την απραξία
Κατάκλιση, ακινησία
Χαμηλή δραστηριότητα, καθιστικός τρόπος ζωής
Σχετιζόμενα με ασθένειες
Ασθένειες των οστών και των αρθρώσεων
Καρδιοαναπνευστικές νόσοι (χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια)
Μεταβολικές διαταραχές (διαβήτης)
Ενδοκρινικές διαταραχές (ανδρογονικός αποκλεισμός)
Νευρολογικές διαταραχές
Καρκίνος
Ηπατικές και νεφρικές διαταραχές
ΙΑτρογενή
Νοσηλεία στο νοσοκομείο
Σχετιζόμενα με φάρμακα

Η EWGSOP2 έχει κατηγοριοποιήσει τη σαρκοπενία σε οξεία και χρόνια ³. Η σαρκοπενία που έχει διάρκεια λιγότερο από 6 μήνες χαρακτηρίζεται ως οξεία σαρκοπενία, ενώ με διάρκεια περισσότερο από 6 μήνες χαρακτηρίζεται ως χρόνια. Η οξεία σαρκοπενία σχετίζεται συνήθως με έναν τραυματισμό ή με μία οξεία νόσο, ενώ

η χρόνια σαρκοπενία πιθανόν σχετίζεται με χρόνιες και εξελισσόμενες καταστάσεις, οι οποίες αυξάνουν τον κίνδυνο θνητότητας.

Η σαρκοπενική παχυσαρκία αποτελεί μία ξεχωριστή κατηγορία η οποία χαρακτηρίζεται από μειωμένη μυϊκή μάζα σώματος που συνυπάρχει όμως με περίσσεια λίπους⁵⁰. Η σαρκοπενική παχυσαρκία συναντάται συχνά στους ηλικιωμένους ασθενείς, καθώς ο επιπολασμός και ο κίνδυνος αυξάνουν με την ηλικία⁵¹. Η παχυσαρκία επιδεινώνει τη σαρκοπενία, αυξάνει τη διήθηση του μυός από λίπος, μειώνει τη φυσική λειτουργία και αυξάνει τον κίνδυνο θανάτου⁵²⁻⁵⁵.

Ο φαινότυπος της σαρκοπενίας σχετίζεται επίσης με τον υποσιτισμό, ανεξάρτητα από το αν ο υποσιτισμός οφείλεται σε μειωμένη πρόσληψη τροφής (ασιτία, ανικανότητα διατροφής), μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα θρεπτικών (περιπτώσεις διάρροιας ή εμέτου) ή υψηλών θρεπτικών απαιτήσεων (φλεγμονώδεις νόσοι, όπως ο καρκίνος ή η οργανική ανεπάρκεια με καχεξία)^{56,57}.

1.7. Σαρκοπενία και ποιότητα ζωής

Η σαρκοπενία σχετίζεται με πολλά ανεπιθύμητα αποτελέσματα, όπως συννοσηρότητες, κακή φυσική κατάσταση, φυσική αναπηρία, κατάθλιψη, νοσηλεία στο νοσοκομείο, λειτουργική έκπτωση, πτώσεις και θνητότητα^{58,59}. Η συσχέτιση της σαρκοπενίας με την κακή ποιότητα ζωής έχει υποστηριχθεί από αρκετές μελέτες⁶⁰. Οι Patel et al. αναφέρουν για τους ασθενείς με σαρκοπενία στο Ηνωμένο Βασίλειο κακή ποιότητα ζωής σε επίπεδο γενικότερης υγείας και φυσικής λειτουργίας, με τους ίδιους τους ασθενείς να δηλώνουν κακή γενική υγεία και φυσική λειτουργία⁵⁹. Σε μία άλλη μελέτη, η σαρκοπενία συσχετίστηκε με αυξημένη ηλικία, χαμηλό δείκτη μάζας σώματος, χαμηλή περιφέρεια γαστροκνημίου, καρπού και βραχίονα, περισσότερες γνωστικές δυσλειτουργίες, συννοσηρότητες και χειρότερη ποιότητα ζωής, σε επίπεδο φυσικών λειτουργιών, πτώσεων, ευπάθειας και κόπωσης κατά τη διάρκεια των καθημερινών δραστηριοτήτων⁵⁸. Παρόμοια ευρήματα αναφέρει και μία κορεατική μελέτη που αφορούσε άνδρες ασθενείς⁶¹. Οι σαρκοπενικοί ασθενείς λόγω απώλειας μυϊκής μάζας και μείωση μυϊκής δύναμης νιώθουν δυσφορία κατά την κίνηση και τις καθημερινές δραστηριότητες. Επιπλέον, η σαρκοπενία έχει συσχετιστεί με την οστική πυκνότητα, με τους ασθενείς με σαρκοπενία και οστεοπενία να αποτελούν μία ευπαθή ομάδα υψηλού κινδύνου για κατάγματα^{61,62}.

1.8. Θεραπεία

Η θεραπευτική προσέγγιση της σαρκοπενίας μπορεί να είναι φαρμακολογική και μη-φαρμακολογική. Στη μη-φαρμακολογική προσέγγιση, περιλαμβάνεται η φυσική δραστηριότητα ως πρωτογενής αντιμετώπιση, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του 2018 ⁶³. Οι ενδείξεις για τα οφέλη της άσκησης αντίστασης στη βελτίωση της σκελετικής μυϊκής δύναμης και μάζας, και επομένως στη σαρκοπενία, ολοένα και αυξάνονται ^{64,65}. Αρκετά άρθρα ανασκόπησης έχουν αναδείξει την αξία της άσκησης στη βελτίωση της δύναμης, της μάζας και της ισορροπίας, αλλά και στη σαρκοπενική παχυσαρκία ⁶⁶⁻⁶⁸.

Η διατροφική παρέμβαση αποτελεί άλλη μία μη-φαρμακολογική προσέγγιση της σαρκοπενίας, κυρίως σε συνδυασμό με άσκηση ⁶⁷. Ο ρόλος της διατροφικής παρέμβασης χωρίς άσκηση δεν έχει ξεκαθαριστεί, αν και υπάρχουν κάποιες ενδείξεις για το όφελος της υγιεινής διατροφής που περιλαμβάνει επαρκής πρόσληψη πρωτεΐνης, βιταμίνης D, αντιοξειδωτικών και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στη σαρκοπενία, γι' αυτό και προτείνεται η υψηλή πρόσληψη πρωτεΐνης στους ηλικιωμένους ⁶⁹. Τα από του στόματος συμπληρώματα διατροφής υψηλά σε πρωτεΐνη ίσως είναι πιο αποτελεσματικά στο πλαίσιο σαρκοπενίας με υποσιτισμό ^{70,71}. Τα θρεπτικά συστατικά ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι το απαραίτητο αμινοξύ λευκίνη και ο μεταβολίτης του το β-υδροξυ-βμεθυλβουτυρικό οξύ, τα οποία έχουν δείξει κάποια δράση στη βελτίωση μυϊκής μάζας και λειτουργίας, καθώς επίσης και το πολυακόρεστο λιπαρό οξύ ω3 προερχόμενο από ιχθυέλαιο, το οποίο αύξησε τη μυϊκή μάζα και δύναμη σε υγιείς ηλικιωμένους ⁷²⁻⁷⁴.

Στη φαρμακολογική προσέγγιση της σαρκοπενίας, δεν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο εγκεκριμένο φάρμακο. Η βιταμίνη D, ο συνδυασμός οιστρογόνων-προγεστερόνης, dehydroepiandrosterone, η αυξητική ορμόνη, η εκλυτική ορμόνη αυξητικής ορμόνης, ο συνδυασμός τεστοστερόνης αυξητικής ορμόνης, ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα 1, pioglitazone, τεστοστερόνη, και αναστολείς μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτενσίνης φαίνεται να βελτιώνουν τη μυϊκή μάζα και δύναμη και τη φυσική κατάσταση στους ηλικιωμένους ⁷⁵.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2. Καρκινική καχεξία

Με τον όρο καρκίνο εννοούμε τη νόσο στην οποία παρατηρείται ανώμαλος και ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός κυττάρων, τα οποία μπορεί να διηθήσουν και να εξαπλωθούν σε άλλα μέρη του σώματος και έχουν σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ή όχι όγκου (συμπαγείς όγκοι και αιματολογικές κακοήθειες). Η καρκινογένεση είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία, κατά την οποία τα φυσιολογικά κύτταρα μετατρέπονται σταδιακά σε κακοήθη, αποκτώντας ιδιότητες που σχετίζονται με τη σηματοδότηση του πολλαπλασιασμού, την αποφυγή του κυτταρικού θανάτου και των αναστολέων της ανάπτυξης, την αγγειογένεση, τη διείσδυση, τη μετάσταση, τη γονιδιωματική αστάθεια, τη φλεγμονή και τον μεταβολισμό ⁷⁶.

Οι όγκοι επαναπρογραμματίζουν τη φυσιολογία του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται, τον μεταβολισμό και την ανοσιακή απόκριση κατά την εξέλιξή τους. Η απελευθέρωση διαλυτών παραγόντων, εξωσωμάτων και μεταβολιτών από τους όγκους οδηγεί σε συστηματικές αλλαγές σε απομακρυσμένα όργανα, όπου τα καρκινικά κύτταρα θα μετασταθούν και θα αναπτυχθούν. Αυτοί οι κυκλοφορούντες παράγοντες που εκκρίνονται από τους όγκους επιδρούν σε μεγάλο βαθμό και σε ιστούς που σπανίως διηθούνται από μεταστατικά καρκινικά κύτταρα, όπως οι σκελετικοί μύες και ο λιπώδης ιστός. Στην πραγματικότητα, η πλειονότητα των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο αναπτύσσουν καχεξία, ένα σύνδρομο αποδυνάμωσης των μυών το οποίο σχετίζεται με μειωμένη ανοχή στην αντινεοπλασματική θεραπεία και κακή πρόγνωση ⁷⁷.

Η καχεξία, αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό σύνδρομο το οποίο ορίζεται ως απώλεια σκελετικής μυϊκής μάζας με ή χωρίς ατροφία λιπώδους ιστού, και δεν αναστρέφεται με θρεπτική υποστήριξη, στο πλαίσιο χρόνιας συστηματικής φλεγμονής και μεταβολικών διαταραχών. Η καχεξία μεσολαβείται από φλεγμονώδη αντίδραση, και επομένως η καχεξία προσβάλλει περίπου το 50% όλων των ασθενών με καρκίνο, λόγω της προφανούς συστηματικής φλεγμονής που σχετίζεται με τη νόσο ⁷⁸.

Η καχεξία είναι αποτέλεσμα της δραστηριότητας κυτταροκινών, όπως του TNFα, της ιντερλευκίνης 1 (IL-1), (IL-6) και ιντερφερόνης γ (IFN-γ), οι οποίες αλλάζουν τον μεταβολισμό των μακροθρεπτικών μειώνοντας την πρωτεϊνοσύνθεση, αυξάνοντας την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, ενισχύοντας τη λιπόλυση, καταστέλλοντας την

λιποπρωτεϊνική λιπάση στο λιπώδη ιστό, εντείνοντας την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης από το ήπαρ, αυξάνοντας τη γλυκονεογένεση και προκαλώντας αντίσταση στην ινσουλίνη⁷⁹⁸⁰. Διαδοχικά, αυτές οι αλλαγές οδηγούν σε ανορεξία με απώλεια μυϊκής μάζας και λιπώδους ιστού⁸¹. Η απώλεια περίπου 30% του σωματικού βάρους σχετίζεται σημαντικά με τη θνητότητα⁸². Η καχεξία επιβαρύνει ιδιαίτερα τους ασθενείς και τις οικογένειές τους, λόγω διαφοροποιήσεων στην απόκριση στις θεραπείες.

2.1. Διάγνωση

Παρά τον ευρύ επιπολασμό της καχεξίας, μόλις πρόσφατα δόθηκαν οδηγίες και ορισμοί για αυτήν^{20,82}. Παλαιότερα, η καχεξία από καρκίνο οριζόταν ως η απώλεια βάρους μεγαλύτερη του 5-10%. Ωστόσο, αυτό το κριτήριο επικεντρώνεται μόνο στην απώλεια βάρους και δεν λαμβάνει υπόψη τη σημασία της σύστασης του σώματος ή τις μεταβολικές αλλαγές. Το 2006, οι Fearon et al. πρότειναν ένα ορισμό για την καχεξία χρησιμοποιώντας το σκεπτικό της φυσιολογίας με αντικειμενικά κριτήρια, προτείνοντας ένα τρι-παραγοντικό ορισμό: απώλεια βάρους $\geq 10\%$, πρόσληψη θρεπτικών ≤ 1500 θερμίδες/ημέρα, και C-reactive protein (CRP) ≥ 10 mg/L ως διαγνωστικά κριτήρια για την αναγνώριση ασθενών με καχεξία ανάμεσα σε ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο⁸³. Σε σύγκριση με μεμονωμένους διατροφικούς δείκτες, ο συνδυασμός απώλειας βάρους, μειωμένης πρόσληψης τροφής και συστηματικής φλεγμονής, αναγνωρίζει ασθενείς με δυσμενή λειτουργία και πρόγνωση.

Το 2007 στη διάσκεψη συναίνεσης για την καχεξία (Cachexia Consensus Conference) όρισαν την καχεξία ως ένα μεταβολικό σύνδρομο με υποκείμενο νόσημα και απώλεια μυών, με ή χωρίς απώλεια λιπώδους ιστού⁸¹. Το επικρατές κλινικό χαρακτηριστικό της καχεξίας είναι απώλεια βάρους για τους ενήλικες (διορθωμένη για την κατακράτηση υγρών) ή ανεπάρκεια ανάπτυξης για τα παιδιά (με εξαίρεση τις ενδοκρινικές διαταραχές). Η ανορεξία, η φλεγμονή, η αντίσταση στην ινσουλίνη και η αυξημένη αποδόμηση των μυϊκών πρωτεϊνών συχνά σχετίζονται με την εξασθενητική νόσο. Η εξασθενητική νόσος διακρίνεται από την ασιτία, την ηλικιο-σχετιζόμενη απώλεια μυϊκή μάζας, την πρωτοπαθή κατάθλιψη, τη δυσαπορρόφηση και τον υπερθυρεοειδισμό και σχετίζεται με αυξημένη θνητότητα.

Εκτός από τον ορισμό της καχεξίας, έχουν αναπτυχθεί διαγνωστικά κριτήρια για τους κλινικούς, τα οποία περιλαμβάνουν απώλεια βάρους τουλάχιστον 5% σε 12 μήνες (ο

χαμηλός δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI) 18,5-22 kg/m² μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί, αν δεν υπάρχει ιστορικό βάρους), με 3 από τα 5 παρακάτω χαρακτηριστικά: μειωμένη μυϊκή δύναμη, κούραση, ανορεξία, χαμηλός δείκτης μάζας ελεύθερης λίπους, ή ανώμαλη βιοχημεία (αυξημένους φλεγμονώδεις δείκτες όπως CRP και IL-6, αναιμία με αιμοσφαιρίνη <12g/dL και χαμηλή αλβουμίνη ορού <3,2 g/dL) ⁸¹.

Ένας άλλος ορισμός της καχεξίας προτάθηκε το 2009 από τους Bozzetti and Mariani μετά από ανάλυση 1307 εξωτερικών ασθενών με καρκίνο ⁸⁴. Κάθε ασθενής χαρακτηρίστηκε ως προκαχεξικός (<10% απώλεια σωματικού βάρους) ή καχεξικός (≥10% απώλεια βάρους), και ταξινομήθηκε ως συμπτωματικός (παράπονα για ανορεξία, κούραση ή πρώιμο αίσθημα κορεσμού) ή ασυμπτωματικός (χωρίς παράπονα για ανορεξία, κούραση ή πρώιμο αίσθημα κορεσμού). Από τις 4 ομάδες ασθενών που προέκυψαν, οι ασθενείς με συμπτωματική καχεξία ήταν πιθανότερο να έχουν προχωρημένο καρκίνο, μεγαλύτερη απώλεια σωματικού βάρους και χειρότερη απόδοση ⁸⁴.

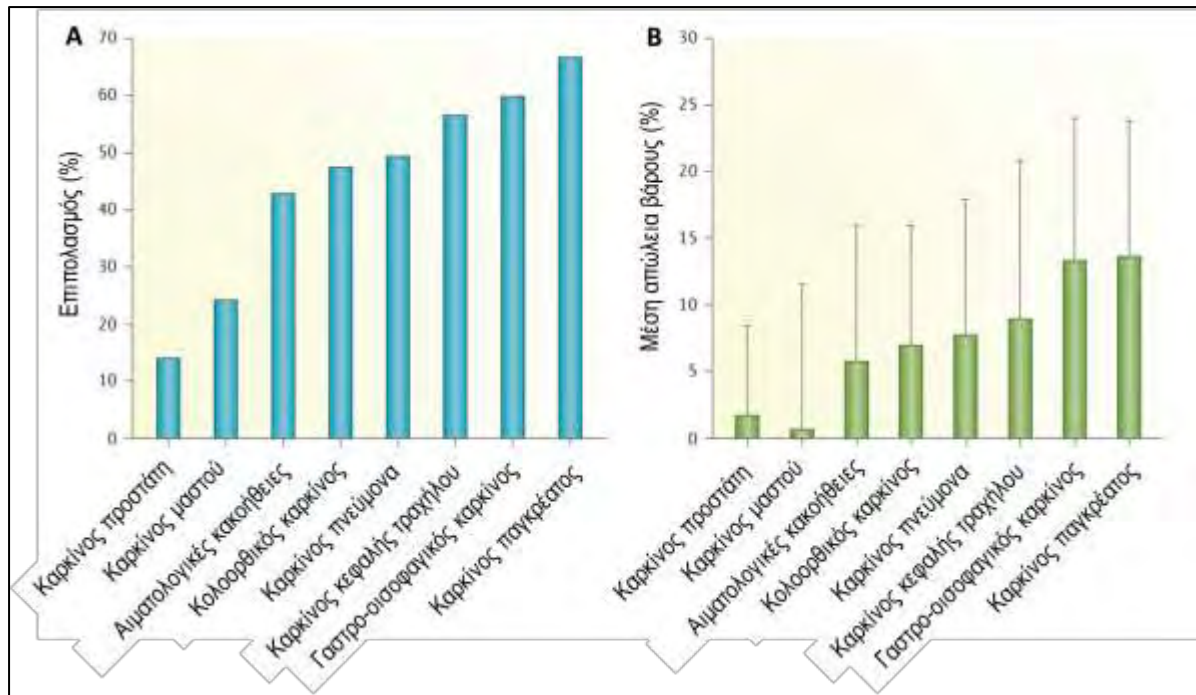
Πιο πρόσφατα, το 2011, μια διεθνής ομάδα ειδικών πρότεινε τον εξής ορισμό για την καχεξία: ένα πολυπαραγοντικό σύνδρομο που ορίζεται από συνεχόμενη απώλεια σκελετικής μυϊκής μάζας (με ή χωρίς απώλεια λιπώδους ιστού) η οποία δεν είναι αναστρέψιμη πλήρως με τη συμβατική διατροφική υποστήριξη και οδηγεί σε εξελισσόμενη λειτουργική επιδείνωση ²⁰. Η παθοφυσιολογία της χαρακτηρίζεται από ένα αρνητικό ισοζύγιο πρωτεϊνών και ενέργειας, λόγω συνδυασμού μειωμένης πρόσληψης θρεπτικών και ανώμαλου μεταβολισμού.

Επιπλέον, προτάθηκαν διαγνωστικά κριτήρια και σύστημα ταξινόμησης, τα οποία τονίζουν την πολυπλοκότητα ανάμεσα στη μειωμένη από του στόματος πρόσληψη θρεπτικών και των ανώμαλο μεταβολισμό και περιλαμβάνει λειτουργική/ φυσική εξασθένιση εξαιτίας της απώλειας σκελετικών μυών ²⁰. Τα διαγνωστικά κριτήρια για την καχεξία στον καρκίνο περιλαμβάνουν απώλεια βάρους >5% τους τελευταίους 6 μήνες (χωρίς αστία), BMI <20 kg/m² με οποιουδήποτε βαθμού απώλεια βάρους >2% ή δείκτης περιφερικών σκελετικών μυών τυπικός της σαρκοπενίας (στους άνδρες <7,26 kg/m², στις γυναίκες <5,45 kg/m²) ³. Επίσης, προτάθηκε σύστημα ταξινόμησης για την περιγραφή της εξέλιξης της νόσου: προκαχεξία, καχεξία και ανθεκτική καχεξία ²⁰. Η προκαχεξία ορίζεται ως απώλεια βάρους ≤5% με πρώιμες κλινικές και μεταβολικές αλλαγές (ανορεξία και μειωμένη ανοχή γλυκόζης) αλλά χωρίς σοβαρές επιπλοκές. Ως

καχεξία ορίζεται η απώλεια βάρους >5% τους τελευταίους 6 μήνες, BMI <20 kg/m² με απώλεια βάρους >2%, ή σαρκοπενία με απώλεια βάρους >2% λόγω μειωμένης πρόσληψης τροφής και συστηματικής φλεγμονής. Ως ανθεκτική καχεξία ορίζεται η καχεξία στα πλαίσια ενεργού καταβολισμού και κακής φυσικής κατάστασης. Στην περίπτωση αυτή η νόσος δεν ανταποκρίνεται πλέον σε θεραπεία ή όταν τα οφέλη της θεραπείας τα ξεπερνούν οι επιβαρύνσεις και οι κίνδυνοι και η αναμενόμενη επιβίωση είναι <3 μήνες²⁰.

2.2. Επιπολασμός

Στις ΗΠΑ, η καχεξία από οποιαδήποτε ασθένεια αναμένεται να προσβάλει περισσότερους από 5 εκατομμύρια ανθρώπους²⁰. Ανάμεσα στους ασθενείς με καρκίνο, το 50% θα χάσει βάρος κατά τη διάρκεια της θεραπείας τους. Ωστόσο, η επίπτωση της απώλειας βάρους από τη διάγνωση και μετά διαφέρει, ανάλογα με την εντόπιση του καρκίνου. Ο μεγαλύτερος επιπολασμός απώλειας βάρους και καχεξίας έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς που εμφανίζουν συμπαγείς όγκους, και ιδιαίτερα όγκους του στομάχου, του παγκρέατος, του πνεύμονα, του παχέος εντέρου και κεφαλής τραχήλου (Σχ. 2)⁸⁵. Το ένα τρίτο των ασθενών θα χάσει >5% του βάρους που είχε πριν την διάγνωση του καρκίνου⁸⁶, ενώ έως και 80% των ασθενών με προχωρημένη νόσο θα διαγνωστούν με καχεξία⁸². Τις τελευταίες 1-2 εβδομάδες ζωής ασθενών με καρκίνο ο επιπολασμός της απώλειας βάρους μπορεί να φτάσει το 86%⁸⁷.



Σχήμα 2. Καχεξία στον καρκίνο ανά όργανο εντόπισης. Α) Επιπολασμός της καχεξίας (οριζόμενη ως >5% απώλεια βάρους τους τελευταίους 6 μήνες) και Β) μέσο ποσοστό απώλειας βάρους (προσαρμογή από ²¹).

Όταν αναφερόμαστε στην καχεξία από καρκίνο, χρησιμοποιούνται συχνά διαφορετικοί ορισμοί με αποτέλεσμα διαφορές στην αναγνώριση της καχεξίας. Το 1980 οι Dewys et al. διερεύνησαν τη προγνωστική αξία της απώλειας βάρους πριν τη χημειοθεραπεία σε 3047 ασθενείς με καρκίνο ⁸⁶. Ο επιπολασμός της καχεξίας (οριζόμενη ως >5% απώλεια βάρους κατά τη διάγνωση) κυμαίνονταν από 16% στον κολοορθικό καρκίνο, 28% στον παγκρεατικό καρκίνο και 36% στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα). Ο ρυθμός απώλειας βάρους ήταν αυξημένος σε ασθενείς με πολλαπλές εντοπίσεις. Η απώλεια βάρους σχετίστηκε με κακή φυσική κατάσταση και μειωμένη μέση επιβίωση ⁸⁶. Σε μία άλλη μελέτη για τον επιπολασμό της καχεξίας, οριζόμενη ως απώλεια βάρους 10%, που έγινε σε 100 ασθενείς με καρκίνο κεφαλής τραχήλου το 57% των ασθενών ήταν καχεκτικοί ⁸⁸. Οι αιτιολογικοί παράγοντες για την απώλεια βάρους ήταν η ξηροστομία, ο πονόλαιμος, η δυσκολία στη μάσηση και την κατάποση, η αλλαγή στη γεύση, η δυσκοιλιότητα, η ναυτία, ο έμετος και η διάρροια ⁸⁸. Στον παγκρεατικό καρκίνο έχει αναφερθεί καχεξία, οριζόμενη ως απώλεια βάρους 10%, σε ποσοστό 41% και μειωμένη επιβίωση ⁸⁹. Το 2009 οι Fox et al. χρησιμοποίησαν μία βάση δεδομένων από αναδρομική μελέτη για να εξετάσουν τον επιπολασμό της καχεξίας χρησιμοποιώντας

4 διαφορετικούς ορισμούς: το διαγνωστικό κώδικα για την καχεξία σύμφωνα με την ένατη έκδοση της διεθνούς ταξινόμησης των ασθενειών, (2) το διαγνωστικό κώδικα για την ανορεξία, την ανώμαλη απώλεια βάρους ή τις δυσκολίες σίτισης, (3) τουλάχιστον μία συνταγογράφηση για megestrol acetate, oxandrolone, somatropin, ή dronabinol, και (4) $\geq 5\%$ απώλεια βάρους μετά τη διάγνωση του καρκίνου⁸². Από τους 8541 ασθενείς με καρκίνο, παρατηρήθηκε καχεξία στο 2%, χρησιμοποιώντας τον κώδικα για την καχεξία, στο 6% από τις εκτεταμένες διαγνώσεις, 6% από τις συνταγογραφήσεις των φαρμάκων και 15% από $\geq 5\%$ απώλεια βάρους⁸². Σε μία άλλη μελέτη που έγινε σε 390 ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο, 36% αναγνωρίστηκαν ως καχεκτικοί, με τον ορισμό της καχεξίας του 2011⁹⁰. Ο μεγαλύτερος επιπολασμός παρατηρήθηκε στον παγκρεατικό καρκίνο σε ποσοστό 89%. Ο γαστρικός και οισοφαγικός καρκίνος είχε επίσης μεγάλο επιπολασμό 77% και 53%, αντίστοιχα. Ωστόσο, με βάση τις εκτιμήσεις των κλινικών ογκολόγων, μόνο 33 ασθενείς είχαν καχεξία. Επιπλέον, περισσότεροι από τους μισούς καχεκτικούς ασθενείς δεν έλαβαν κάποια θεραπεία ή άλλη αντιμετώπιση για την καχεξία τους⁹⁰.

Εκτός από την εντόπιση και την εξέλιξη του καρκίνου, ο επιπολασμός της καχεξίας επηρεάζεται και από το φύλο, καθώς φαίνεται ότι οι άνδρες έχουν μεγαλύτερη προδιάθεση από τις γυναίκες, από την αυξημένη ηλικία, γενετικούς παράγοντες κινδύνου, συννοσηρότητες και καταβολικές επιδράσεις που σχετίζονται με τη θεραπεία. Για παράδειγμα, το 30% των ασθενών με καρκίνο έχουν καρδιακές διαταραχές και διατρέχουν τον κίνδυνο καρδιακής καχεξίας. Φαίνεται επίσης ότι όταν συνυπάρχει η καρκινική καχεξία και η καρδιακή καχεξία, προοδευτικά η μία επιδεινώνει την άλλη⁹¹. Παρομοίως, αρκετά φάρμακα κατά του καρκίνου (όπως το sorafenib, ένας αναστολέας κινάσης τυροσίνης)⁹² ή ανακουφιστικής θεραπείας (όπως τα γλυκοκορτικοειδή) έχουν συγκεκριμένες καταβολικές επιδράσεις στον σκελετικό μυ. Οι θεραπείες αυτές εντείνουν ακόμα περισσότερο την απώλεια μυών σε ασθενείς που τα λαμβάνουν.

Η διακύμανση στον επιπολασμό της καχεξίας οφείλεται επίσης εν μέρει στο γονότυπο. Η προσέγγιση των υποψήφιων γονιδίων έχει χρησιμοποιηθεί τελευταία για τη διερεύνηση γενετικών ποικιλομορφιών που θα μπορούσαν να εξηγήσουν τις διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα άτομα, όσον αφορά στην προδιάθεση στην καχεξία, ωστόσο το πεδίο αυτό είναι ακόμα πρώιμο και χρειάζονται ευρείας κλίμακας γονιδιωματικές αναλύσεις για την εκτίμηση της κληρονομικότητας⁹³.

2.3. Καχεξία στα πλαίσια παχυσαρκίας

Τα πρόσφατα στατιστικά δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας αναφέρουν ότι >600 εκατομμύρια ενήλικες παγκοσμίως είναι παχύσαρκοι ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$)⁹⁴, ενώ σε κάποιες χώρες τα ποσοστά φτάνουν το 50%⁹⁵. Συνεπώς, δεδομένου ότι η καχεξία ορίζεται εν μέρει από χαμηλό BMI, είναι λιγότερο πιθανό ασθενείς με καρκίνο να έχουν καχεξία σύμφωνα με το τυπικά αποδεκτό όρο του λιποβαρούς με $BMI < 18,5 \text{ kg/m}^2$. Το ένα τρίτο των διαγνώσεων καχεξίας σε ασθενείς με καρκίνο αποδίδεται σε διατροφικούς και συμπεριφορικούς κινδύνους, οι οποίοι αυξάνουν την πιθανότητα παχυσαρκίας σε ασθενείς με καρκίνο. Αντιθέτως, τα ποσοστά των υπέρβαρων ενηλίκων είναι <10% στις δυτικές χώρες, αλλά 30-40% στις αναπτυσσόμενες χώρες. Αυτή η ανοδική μετατόπιση του BMI καθιστά τη διάγνωση της καχεξίας ιδιαίτερα ασαφή.

Σε ασθενείς με φυσιολογικό ή χαμηλό BMI πριν τη διάγνωση του καρκίνου, η απώλεια βάρους εντείνεται ακόμα περισσότερο. Οι λιποβαρείς και οι σοβαρά λιποβαρείς ($BMI < 16 \text{ kg/m}^2$) ασθενείς έχουν αυξημένο κίνδυνο συννοσηροτήτων και θνητότητας⁹⁶. Επιπλέον, σοβαρή απώλεια σκελετικών μυών (σαρκοπενία) μπορεί να μην εντοπισθεί σε ασθενείς με παχυσαρκία⁹⁷. Η μυϊκή απώλεια μπορεί να συμβεί χωρίς απώλεια λίπους και επομένως μπορεί να διαλάθει της προσοχής σε παχύσαρκους ασθενείς. Για παράδειγμα, ασθενείς με καρκίνο μαστού μπορεί να παχύνουν μετά τη διάγνωση του καρκίνου, μερικές φορές με απώλεια μυών, οδηγώντας σε σαρκοπενική παχυσαρκία⁹⁸.

2.4. Παθοφυσιολογία της καχεξίας

Τα περισσότερα δεδομένα για την παθοφυσιολογία της καχεξίας έχουν προκύψει κυρίως από μοντέλα ζώων. Τα κλινικά δεδομένα από ασθενείς είναι περιορισμένα, καθώς η καχεξία εμφανίζεται σε στάδιο όπου η ευπάθεια των ασθενών δεν επιτρέπει τη χρήση επεμβατικών μεταβολικών τεστ και βιοψιών και επιπλέον η εξέλιξη του καρκίνου περιορίζει τον αριθμό των ασθενών που είναι διαθέσιμοι για παρακολούθηση.

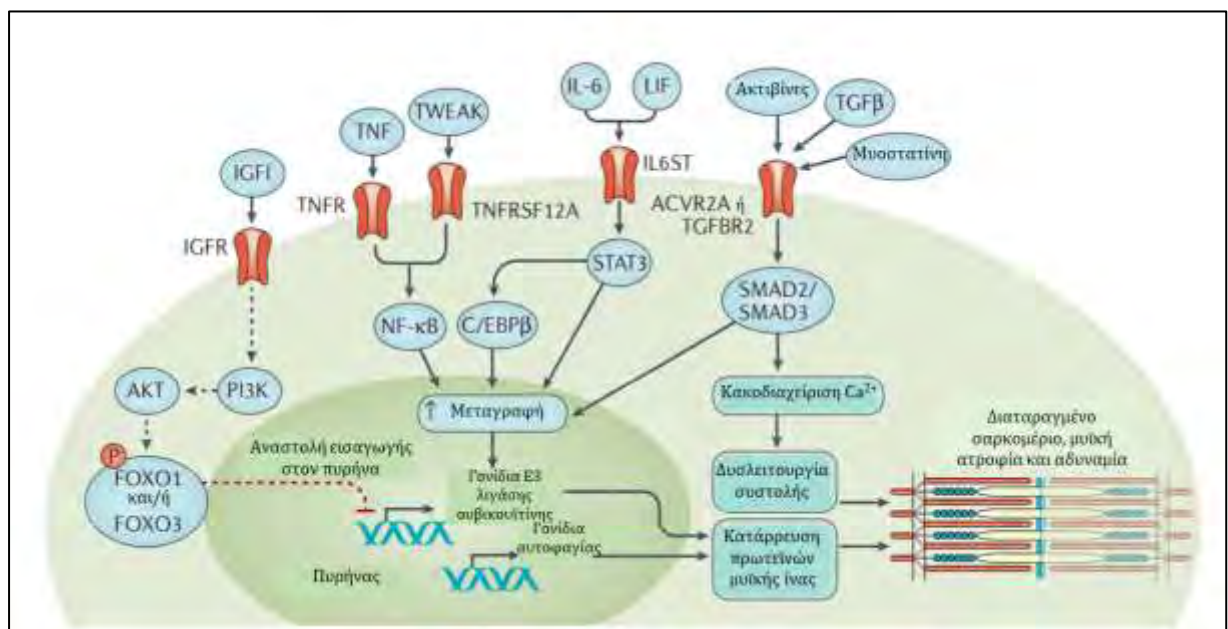
2.4.1. Αλλαγή στο ενεργειακό ισοζύγιο

Ο καρκίνος αλλάζει το ενεργειακό ισοζύγιο και το φυσιολογικό έλεγχο της ομοιόστασης. Η μειωμένη πρόσληψη τροφής είναι σημαντικό στοιχείο στην απώλεια βάρους που σχετίζεται με τον καρκίνο. Η πρόσληψη ενέργειας τυπικά είναι χαμηλότερη από αυτή που καταναλώνει ο οργανισμός για τη διατήρηση της ομοιόστασης και τη φυσιολογική λειτουργία (resting energy expenditure, REE), και τα θερμιδικά ελλείμματα μπορούν να ξεπεράσουν τις 1200 kcal ανά ημέρα^{99,100}. Επίσης, έχει αναφερθεί μειωμένη πρωτεϊνοσύνθεση στους μυς ασθενών με καρκίνο που χάνουν βάρος και το γεγονός ότι η πρωτεϊνοσύνθεση μπορεί να επανενεργοποιηθεί με την παροχή θρεπτικών υπογραμμίζει τη σημασία της μειωμένης καθημερινής πρόσληψης στην αιτιολογία της καρκινικής καχεξίας¹⁰¹⁻¹⁰⁴.

Ολοσωματικές μετρήσεις κατανάλωσης ενέργειας και μεταβολικών ροών, λιπόλυσης, γλυκονεογένεσης, πρωτεϊνοσύνθεσης, αποικοδόμησης πρωτεϊνών και κατανάλωσης υποστρώματος έχουν πραγματοποιηθεί σε ασθενείς με καρκινική καχεξία¹⁰⁵. Η αυξημένη REE προάγει το αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο και σχετίζεται εν μέρει με τον μεταβολισμό του όγκου. Οι όγκοι ανταγωνίζονται τα όργανα και τους ιστούς για τα αποθέματα ενέργειας και τα βιοσυνθετικά υποστρώματα και έχουν αυξημένο μεταβολικό ρυθμό, ο οποίος σχετίζεται με τη μάζα τους και τον βαθμό αερόβιου έναντι αναερόβιου μεταβολισμού της ενέργειας¹⁰⁶. Επιπλέον αύξηση στην κατανάλωση ενέργειας προκαλούν η φλεγμονή και ο μεταβολικός κύκλος (αυξημένοι ρυθμοί μεταβολισμού που περιλαμβάνουν υδρόλυση του ATP). Για παράδειγμα, αυξημένοι ρυθμοί γλυκόλυσης και ταυτόχρονης γλυκονεογένεσης από τον κύκλο του γαλακτικού οξέος αυξάνονται >300%, όπως και του κύκλου της τριακυλογλεκερόλης¹⁰⁵ και των λιπαρών οξέων¹⁰⁷. Έχει προταθεί επίσης ότι ο φαύλος κύκλος- κατά τον οποίο η οξειδωτική φωσφορυλίωση δε συνδέεται με την σύνθεση του ATP και παράγεται μόνο θερμότητα- που πραγματοποιείται στον φαιό λιπώδη ιστό προκαλεί την αυξημένη και αναποτελεσματική κατανάλωση ενέργειας, συνεισφέροντας στην καχεξία^{108,109}. Επιπλέον, μπορεί να συμβαίνει και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στους σκελετικούς μυς, αν και τα δεδομένα σε αυτό το πεδίο είναι περιορισμένα και προέρχονται από μοντέλα ζώων και υπάρχει έλλειψη σε μελέτες σε ανθρώπους¹¹⁰.

2.4.2. Κυτταροκίνες και παράγοντες προκαχεξίας

Το σύνθετο εκκρίτωμα του όγκου είναι σημαντικός παράγοντας και μοναδικό για την καρκινική καχεξία. Οι όγκοι εκκρίνουν μόρια, τα οποία άμεσα ενισχύουν τον καταβολισμό στους ιστούς-στόχους και περιλαμβάνουν πολλές προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, εικοσανοειδή και άλλους παράγοντες με ιστο-ειδικά αποτελέσματα, όπως οι heat shock protein 70 (HSP70) και HSP90¹¹¹, μέλη της υπερικογένειας του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα β (TGFβ) (συμπεριλαμβανομένων ακτιβινών, μυοστατινών και TGFβ, τα οποία δρουν στον σκελετικό μυ) ή επινεφριδική μυελίνη (η οποία δρα στον λιπώδη ιστό). Η αυξημένη φλεγμονή, η οποία ενισχύεται από τον όγκο, συμμετέχει επίσης στην παραγωγή καταβολικών προφλεγμονωδών παραγόντων. Αυτοί οι τελεστές ρυθμίζουν τον ομοιοστατικό έλεγχο στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) οδηγώντας σε καταβολικά νευρωνικά αποτελέσματα μέσω του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, καθώς επίσης και σε νευροενδοκρινικά αποτελέσματα (όπως την απελευθέρωση επινεφριδικών κορτικοστεροειδών) και ασθενική συμπεριφορά (όπως ανορεξία και κούραση). Αυτά τα χυμικά, νευρικά και συμπεριφορικά αποτελέσματα ενεργοποιούν απευθείας την πρωτεόλυση και τη λιπόλυση στα όργανα-στόχους, κυρίως στον σκελετικό μυ, τον λιπώδη ιστό και τον καρδιακό μυ (Σχ. 3)¹¹².



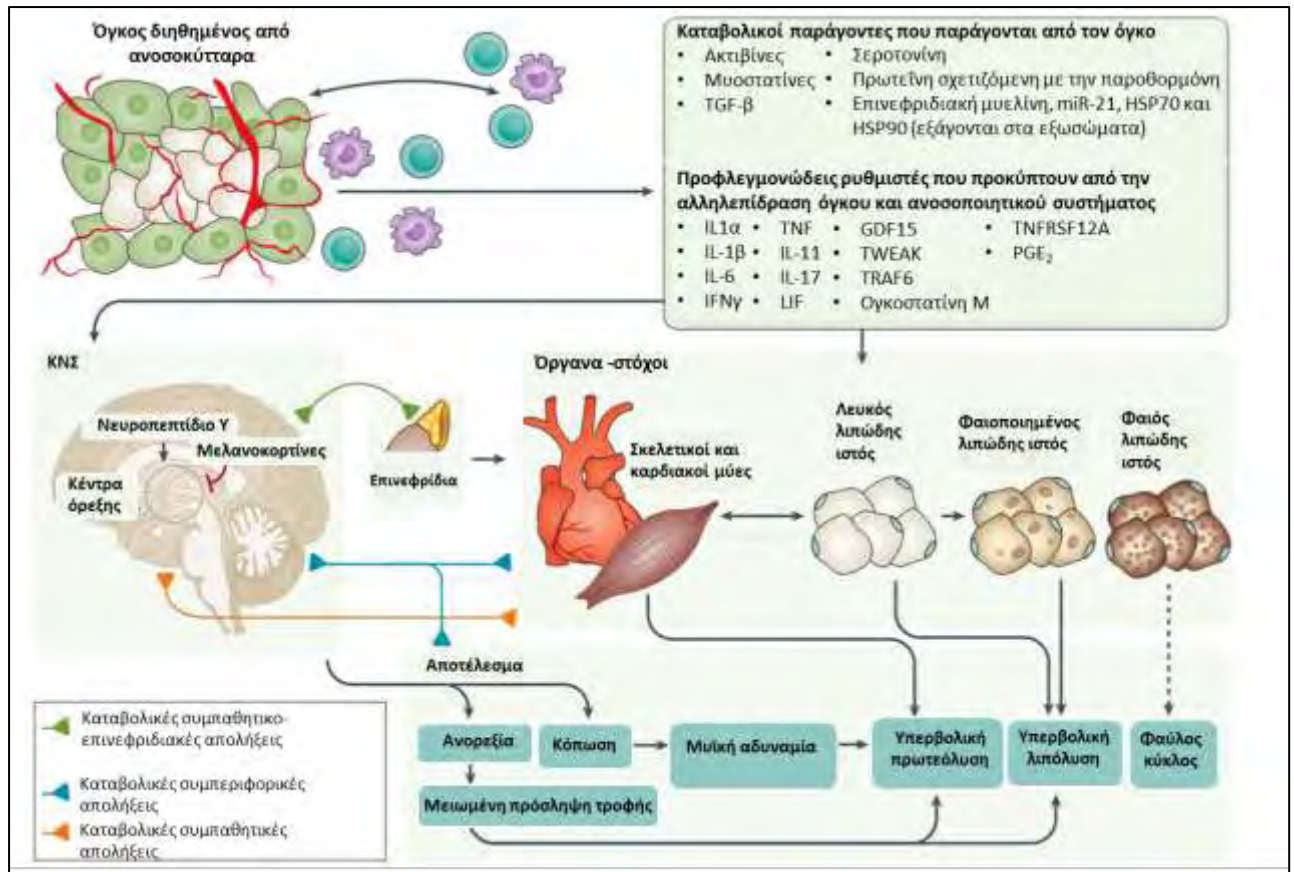
Σχήμα 3. Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην ατροφία των σκελετικών μυών που επάγεται από τον καρκίνο (προσαρμογή από²¹). Η ατροφία των σκελετικών μυών στην καρκινική καχεξία ρυθμίζεται από σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία ενεργοποιούνται από κυτταροκίνες που παράγει ο όγκος και τα στρωματικά κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Οι παράγοντες αυτοί σηματοδοτούν μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων τους, οι οποίοι ενεργοποιούν συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες. Οι μεταγραφικοί παράγοντες με τη σειρά τους προσδένονται στους υποκινητές γονιδίων που κωδικοποιούν συστατικά των συστημάτων ουβικουϊτίνης-πρωτεασώματος και αυτοφαγίας. Γενικά, η ενεργοποίηση αυτών των συστημάτων οδηγεί στη επιλεκτική καταστροφή των πρωτεϊνών των μυϊκών ινών που σχηματίζουν το σαρκομέριο και παίζουν ρόλο στη λειτουργία της συστολής στους σκελετικούς μυς. Η απώλεια αυτών των πρωτεϊνών των μυϊκών ινών θεωρείται ότι οδηγεί σε μυϊκή ατροφία και αδυναμία. Εναλλακτικά, αυξητικοί παράγοντες όπως ο TGFβ μπορεί να σηματοδοτήσει και να τροποποιήσει τη διαχείριση του Ca²⁺ οδηγώντας στη δυσλειτουργία του σαρκομερίου ανεξάρτητα από την απώλεια των σαρκομερικών πρωτεϊνών. Επιπλέον των κυτταροκινών, αυξητικοί παράγοντες όπως ο IGF1 σηματοδοτούν μέσω της RAC πρωτεϊνικής κινάσης σερίνης/θρεονίνης AKT και ρυθμίζουν τη λειτουργική καταστολή των μεταγραφικών παραγόντων forkhead box protein O1 (FOXO1) και FOXO3 αναστέλλοντας την μετατόπισή τους στον πυρήνα και τα επίπεδά τους, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφής των γονιδίων της ατροφίας. Στην καχεξία, αυτή η ανασταλτική δράση συχνά καταστέλλεται, οδηγώντας στη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν συστατικά της αυτοφαγίας και E3 λιγάσες ουβικουϊτίνης. ACVR2A: activin receptor type 2A, C/EBPβ: CCAAT/enhancer-binding protein-β, IGF1: insulin-like growth factor 1, IGFR: insulin-like growth factor receptor, LIF: leukaemia inhibitory factor, IL6ST: IL-6 receptor subunit-β (GP130), NF-κB: nuclear factor-κB, P: phosphate, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, SMAD: mothers against decapentaplegic homologue, STAT3: signal transducer and activator of transcription 3, TGFBR2: TGFβ receptor type 2, TNF: tumour necrosis factor, TNFR: TNF receptor, TNFRSF12A: TNF receptor superfamily member 12A, TWEAK: TNF-related weak inducer of apoptosis (TNFSF12).

Οι προφλεγμονώδεις παράγοντες με καταβολικές επιδράσεις έχουν προσελκύσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, ως ρυθμιστές της καχεξίας. Οι προσταγλανδίνες (και ιδιαίτερα η προσταγλανδίνη E2) είναι γνωστοί ρυθμιστές της επαγόμενης από τον όγκο οστικής απορρόφησης και της παρανεοπλασματικής υπερασβεστιαϊμίας και σε μοντέλα ζώων έχουν αναφερθεί επίσης ως ρυθμιστές υπερβολικού καταβολισμού στον σκελετικό μυ¹¹³. Οι πεπτιδικοί φλεγμονώδεις ρυθμιστές της καχεξίας περιλαμβάνουν την IL-6, IL-1, TNF, IFNγ, τον ανασταλτικό παράγοντα της λευχαιμίας (leukaemia inhibitory factor, LIF), τον παράγοντα 15 ανάπτυξης/διαφοροποίησης (growth/differentiation factor 15, GDF15) και τον σχετιζόμενο με τον TNF ασθενή επαγωγέα της απόπτωσης (TNF-related weak inducer of apoptosis, TWEAK ή TNFSF12). Αυτοί οι παράγοντες, οι οποίοι αρχικά αναγνωρίστηκαν με τη χρήση κυτταροκαλλιιεργειών και καρκινικών μοντέλων ζώων, σηματοδοτούν μέσω των αντίστοιχων κυτταρικών υποδοχέων τους

και ενεργοποιούν συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι με τη σειρά τους προάγουν τη μεταγραφή των συστατικών στοιχείων της οιβικουΐτινης-πρωτεασώματος και αυτοφαγίας. Αυτά τα σηματοδοτικά μόρια παράγονται στα καρκινικά ή ανοσιακά κύτταρα και προάγουν τον καταβολισμό σε όργανα-στόχους, όπως ο σκελετικός μυς, αν και επιβεβαιωτικά δεδομένα από ασθενείς υπολείπουν ¹¹⁴.

Συμπληρωματικά στις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, έχουν περιγραφεί και άλλοι κυκλοφορούντες παράγοντες με προκατακτική δράση έναντι των μυών. Η ακτιβίνη A είναι μέλος της υπερικογένειας των αυξητικών παραγόντων TGFβ και παράγεται από καρκινικά και ανοσιακά κύτταρα ¹¹⁵. Σε καλλιέργεια μυοσωληνίσκων η ακτιβίνη A προάγει την ατροφία και όταν υπερεκφράζεται σε ποντίκια προάγει την απώλεια βάρους και σκελετικών μυών, με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από την IL-6 ¹¹⁶⁻¹¹⁸. Μία άλλη προκατακτική κυτταροκίνη είναι η TWEAK, η οποία ανήκει στην οικογένεια TNF. Η TWEAK δρα μέσω του υποδοχέα TNFRSF12A, ο οποίος όταν υπερεκφράζεται στους όγκους, σχετίζεται με την καχεξία και όταν εξουδετερώθηκε με τη χρήση αντισωμάτων έναντι του TNFRSF12A, αναστάλθηκε η απώλεια βάρους και αυξήθηκε η διάρκεια ζωής σε μοντέλο ποντικού ¹¹⁹. Παρόμοια με τον TNF και την IL-6, η ακτιβίνη A και ο TWEAK μπορούν να προάγουν τη μυϊκή ατροφία σε μη κακοήθεις καταστάσεις, καθιστώντας τους παράγοντες αυτούς και τους υποδοχείς τους ελκυστικούς στόχους για τη θεραπεία της καχεξίας ^{120,121}. Κλινικές μελέτες παρέμβασης που είδη έχουν ξεκινήσει αναμένεται να απαντήσουν αν η στόχευση της ακτιβίνης A, του TWEAK ή του TNFRSF12A αρκεί για τη διάσωση από τη μυϊκή ατροφία στους ασθενείς με καρκίνο (Σχ. 4).



Σχήμα 4. Αλληλεπίδραση των οργάνων στην καρκινική καχεξία. (Προσαρμογή από ²¹). Με βάση κλινικά και πειραματικά δεδομένα, οι καταβολικοί παράγοντες παράγονται από τον όγκο φαίνεται να δρουν σε ιστούς-στόχους προκειμένου να προκαλέσουν επιπλέον καταβολισμό. Πλήθος προφλεγμονωδών κυτταροκινών παράγονται από την αλληλεπίδραση του όγκου με τα κύτταρα του στρώματος και το ανοσοποιητικό σύστημα, οι οποίες δρουν στους ιστούς στόχους, και ελέγχουν μέσω αλλαγών του ΚΝΣ την πρόσληψη και δαπάνη ενέργειας. Η κινητοποίηση του λιπώδους ιστού απορρέει από τη μειωμένη πρόσληψη τροφής, καθώς επίσης και από ειδικά λιπολυτικά μόρια που παράγονται από τον όγκο (όπως η adrenomedullin, επινεφριδιακή μυελίνη), καρκινικοί παράγοντες που επάγουν αποσυνδεδεμένο και φαύλο κύκλο στο λιπώδη ιστό (όπως η σχετιζόμενη πρωτεΐνη με την παραθυρορμόνη) και/ή επάγουν τη λιπόλυση ενεργοποιώντας τη συμπαθητική νευρική απόληξη στα λιποκύτταρα. Η κινητοποίηση των σκελετικών και καρδιακών μυών επάγεται από πολλές προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, εικοσανοειδή και τελεστές της οικογένειας του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα TGFβ (όπως η ακτιβίνη A και η μυοστατίνη). Η φλεγμονή στο ΚΝΣ αλλάζει την ισορροπία ανάμεσα στο ορεξιογόνο νευροπεπτίδιο Υ και στις ανορεξιογόνες μελανοκορτίνες, οδηγώντας σε μειωμένη πρόσληψη τροφής. Η φλεγμονή του ΚΝΣ προκαλεί ένα καταβολικό πρόγραμμα στους μύς, επάγοντας ραγδαία την ατροφία. Αυτή η δράση εξαρτάται από την παραγωγή γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια. GDF15: growth/differentiation factor 15, HSP: heat shock protein, LIF: leukaemia inhibitory factor, miR: microRNA, PGE₂: prostaglandin E₂, TNF: tumour necrosis factor, TNFRSF12A: TNF receptor

superfamily member 12A, TRAF6: TNF-receptor-associated factor 6, TWEAK: TNF-related weak inducer of apoptosis (TNFSF12).

Σε μοντέλα επίμυων καχεξίας από καρκίνο, ρυθμίζονται θετικά η έκφραση της E3 λιγάσης Trim63 (ή Murf1) και της F-box only protein 32 (Fbxo32 ή atrogin 1) τα οποία αποτελούν στοιχεία του ATP-εξαρτώμενου μονοπατιού ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος^{122,123}. Η έκφρασή τους βρίσκεται υπό τον έλεγχο των μεταγραφικών παραγόντων forkhead box protein O1 (Foxo1) και Foxo3, των οποίων η δράση ρυθμίζεται μετα-μεταφραστικά και φαίνεται να λειτουργεί ως ρυθμιστικός κόμβος ανάμεσα σε αναβολικές και καταβολικές διαδικασίες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η κινάση σερίνης/θρεονίνης RAC (AKT) φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες FOXO προκαλώντας την κυτταροπλασματική τους εντόπιση. Ωστόσο στην καχεξία, η δραστηριότητα της AKT συχνά καταστέλλεται είτε υπό την επίδραση φλεγμονωδών κυτταροκινών, είτε λόγω μείωσης των επιπέδων του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα I (IGFI), ο οποίος διεγείρει τον αναβολισμό στους μυς. Η μειωμένη δραστηριότητα της AKT οδηγεί στην αποφωσφορυλίωση και ακολούθως πυρηνική εντόπιση των FOXO πρωτεϊνών, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί σε πυρηνική εντόπιση και μεταγραφή των *TRIM63* και *FBXO32*, η επαγωγή των οποίων σχετίζεται με την αποικοδόμηση πρωτεϊνών των μυϊκών ινών, όπως για παράδειγμα η βαριά αλυσίδα της μυοσίνης^{124,125}. Η AKT επίσης ενεργοποιεί το σύμπλεγμα πρωτεϊνικής κινάσης σερίνης/ θρεονίνης mTOR 1 (mTORC1), το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί την κινάση β1 της ριβοσωματικής πρωτεΐνης S6 (ribosomal protein S6 kinase-β1, S6K1), ασκώντας αναβολική δράση στον μυϊκό ιστό. Επομένως, στον καρκίνο, όπως και σε άλλες χρόνιες ασθένειες που σχετίζονται με την καχεξία, η μυϊκή ατροφία πιθανά ρυθμίζεται από μία ανισορροπία ανάμεσα σε αναβολικές και καταβολικές διαδικασίες.

Επιπρόσθετα, φλεγμονώδεις παράγοντες όπως οι κυτταροκίνες και η αγγειοτενσίνη II μειώνουν τη δράση της AKT, προκαλώντας την πυρηνική μετατόπιση των FOXO και επάγοντας τον καταβολισμό των μυϊκών πρωτεϊνών¹²⁶⁻¹²⁸. Εκτός από τα μυϊκά γονίδια της E3 λιγάσης, οι FOXO μεταγραφικοί παράγοντες έχουν ζωτικό ρόλο στη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με το σύστημα αυτοφαγίας¹²⁹. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ομοιόσταση των σκελετικών μυών απαιτεί η αυτοφαγία να περιορίσει τις κατεστραμμένες πρωτεΐνες και οργανίδια. Ωστόσο, στην καχεξία η θετική ρύθμιση των γονιδίων της αυτοφαγίας οδηγεί σε υπερβολική ενεργοποίηση των μονοπατιών της

αυτοφαγίας, τα οποία συνεισφέρουν στην αυξημένη βλάβη των σκελετικών μυών. Σε ασθενείς με καρκινική καχεξία, έχει αναφερθεί αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αυτοφαγία, όπως η beclin 1, η πρωτεΐνη 5 της αυτοφαγίας (autophagy protein 5) και η ελαφριά αλυσίδα 3B των πρωτεϊνών 1A/1B που σχετίζονται με τους μικροσωληνίσκους (microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, MAP1LC3B) (57). Επιπλέον μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας κB (nuclear factor -κB, NF-κB), ο επαγωγέας της σηματοδότησης και ενεργοποιητής 3 της μεταγραφής (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) και η δεσμευτική πρωτεΐνη β του ενισχυτή CCAAT (CCAAT/enhancer-binding protein-β, C/EBPβ) συνεισφέρουν επίσης στη ρύθμιση των E3 λιγασών και των γονιδίων αυτοφαγίας¹³⁰⁻¹³⁶. Δεδομένου ότι τα μοντέλα ζώων δεν παραθέτουν πάντα τα σύνθετα γεγονότα που συμβαίνουν στην καρκινική καχεξία στους ανθρώπους¹³⁷, είναι σημαντικό να επιβεβαιωθεί η σημασία αυτών των μεταγραφικών παραγόντων, μετρώντας την επίδρασή τους στους σκελετικούς μυς σε ασθενείς με καρκινική καχεξία.

Προκειμένου να κατανοήσουμε τους αντίστοιχους ρόλους της πρωτεϊνοσύνθεσης και της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης, το σύστημα ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος, την αυτοφαγία και ειδικά σηματοδοτικά μονοπάτια στην απώλεια μυϊκών πρωτεϊνών απαιτείται περισσότερη έρευνα. Ο ρυθμός ολοσωματικής πρωτεόλυσης έχει μελετηθεί σε ασθενείς με τη χρήση προσεγγίσεων ισοτοπικού ιχνηθέτη και αυξάνεται έως και 40%¹⁰⁵. Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί αν ισχύει το ίδιο και για την πρωτεόλυση στον σκελετικό μυ. Μετρήσεις που έχουν γίνει σε σταθερής κατάστασης ροή αμινοξέων στα πόδια ασθενών με καρκίνο δείχνουν ότι η μυϊκή απώλεια δεν οφείλεται απαραίτητα σε αυξημένη πρωτεϊνική αποικοδόμηση¹³⁸. Σε ανάλυση RNA και πρωτεϊνών που έγινε σε βιοψίες μυών, τα στοιχεία του μονοπατιού ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος σχετίστηκαν με απώλεια βάρους σε ασθενείς με καρκίνο¹³⁹. Ωστόσο, δεδομένα από μελέτες ευρείας γονιδιακής έκφρασης δεν έχουν επιβεβαιώσει τα ευρήματα που υπάρχουν από μελέτες σε μοντέλα ζώων σχετικά με τα καταβολικά πρωτεϊνικά μονοπάτια^{140,141}. Στους ασθενείς με καρκινική καχεξία έχουν παρατηρηθεί μειωμένοι ρυθμοί σύνθεσης μυϊκών πρωτεϊνών, όπως επίσης και του μονοπατιού AKT και σημαντική μείωση των πρωτεϊνών των μυϊκών ινών^{141,142}. Ωστόσο, η δράση της AKT στους μυς δεν είναι πάντα μειωμένη, ούτε στις μελέτες από μοντέλα ζώων¹⁴³, ούτε σε ασθενείς με καρκίνο¹⁴⁴, για άγνωστους λόγους. Επιπλέον, δεν υπάρχουν

επαναλαμβανόμενες μετρήσεις προκειμένου να καθορισθούν ιστοειδικές και ολοσωματικές αλλαγές κατά την εξέλιξη της νόσου.

2.4.3. Ομοιοστατικός έλεγχος στο ΚΝΣ

Οι ασθενικές συμπεριφορές (ανορεξία, καταβολισμός μυϊκής μάζας), ο πυρετός και ο λήθαργος είναι κλασικές αποκρίσεις σε οξείες και χρόνιες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Από συνεχώς αυξανόμενες ενδείξεις προκύπτει ότι το ΚΝΣ ασκεί πρωταρχικό έλεγχο στην παθογένεια της καχεξίας μέσω αναγνώρισης κυτταροκινών ως μοριακών σημάτων της ασθένειας ¹⁴⁵. Οι μελέτες από μοντέλα ζώων είναι ιδιαίτερα βοηθητικές στην κατανόηση της καρκινικής καχεξίας. Τα υπάρχοντα δεδομένα υποστηρίζουν ένα μοντέλο στο οποίο ενισχύεται η περιφερική φλεγμονή και τροποποιείται μέσα στον υποθάλαμο, δημιουργώντας ένα παρακρινικό φλεγμονώδες περιβάλλον, το οποίο με τη σειρά του δημιουργεί και συντηρεί μεταβολές στη δραστηριότητα των νευρωνικών πληθυσμών που ρυθμίζουν τις διαδικασίες της όρεξης και του μεταβολισμού, συμπεριλαμβανομένων της πρωτεόλυσης και της λιπόλυσης ^{146,147}. Η έκθεση του υποθαλάμου σε οποιοδήποτε από τα πολυάριθμα φλεγμονώδη ερεθίσματα (όπως η IL-1β και ο TNF) πυροδοτεί μία απόκριση οξείας ασθένειας που οδηγεί σε ανορεξία, απώλεια βάρους και ατροφία σκελετικών μυών. Τα μόρια αυτά δρουν εντατικά προσδεδεμένα σε υποδοχείς στους υποθαλαμικούς νευρωνικούς πληθυσμούς, όπως η προ-οπιομελανοκορτίνη και τους νευρώνες που εκφράζουν τη σχετιζόμενη με Agouti πρωτεΐνη (Agouti-related protein), πυροδοτούν ένα βρόγχο θετικής ανατροφοδότησης που περιλαμβάνει καταβολισμό των σκελετικών μυϊκών πρωτεϊνών και λιπόλυση ¹⁴⁸. Η οριοθετημένη από το ΚΝΣ σηματοδότηση της IL-1β από μόνη της μπορεί να ξεκινήσει καταβολικό πρόγραμμα στον μυ, επάγοντας ταχέως την ατροφία του ¹⁴⁸. Αυτό το φαινόμενο εξαρτάται από την ενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια, καθώς η επαγόμενη από την IL-1β του ΚΝΣ ατροφία αναστέλεται με επινεφριδικτομή ή με ειδικό αποκλεισμό των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών στους μύς ¹⁴⁸. Επομένως, είναι πιθανή η εμπλοκή των γλυκοκορτικοειδών στη μυϊκή ατροφία που σχετίζεται με τον καρκίνο.

Οι μελέτες που υπάρχουν σήμερα για τη ρύθμιση του ΚΝΣ στην κλινική καρκινική καχεξία περιορίζονται σε μελέτες χορήγησης νευροτροποποιητικών πεπτιδίων, όπως της γκρελίνης (ghrelin) της ορμόνης που ρυθμίζει την όρεξη, ή μελέτες μέτρησης των

επιπέδων τους ¹⁴⁹. Προσεγγίσεις όπως η λειτουργική μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της τοπικής δραστηριότητας του ΚΝΣ στην παχυσαρκία και τη νευρική ανορεξία, ωστόσο δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στην έρευνα της καρκινικής καχεξίας.

2.4.4. Απώλεια λιπώδους ιστού

Εκτός από τον μυϊκό ιστό, ένα σημαντικό μέρος της απώλειας βάρους σε ασθενείς με καρκίνο οφείλεται σε απώλεια λιπώδους ιστού ¹⁵⁰. Μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή η απώλεια προέρχεται περισσότερο από τη μείωση της μάζας του λίπους που οφείλεται στη λιπόλυση, παρά από τον μη αναστρέψιμο εκφυλισμό των λιπωδών κυττάρων λόγω απόπτωσης και ότι η συνολική αύξηση της λιπόλυσης σε ολόκληρο το σώμα στους ασθενείς με καρκινική καχεξία είναι 50% ¹⁰⁵. Μελέτες βιοψιών από ασθενείς με καρκινική καχεξία έχουν δείξει ακόμα ότι στα λευκά λιποκύτταρα, οι λιπολυτικές δράσεις των κατεχολαμινών και του νατριουρητικού πεπτιδίου αυξήθηκε 2-3 φορές ¹⁵¹.

Η ατροφία λίπους και μυών στην καχεξία θεωρούνται ανεξάρτητα φαινόμενα και οφείλονται στο γεγονός ότι κυτταροκίνες όπως ο TNF μπορούν να επάγουν τον καταβολισμό τόσο στα μυϊκά κύτταρα, όσο και στα λιποκύτταρα. Ωστόσο, αυτή η θεωρία τέθηκε υπό αμφισβήτηση μετά από γενετικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια με ξενομοσχεύματα Lewis καρκινώματος πνεύμονα, στα οποία είχε αφαιρεθεί το *Pnpla2*, γονίδιο που κωδικοποιεί την patatin-like phospholipase domain-containing protein 2. Τα ελλειμματικά σε *Pnpla2* ποντίκια, όχι μόνο ήταν ανθεκτικά στη λιπόλυση λευκού λιπώδους ιστού, αλλά διατηρούσαν επίσης και τη μυϊκή μάζα των οπίσθιων άκρων ¹⁵². Το εύρημα αυτό δείχνει επίσης ότι η απώλεια λίπους προδιαθέτει σε μυϊκή απώλεια στην καρκινική καχεξία. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξε και μία μελέτη στην οποία η έκκριση της πρωτεΐνης της σχετιζόμενης με την παραθορμόνη (parathyroid hormone-related protein, PTHLH) από όγκους Lewis του πνεύμονα σε ποντίκια φαίνεται να αλλάζει τη θερμογένεση στον λιπώδη ιστό μέσω φαιοποίησης των λευκών λιποκυττάρων ¹⁵³. Η θερμογένεση ρυθμίζεται από τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη του φαιού λίπους uncoupling protein 1 (UCP1), η έκφραση της οποίας αυξάνεται σε διάφορα μοντέλα ποντικών καρκινικής καχεξίας, καθώς επίσης και στο λευκό λιπώδη ιστό ασθενών με καρκινική καχεξία ¹⁰⁹. Η χρήση αντισωμάτων έναντι της PTHLH ανέστειλε τη φαιοποίηση του λίπους, καθώς επίσης

και την απώλεια σκελετικής μυϊκής μάζας, προτείνοντας ότι ο διαφορετικός μεταβολισμός του λίπους είναι προαπαιτούμενο για τη σκελετική μυϊκή ατροφία.

Ο τρόπος με τον οποίο η απώλεια λίπους προδιαθέτει στη σκελετική μυϊκή ατροφία παραμένει άγνωστος. Παρόλο που αρκετοί τρόποι έχουν προταθεί για την εξήγηση της ογκο-επαγόμενης λιπόλυσης, όπως η παρουσία των φλεγμονωδών κυτταροκινών που απελευθερώνονται από τα μακροφάγα που διηθούν τον όγκο ^{154,155}, η επαγωγή της λιπάσης των τριγλυκεριδίων στο λίπος ¹⁵⁶ και η απώλεια της ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης του 5' AMP ¹⁵⁷, δεν είναι ξεκάθαρο αν ένας ή περισσότεροι παρακρινικοί παράγοντες δύνανται να παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδραση λίπους και σκελετικών μυών για τη ρύθμιση του καταβολισμού των πρωτεϊνών των μυϊκών ινών.

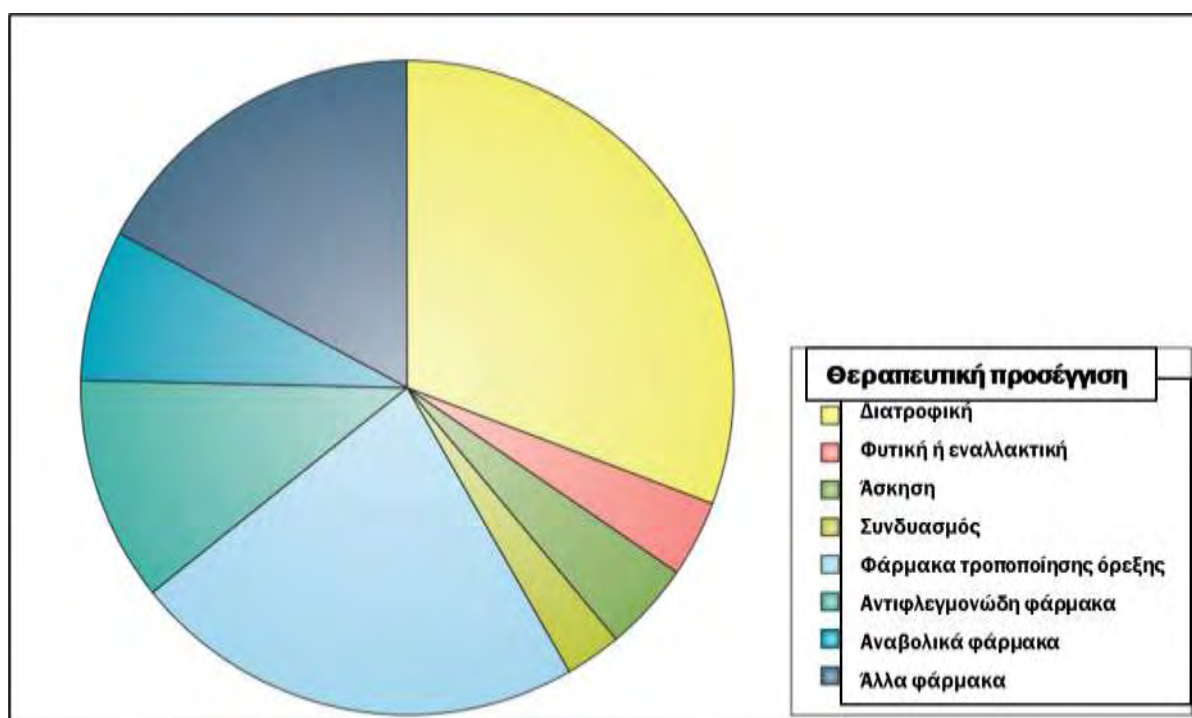
2.4.5. Καρδιακή μυϊκή ατροφία

Δεν υπάρχουν πολλές μελέτες που αφορούν στις συνέπειες της καχεξίας σε ζωτικά όργανα σε ασθενείς με καρκίνο. Οι καρδιακοί μύες εκτελούν έναν ουσιαστικό φυσιολογικό ρόλο και υποτίθεται ότι διασώζονται στην καχεξία, καθώς δεν μπορεί απλά να χρησιμοποιηθεί ως αποθετήριο αμινοξέων, όπως γίνεται με τους σκελετικούς μυς. Παρόλο που η καρδιακή ατροφία δεν έχει εκτιμηθεί σε ανθρώπους με καρκινική καχεξία, σε μοντέλα ζώων με επαγόμενη καρκινική καχεξία έχει δειχθεί ουσιαστική καρδιακή ατροφία μαζί με καρδιακή δυσλειτουργία που έχει ελεγχθεί με ηχοκαρδιογράφημα ⁹¹. Επίσης, οι μηχανισμοί της καρδιακής ατροφίας που έχουν περιγραφεί στα μοντέλα ζώων είναι παρόμοιοι με αυτούς που έχουν προταθεί για τους σκελετικούς μυς, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής, της πρωτεόλυσης, της απόπτωσης και της αυτοφαγίας ¹¹².

2.5. Θεραπεία

Λόγω της πολυπαραγοντικής παθογένειας στον καρκίνο, δεν υπάρχει διεθνώς αποδεκτή ή αποτελεσματική θεραπεία για την καρκινική καχεξία ¹⁵⁸. Ωστόσο, οι στρατηγικές αντιμετώπισης, όπως διατροφή, άσκηση και φαρμακευτική αντιμετώπιση μπορεί να είναι αποτελεσματικές στα πρώιμα στάδια της καχεξίας (Σχ. 5). Οι πρώιμες παρεμβάσεις είναι ζωτικές για τη βελτίωση της έκβασης και της ποιότητας ζωής των ασθενών σε προληπτικό επίπεδο. Δυστυχώς, οι κλινικοί γιατροί συχνά αποτυγχάνουν

να ασχοληθούν με τα πρώιμα συμπτώματα απώλειας βάρους, μέχρι να φτάσουν σε προχωρημένα στάδια, όπου όμως η θεραπεία ίσως να μην είναι αποτελεσματική. Πριν το στάδιο της καχεξίας, η προκαχεξία μπορεί να αντιμετωπιστεί με αύξηση της πρόσληψης θερμίδων και πρωτεϊνών μέσω εξατομικευμένου σχεδιασμού γευμάτων και από του στόματος συμπληρωμάτων διατροφής. Η διατροφική θεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί κατά την καχεξία και περιλαμβάνει 1,5 g πρωτεϊνών ανά κιλό βάρους κάθε μέρα ¹⁵⁹. Οι υποκείμενοι παράγοντες που οδηγούν στην ανορεξία (αδιαφορία για φαγητό, αλλαγές στη γεύση και στην όσφρηση, πρώιμο αίσθημα κορεσμού, ναυτία, διάρροια, δυσκοιλιότητα, πόνος ή κούραση) θα πρέπει να αναγνωριστούν και να αντιμετωπιστούν ¹⁶⁰. Η πρόσληψη τροφής θα πρέπει να εκτιμάται συχνά λόγω των διαφόρων συμπτωμάτων που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της θεραπείας και μπορεί να οδηγήσουν σε μειωμένη πρόσληψη τροφής ¹⁵⁹. Πρόσφατα, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής πλούσιων σε πρωτεΐνη και ιδιαίτερα λευκίνη, προκειμένου να ενεργοποιηθεί η πρωτεϊνοσύνθεση σε καταβολικούς ασθενείς με καρκίνο ^{104,161,162}. Σχετικά με τον ρόλο των απαραίτητων αμινοξέων στην πρόληψη της απώλειας μυών στη διάρκεια της νόσου του καρκίνου ή της θεραπείας του καρκίνου για τη βελτίωση της έκβασης των ασθενών χρειάζονται περισσότερες μελέτες.



Σχήμα 5. Κατανομή των θεραπευτικών προσεγγίσεων των κλινικών μελετών για τη θεραπεία της καχεξίας του καρκίνου (προσαρμογή από ²¹).

Η φυσική δραστηριότητα έχει προταθεί ως θεραπεία για τον περιορισμό της καχεξίας ως κατάστασης που σχετίζεται με σημαντική μείωση στη μυϊκή δύναμη και αντοχή ¹⁶³. Αν και ο συνδυασμός αεροβικής γυμναστικής και γυμναστικής αντίστασης των μυών ίσως είναι ευεργετικά για θεραπεία, δυστυχώς λίγες μελέτες έχουν εξετάσει τη χρησιμότητα της άσκησης ως θεραπεία για την καχεξία ¹⁶⁴. Επιπλέον, οι ασθενείς ίσως δυσκολεύονται να κάνουν άσκηση κατά τη διάρκεια της θεραπείας του καρκίνου.

Οι φαρμακευτικοί παράγοντες που είναι διαθέσιμοι για τη θεραπεία της καχεξίας από καρκίνο περιλαμβάνουν διεγερτικά της όρεξης, όπως στεροειδή, προγεσταγόνα (megesterol acetate), και καναβινοειδή (dronabinol), και μπορούν να βελτιώσουν την όρεξη και την ποιότητα ζωής. Ωστόσο, τα φάρμακα αυτά δεν επηρεάζουν την προφλεγμονώδη κατάσταση ή δεν θεραπεύουν ούτε προλαμβάνουν τη μυϊκή ατροφία και έχουν συσχετιστεί με φλεβικά θρομβοεμβολικά επεισόδια, υπογοναδισμό και ανεπάρκεια επινεφριδίων ¹⁶⁵. Οι επιλεκτικοί τροποποιητές του υποδοχέα των ανδρογόνων, οι αγωνιστές γκρελίνης, η αυξητική ορμόνη και οι αναστολείς μυοστατίνης διερευνώνται σήμερα για τη θεραπεία της καχεξίας. Επιπλέον, η θεραπεία με αντιφλεγμονώδη φάρμακα μπορούν να στοχεύσουν τους υποκείμενους μηχανισμούς που σχετίζονται με την καχεξία. Τρέχουσες μελέτες ερευνούν την επίδραση του εικοσιπεντανοϊκού οξέος, επιλεκτικών και μη επιλεκτικών COX αναστολέων anti-TNFα παραγόντων και θαλιδομίδης στην καχεξία ^{166,167}.

Κατά τη θεραπεία της καχεξίας, είναι σημαντική η εκτίμηση και αντιμετώπιση όλων των συμπτωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των ψυχολογικών (άγχος ή κατάθλιψη), στοματικών (διαταραχές γεύσης), γαστρεντερικών (ναυτία ή δυσαπορρόφηση) ή μεταβολικών αλλαγών (ανεπάρκεια θυρεοειδούς).

2.6. Καχεξία και σαρκοπενία σε ασθενείς με καρκίνο

Στους ασθενείς με καρκίνο, η καχεξία και η σαρκοπενία αποτελούν δύο διαφορετικές μυοατροφικές καταστάσεις (Πίν. 2) ¹⁶⁸. Η αιτιολογία της μυϊκής ατροφίας στη σαρκοπενία και στην καχεξία οφείλεται σε διαφορετικούς μηχανισμούς. Στη σαρκοπενία η ηλικιο-σχετιζόμενη μείωση στην ενδοκρινική σηματοδότηση και η χαμηλή πρόσληψη θερμίδων και πρωτεϊνών μόνο επιδρούν στην απώλεια μυών. Η σαρκοπενία μπορεί να εμφανιστεί μετά τη διάγνωση του καρκίνου σε μεγαλύτερους σε ηλικία ασθενείς. Αντίστροφα, η μυϊκή ατροφία στην καχεξία προκαλείται από

φλεγμονή και οξειδωτικό στρες και οδηγεί σε απώλεια μυϊκού και λιπώδους ιστού. Η καχεξία μπορεί να υπάρχει κατά τη διάγνωση του καρκίνου, αλλά κυρίως χειροτερεύει κατά την εξέλιξη της νόσου ή κατά τη διάρκεια της θεραπείας του καρκίνου. Παρά τις διαφορετικές αιτιολογίες, η μία κατάσταση μπορεί να επιδεινώσει την άλλη κατά τη διάρκεια της θεραπείας του καρκίνου. Για παράδειγμα, ένας σαρκοπενικός ασθενής με καρκίνο μπορεί να αναπτύξει καχεξία, οδηγώντας σε απώλεια της ήδη χαμηλής μυϊκής μάζας. Από την άλλη μεριά, ένας ασθενής με καρκίνο που έχει καχεξία, μπορεί επίσης να χάνει μυϊκή μάζα αυξανόμενης της ηλικίας.

Καθεμία από τις δύο καταστάσεις πρέπει να αναγνωριστεί με ακρίβεια ώστε να εφαρμοστεί η κατάλληλη θεραπεία. Η μεγιστοποίηση στην πρόσληψη θρεπτικών και τη φυσική κατάσταση και δύναμη είναι σημαντική για τη θεραπεία και των δύο καταστάσεων. Οι τρέχουσες θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν διατροφική θεραπεία και άσκηση. Η καχεξία μπορεί να προληφθεί μόνο με τη διατροφή, αν οι κατάλληλες παρεμβάσεις γίνουν στα πρώιμα στάδια της ατροφίας. Ωστόσο, όταν η καχεξία γίνει ανθεκτική, η διατροφή δε μπορεί να βελτιώσει την κατάσταση, καθώς η επιβίωση σε αυτό το στάδιο είναι μικρή, παρά τις οποιεσδήποτε παρεμβάσεις. Από την άλλη μεριά η σαρκοπενία δε αντιμετωπίζεται μόνο με τη διατροφή, και η φυσική άσκηση είναι η καλύτερη θεραπεία για τη σαρκοπενία. Σχετικά με τους φαρμακευτικούς παράγοντες, η αναγνώριση του μηχανισμού σε κάθε περίπτωση είναι σημαντικός για τη συνταγογράφηση φαρμάκων που στοχεύουν είτε τη φλεγμονή είτε τα μεταβολικά μονοπάτια που είναι ειδικά για τους μυς.

Πίνακας 2. Αιτιολογία, διαγνωστικά κριτήρια, επιπολασμός και θεραπεία της σαρκοπενίας και της καχεξίας στον καρκίνο (Προσαρμογή από ¹⁶⁸)

	Σαρκοπενία	Καχεξία
Εμφάνιση	Συνήθως εμφάνιση μετά τη διάγνωση του καρκίνου	Μπορεί να εμφανιστεί κατά τη διάγνωση του καρκίνου, αν καθυστερήσει. Συνήθως χειροτερεύει κατά τη θεραπεία του καρκίνου.
Αιτιολογία	Ηλικιο-σχετιζόμενη μείωση της μυϊκής μάζας λόγω νευροεκφύλισης, ανεπαρκούς σηματοδότησης (αντίσταση στην ινσουλίνη και μειωμένα επίπεδα αυξητικής ορμόνης, ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα και τεστοστερόνης)	Συστηματική φλεγμονή και ακόλουθη ενεργοποίηση κυτταροκινών (TNFα, IL-1, IL-6 και IFN-γ) που οδηγούν σε ανορεξία, και ατροφία μυϊκού και λιπώδους ιστού μέσω διαφορετικού μεταβολισμού μακροθρεπτικών (μειωμένη

	φλεγμονή, αχρηστία (σχετιζόμενη με μειωμένη φυσική άσκηση ή ακινησία) και/ή μείωση της πρόσληψης θρεπτικών	πρωτεϊνοσύνθεση, αυξημένη αποικοδόμηση πρωτεϊνών, ενισχυμένη λιπόλυση, κατασταλασμένη λιποπρωτεϊνική λιπάση στο λιπώδη ιστό, ενισχυμένη ηπατική παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης, αυξημένη γλυκονογένεση και αντίσταση στην ινσουλίνη)
Διαγνωστικά κριτήρια	Συνδυασμός χαμηλής μυϊκής μάζας (μέτρηση με αζονική τομογραφία, μαγνητική τομογραφία, διπλής ενέργειας απορροφησιμετρία με ακτίνες X, ανάλυση βιοηλεκτρικής αντίστασης, ολική μέτρηση καλίου και περιφέρεια μυών μέσου βραχίονα), χαμηλής μυϊκής δύναμης (μέτρηση με δύναμη λαβής, κάμψη και έκταση γονάτου και μέγιστη εκπνευστική ροή) και κακής φυσικής κατάστασης (μέτρηση με ταχύτητα βαδίσματος, τεστ χρόνου αναστήκωσης και έναρξης βαδίσματος, τεστ ανεβάσματος σκάλας και Short Physical Performance Battery)	Απώλεια βάρους >5% τους τελευταίους 6 μήνες. BMI <20 kg/m ² με απώλεια βάρους >2% ή σαρκοπενία με απώλεια βάρους >2% εξαιτίας χαμηλής πρόσληψης τροφής και συστηματικής φλεγμονής.
Επιπολασμός	15%-50% σε ασθενείς με καρκίνο (10%-75% με αζονική τομογραφία)	25%-80% σε ασθενείς με καρκίνο.
Θεραπεία	Δεν υπάρχει διεθνώς αποδεκτή θεραπεία αντιστροφής ή πρόληψης της σαρκοπενίας. Οι ασκήσεις αντίστασης και η αεροβική μπορούν να αυξήσουν τη μυϊκή δύναμη και τη μυϊκή μάζα του σώματος και να βελτιώσουν τη λειτουργική κατάσταση. Η αύξηση των διατροφικών πρωτεϊνών και της βιταμίνης D μπορεί επίσης να βελτιώσει την πρωτεϊνική σύνθεση.	Δεν υπάρχει διεθνώς αποδεκτή θεραπεία αντιστροφής ή πρόληψης της καχεξίας. Η αύξηση της πρόσληψης θερμίδων και πρωτεϊνών μπορούν να αποτρέψουν την απώλεια βάρους. Η άσκηση μπορεί να βελτιώσει τη μυϊκή μάζα. Τα διεγερτικά της όρεξης μπορούν να αυξήσουν την πρόσληψη θερμίδων, αλλά δεν επηρεάζουν τη μυϊκή μάζα.

2.7. Καχεξία ως προγνωστικός δείκτης στον καρκίνο

Η σαρκοπενία και η παχυσαρκία έχουν συσχετιστεί με την αποτελεσματικότητα της θεραπείας και την πρόγνωση σε διάφορους τύπους καρκίνου. Στο μη

μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα ασθενείς με μετάλλαξη στον EGFR που ήταν λιποβαρείς είχαν χειρότερη πρόγνωση (διάστημα υποτροπής νόσου και επιβίωση) μετά από θεραπεία με αναστολείς τυροσινικής κινάσης (TKI) ¹⁶⁹. Σε μετα-ανάλυση του 2019 η σαρκοπενία σχετίστηκε με μικρότερη συνολική επιβίωση ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, τόσο στο μη μικροκυτταρικό, όσο και στο μικροκυτταρικό ¹⁷⁰. Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως η σαρκοπενία έχει συσχετιστεί με αυξημένη συχνότητα περιεγχειρητικών επιπλοκών κατά τη ριζική κυστεκτομή, αλλά και χειρότερη πρόγνωση, τόσο σε ασθενείς που έχουν χειρουργηθεί, όσο και σε ασθενείς με ανεγχείρητη νόσο, ενώ ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνωμα που είχαν υποβληθεί σε πλατινούχο χημειοθεραπεία και ανέκτησαν σκελετική μυϊκή μάζα είχαν καλύτερη πρόγνωση ^{171,172}. Αλλά και στον κολοορθικό καρκίνο, η εξελισσόμενη σαρκοπενία μετά τη διάγνωση του καρκίνου έχει συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση (διάστημα ελεύθερο νόσου και συνολική επιβίωση) ¹⁷³. Στον παγκρεατικό καρκίνο, όπου το 80% των θανάτων οφείλονται στην καχεξία, ασθενείς που είχαν καχεξία και χειρουργήθηκαν ή έλαβαν ανακουφιστική θεραπεία παρουσίασαν μικρότερη επιβίωση σε σχέση με τους μη καχεκτικούς ⁸⁹. Πρόσφατη μελέτη σε ασθενείς με προχωρημένο γαστρικό καρκίνο που αντιμετωπίστηκαν με ανακουφιστική χημειοθεραπεία, έδειξε ότι ασθενείς με σαρκοπενία που επιβεβαιώθηκε με αξονική τομογραφία είχαν χειρότερη πρόγνωση ¹⁷⁴.

2.8. Καχεξία ως προβλεπτικός δείκτης στον καρκίνο

Η καχεξία έχει συσχετιστεί όχι μόνο με την πρόγνωση, αλλά και με την πρόβλεψη της ανταπόκρισης σε θεραπεία και της τοξικότητας της χημειοθεραπείας ¹⁷⁵. Οι μεταβολικές αλλαγές που συμβαίνουν στην καχεξία έχουν σαν αποτέλεσμα μειωμένη ανοσία κατά του καρκίνου, με αποτέλεσμα να επηρεάζουν αρνητικά την ανοσοθεραπεία που εφαρμόζεται σήμερα σε ορισμένους τύπους καρκίνου. Στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ασθενείς που είχαν καχεξία πριν ή ανέπτυξαν καχεξία κατά τη διάρκεια της θεραπείας με αναστολείς ανοσολογικού ελέγχου είχαν λιγότερο συχνά ανταπόκριση στη θεραπεία και είχαν μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου και μικρότερη επιβίωση ^{176,177}. Στον μεταστατικό καρκίνο νεφρού, η θεραπεία με sorafenib μπορεί να επιτείνει τη σαρκοπενία ακόμα

και σε ασθενείς με φυσιολογικό ή υψηλό BMI και σχετίζεται με την αδυναμία, την κόπωση και τη φυσική αναπηρία ⁹².

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. Επιγενετική

Ο όρος επιγενετική χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον αναπτυξιακό βιολόγο C. H. Waddington το 1939, για να περιγράψει τις «αλληλεπιδράσεις των γονιδίων με το περιβάλλον τους, οι οποίες δίνουν υπόσταση στο φαινότυπο»¹⁷⁸. Λίγο αργότερα ο ίδιος επισήμανε ότι «είναι δυνατό μία προσαρμοστική απόκριση να διορθωθεί χωρίς να χρειάζεται να συμβεί μία μετάλλαξη»¹⁷⁹. Το 1987 η επιγενετική επαναπροσδιορίστηκε ως εκείνες οι αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, οι οποίες είναι κληρονομήσιμες αλλά δεν εμπλέκουν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA¹⁸⁰.

Κλασικά, οι επιγενετικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση του DNA, τη γονιδιωματική αποτύπωση (genomic imprinting), τις τροποποιήσεις των ιστονών και την παραγωγή μη κωδικών μορίων RNA (non coding RNAs, ncRNAs)¹⁸¹.

3.1. Μεθυλίωση DNA

Η μεθυλίωση του DNA παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της γονιδιακής δραστηριότητας και την αρχιτεκτονική του πυρήνα των κυττάρων. Στους ανθρώπους, η μεθυλίωση του DNA συμβαίνει στον άνθρακα-5 της κυτοσίνης των CpG νησίδων που υπάρχουν στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων και καταλύεται από τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs). Οι CpG νησίδες δεν είναι τυχαία κατανομημένες στο γονιδίωμα, αλλά βρίσκονται συνήθως στις ρυθμιστικές περιοχές του 40-60% όλων των γονιδίων¹⁸². Η μεθυλίωση των CpG νησίδων των υποκινητών εμποδίζει την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων στο DNA και επηρεάζει την επιστράτευση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, προκαλώντας αποσιώπηση των αντίστοιχων γονιδίων¹⁸³. Η μεθυλίωση των CpG νησίδων στα φυσιολογικά κύτταρα περιορίζεται στα αμετάγραφα γονίδια του X χρωμοσώματος, στα γονίδια της γαμετικής σειράς και κάποια ιστοειδικά γονίδια. Επίσης, και η γονιδιωματική αποτύπωση είναι ένα φαινόμενο που εξαρτάται από τη μεθυλίωση και συμβαίνει κατά την εμβρυογένεση, έχοντας σαν αποτέλεσμα την έκφραση γονιδίων προέλευσης ενός γονέα και συγκεκριμένων γονιδιωματικών περιοχών¹⁸⁴. Στα καρκινικά κύτταρα η υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων είναι κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα και σχετίζεται με την αποσιώπηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων^{185,186}. Ο ρόλος της

μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο έχει αναδειχθεί σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του καρκίνου, από τα πρωταρχικά στάδια μέχρι και τη μετάσταση^{187,188}.

3.2. Τροποποίηση ιστονών

Το πυρηνικό DNA δομείται σε χρωματίνη, ένα ικρίωμα DNA με ιστονικές και μη ιστονικές πρωτεΐνες, που αλλάζει διαμόρφωση για να ρυθμίσει τη δραστηριότητα του DNA. Η χρωματίνη στη χαλαρή της κατάσταση (ευχρωματίνη) επιτρέπει τη μεταγραφή του DNA, ενώ στη σφιχτή της δομή (ετεροχρωματίνη) δεν επιτρέπει τη μεταγραφή του DNA. Επομένως, η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων επηρεάζεται άμεσα από τη δυναμική αναδιαμόρφωση της χρωματίνης¹⁸⁹. Τροποποιήσεις όπως η μεθυλίωση ή η ακετυλίωση των ιστονών μπορούν να διαμορφώσουν τη δομή της χρωματίνης και να έχουν κριτικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και της προσβασιμότητας των μεταγραφικών παραγόντων, των συνενεργοποιητών και των συγκαταστολέων¹⁹⁰.

3.3. Non-coding RNAs

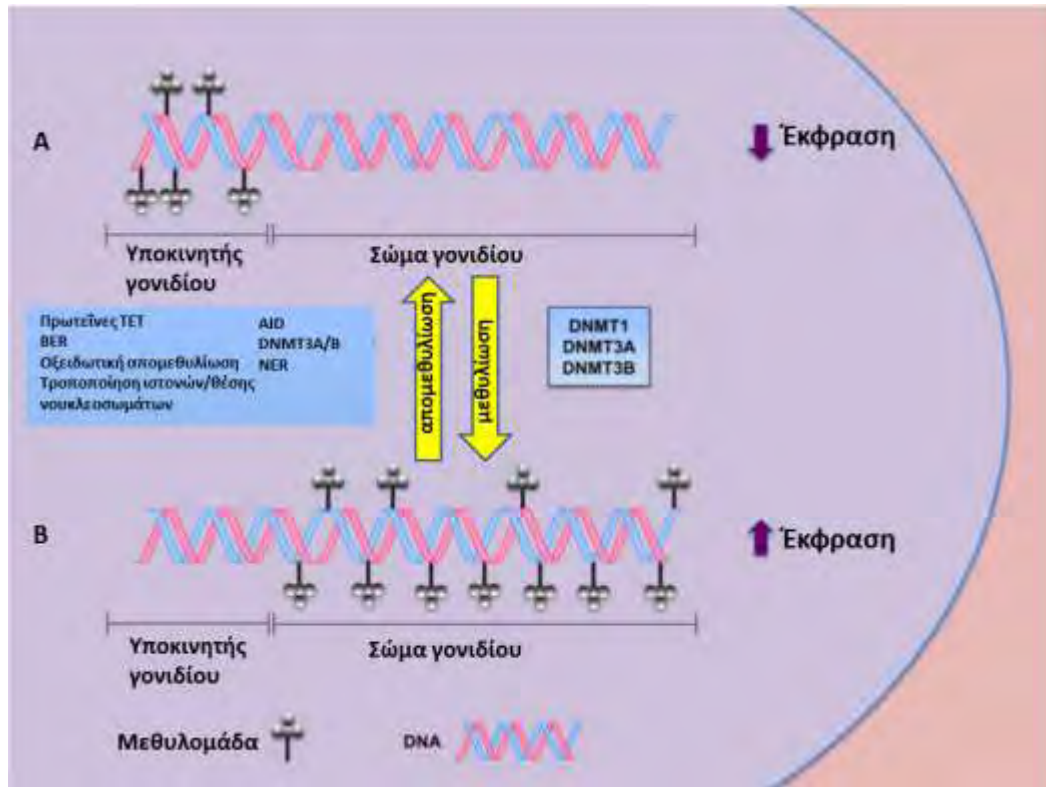
Η παραγωγή RNA από το γονιδιωματικό DNA κατευθύνεται από αλληλουχίες που καθορίζουν την αρχή και το τέλος των μεταγράφων και το μάτισμά τους σε ώριμα RNAs¹⁹¹. Παρόλο που το 93% του ανθρώπινου γονιδιώματος μπορεί να μεταγραφεί σε RNA, μόνο το 2% των μεταγράφων αυτών μπορεί να μεταφραστεί σε πρωτεΐνες. Τα υπόλοιπα RNAs έχουν πολύ μικρό ή καθόλου δυναμικό να μεταφραστούν σε πρωτεΐνες και ονομάζονται μη κωδικά RNAs (non-coding RNAs, ncRNAs). Μέχρι πρόσφατα οι επιστήμονες αγνοούσαν τη σημασία των ncRNAs και τα θεωρούσαν σκοτεινή ύλη (dark matter). Τα ncRNAs περιλαμβάνουν τις επιμέρους κατηγορίες των rRNAs (ribosomal RNAs), των microRNAs, των tRNAs (transfer RNAs), των μιτοχονδριακών ncRNAs, των μικρών πυρηνικών RNAs (snRNAs), των μικρών πυρηνιακών RNAs (small nucleolar RNAs, snoRNAs), των παρεμβαλλόμενων RNAs (RNAi), και πολλά μεγάλου μήκους διαγονιδιακά ncRNAs (long intergenic ncRNAs, lincRNAs¹⁹¹⁻¹⁹³. Ανάλογα με το μέγεθος των μεταγράφων τα ncRNAs διακρίνονται σε μικρού (short non-coding RNAs) ή μεγάλου μήκους (long non-coding RNAs, lincRNAs) μη κωδικά RNAs. Στα lincRNAs ανήκουν τα ncRNAs, τα οποία είναι μεγαλύτερα των 200 nt, αποτελώντας ταυτόχρονα περισσότερο από το 80% των ncRNAs των θηλαστικών.

Τα πιο καλά μελετημένα ncRNAs είναι τα miRNAs, τα οποία είναι μικρά ncRNAs μήκους 19-24 περίπου νουκλεοτιδίων, τα οποία όμως ρυθμίζουν το 60% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ¹⁹⁴. Η ρύθμιση αυτή πραγματοποιείται μέσω πρόσδεσης σε mRNAs και αποικοδόμησης του mRNA ή καταστολής της μετάφρασης, εμπλέκονται δε στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση, την απόπτωση και την ανάπτυξη ¹⁹¹. Τα miRNAs περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1990, αλλά η ανάμειξή τους στην ανάπτυξη του καρκίνου αναφέρθηκε το 2002 ¹⁹⁵. Από τότε, πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με τη συμμετοχή των miRNA σε κάθε στάδιο ανάπτυξης μίας κακοήθειας, όπως τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μετανάστευση, τη διήθηση κ.ά. ^{196,197}. Η έκφραση των ίδιων των miRNAs ρυθμίζεται με διάφορους μηχανισμούς, μεταξύ των οποίων και η μεθυλίωση ¹⁹⁸. Μέχρι σήμερα πάνω από 1000 miRNAs έχουν αναγνωριστεί, ενώ η ανίχνευσή τους σε βιολογικά υγρά τα καθιστά πιθανούς επιγενετικούς βιοδείκτες για την πρόγνωση, διάγνωση και θεραπεία πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου, τόσο μέσω της αλληλεπίδρασής τους με mRNA γονιδίων που εμπλέκονται στον καρκίνο, όσο και με lncRNAs ^{199,200}.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4. Ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στην καρκινική καχεξία

Η επίδραση της μεθυλίωσης του DNA στη γονιδιακή έκφραση εξαρτάται από την περιοχή μέσα στο γονιδίωμα. Η μεθυλίωση του DNA στην περιοχή του υποκινητή και των ενισχυτών των γονιδίων σχετίζεται με τη μεταγραφική καταστολή, ενώ η αμεθυλίωτη κατάσταση υποκινητών και ενισχυτών σχετίζεται με μεταγραφική ενεργότητα. Αντίθετα, η μεθυλίωση του DNA μέσα στο σώμα του γονιδίου σχετίζεται με μεταγραφική ενεργότητα. Η μεθυλίωση του DNA αλλάζει τη διαμόρφωση της χρωματίνης σε πιο συμπακνωμένη μορφή, καθιστώντας την απροσπέλαστη από τη μεταγραφική μηχανή. Η μεθυλίωση του DNA ρυθμίζεται ενεργά από μία οικογένεια ενζύμων που ονομάζονται DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs) και αποτελείται από τις DNMT1, DNMT3A, DNMT3B και DNMT3L. Ενώ η DNMT1 είναι κυρίως υπεύθυνη για τη διατήρηση της μεθυλίωσης του DNA κατά τη διαίρεση των κυττάρων, οι DNMT3A και 3B απαιτούνται για την πρόιμη εμβυϊκή ανάπτυξη και τα αντίστοιχα πρότυπα μεθυλίωσης. Η μεθυλίωση του DNA καταλύεται από τη DNMT1 μέσω απόκτησης μίας μεθυλομάδας από μία δότρια S-αδενοσυλομεθειονίνη. Αντίστοιχα, η απομεθυλίωση μπορεί να γίνει με μετατροπή της μεθυλοκυτοσίνης σε υδροξυμεθυλοκυτοσίνη από τις πρωτεΐνες TET (ten-eleven translocation proteins), από το σύστημα επιδιόρθωσης εκτομής βάσης της μεθυλοκυτοσίνης (BER), από απαμίνωση της μεθυλοκυτοσίνης και ακόλουθη εκτομή από το BER), οξειδωτική απομεθυλίωση και απαμίνωση (AID) (Σχ. 6).



Σχήμα 6. Η επίδραση της μεθυλίωσης του DNA στη γονιδιακή έκφραση εξαρτάται από την περιοχή μέσα στο γονιδίωμα που είναι μεθυλιωμένη. Στο σχήμα A η μεθυλίωση του DNA στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου σχετίζεται με καταστολή της μεταγραφής. Αντίθετα, στο σχήμα B όπου στο σώμα του γονιδίου το DNA είναι μεθυλιωμένο, η μεθυλίωση σχετίζεται με ενεργή μεταγραφή. Η μεθυλίωση του DNA καταλύεται κυρίως από τη DNA μεθυλοτρανσφεράση 1 (DNMT1), με μεταφορά μιας μεθυλομάδας από μία δότρια S-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM). Ωστόσο, οι DNMT3A και 3B είναι ζωτικές για τη μεθυλίωση του DNA στο έμβryo και κατά την πρώιμη ανάπτυξη. AID activation-induced cytidine deaminase, BER base excision repair, DNMT1 DNA methyltransferase-1, DNMT3A DNA methyltransferase-3A, DNMT3B DNA methyltransferase-3B, NER nucleotide excision repair, TET ten-eleven translocation protein. Προσαρμογή από ²⁰¹.

Η γήρανση σχετίζεται με αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA σε όλους τους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του μυϊκού ιστού, και με βάση τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA στους ιστούς μπορεί να υπολογιστεί η χρονολογική ηλικία. Από την άλλη μεριά, η σαρκωπενία χαρακτηρίζεται από σταδιακή μείωση στη μυϊκή δύναμη, μάζα και λειτουργία κατά τη γήρανση. Σε μία πρόσφατη μελέτη, έγινε προσπάθεια δημιουργίας ενός «επιγενετικού ρολογιού» το οποίο θα περιελάμβανε επιγενετικές αλλαγές στο μυϊκό ιστό λόγω γήρανσης ²⁰². Στη μελέτη αυτή αναγνώρισαν 180 γονιδιωματικές περιοχές με διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης ανάλογα με την ηλικία στον μυϊκό ιστό

και ανέπτυξαν ένα μοντέλο πρόβλεψης της ηλικίας ειδικό για τον μυϊκό ιστό με βάση το επιγενετικό αυτό ρολόι, το οποίο είναι ειδικότερο από αυτό που υπάρχει για όλους τους ιστούς.

Σε άλλη επίσης πρόσφατη μελέτη από τους He *et al.*, όπου συγκρίθηκε το πρότυπο μεθυλίωσης στο αίμα σαρκοπενικών και μη σαρκοπενικών γυναικών ηλικίας 65-80 ετών παρατήρησαν διαφορές στη μεθυλίωση ανάμεσα στις δύο ομάδες ²⁰³. Συγκεκριμένα, οι CpG νησίδες στους υποκινητές και ιδιαίτερα στην περιοχή TSS200 (η περιοχή που περιλαμβάνει 200 nt πριν την έναρξη της μεταγραφής) και σε μερικές διαγονιδιακές περιοχές είχαν υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης στην ομάδα των σαρκοπενικών γυναικών σε σχέση με τις μη σαρκοπενικές γυναίκες ίδιας ηλικίας, ενώ αντίθετα είχαν χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης στο σώμα των γονιδίων και στις 3' UTR περιοχές. Επιπλέον, οι μεθυλιωμένες περιοχές με τη μεγαλύτερη διαφορά αφορούσαν γονίδια που σχετίζονται με τη μυϊκή λειτουργία, τον μεταβολισμό της ενέργειας και τη ρύθμιση του κυτταροσκελετού. Μάλιστα, τα πρότυπα μεθυλίωσης των σαρκοπενικών γυναικών για 7 γονίδια (*HSPB1*, *PBX4*, *CNKS3*, *ORMDL3*, *MIR10A*, *ZNF619* και *CRADD*) συμφωνούν με αντίστοιχες μελέτες μεθυλίωσης κατά τη γήρανση σε δείγματα αίματος, ενώ για 54 γονίδια τα πρότυπα μεθυλίωσης συμφωνούν με μελέτες άσκησης με αντίσταση ²⁰³.

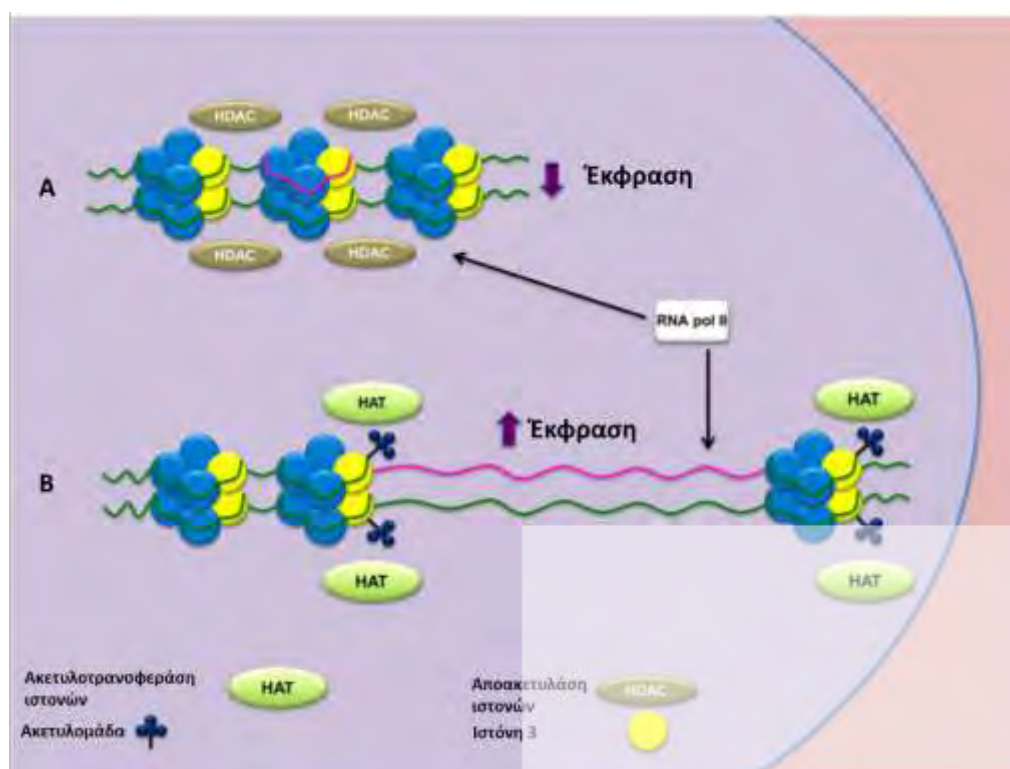
Εκτός από το ρόλο της ποιότητας και της ποσότητας των σκελετικών μυών, έχει προταθεί και η συνεισφορά της μνήμης ή επαναπρογραμματισμού των σκελετικών μυών στην επιταχυνόμενη μυϊκή απώλεια στους ηλικιωμένους σε συνάρτηση με το στρες που μπορεί να βιώσει νωρίς στη ζωή του ένα άτομο, όπως ο εμβρυϊκός υποσιτισμός. Επιπλέον, τα μυϊκά κύτταρα που καλλιεργούνται *in vitro* φαίνονται να θυμούνται το *in vivo* περιβάλλον από το οποίο απομονώθηκαν (π.χ. καρκίνος, παχυσαρκία, διαβήτης τύπου II, έλλειψη σωματικής άσκησης και περιορισμός θρεπτικών συστατικών). Ο TNFα χρονίως είναι αυξημένος στη σαρκοπενία και στην καρκινική καχεξία και τα αυξημένα επίπεδα σχετίζονται με τη μυϊκή απώλεια, τη μειωμένη δύναμη και επομένως με νοσηρότητα και πρόωμη θνητότητα. Σχετικά με τη μυϊκή απώλεια, υπάρχουν δεδομένα που προτείνουν ότι η μεθυλίωση του γονιδίου *myoD* διατηρείται κατά τη διάρκεια ζωής των μυϊκών κυττάρων που διαιρούνται ως αποτέλεσμα της επίδρασης με TNFα νωρίς στη ζωή τους και παίζει ρόλο στη μυϊκή απώλεια. Συγκεκριμένα, σε μυοβλάστες στους οποίους είχαν επιδράσει νωρίς με TNFα, μετά από 30 κυτταρικές διαιρέσεις τα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου *myoD*

συνέχιζαν να παραμένουν αυξημένα, ενώ τα κύτταρα παρουσίαζαν μειωμένη μορφολογική και βιοχημική μυϊκή διαφοροποίηση²⁰⁴.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5. Ο ρόλος των ιστονών στην καρκινική καχεξία

Τα νουκλεοσώματα αποτελούνται από τέσσερα ζεύγη ιστονών (H2A, H2B, H3 και H4) και την ιστόνη H1 (συνδετική πρωτεΐνη), γύρω από τα οποία DNA μήκους περίπου 150 ζευγών βάσεων είναι τυλιγμένο και πακεταρισμένο. Επιγενετικές αλλαγές στις ιστόνες αλλάζουν τη δομή της χρωματίνης και διαμορφώνουν τη γονιδιακή έκφραση, η οποία εξαρτάται από την περιοχή και τον τύπο της επιγενετικής τροποποίησης (ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, απαμίνωση, ουβικουΐτίνωση κ.ά.) ή τον βαθμό της μεθυλίωσης των ιστονών (μονο-, δι- ή τρι-μεθυλίωση). Η ακετυλίωση που χρειάζονται οι ιστόνες μεσολαβείται από ένζυμα που ονομάζονται ακετυλοτρασφεράσες ιστονών (HATs), ενώ αντίστροφα η αποακετυλίωση καταλύεται από ένζυμα που ονομάζονται αποακετυλάσες ιστονών (HDACs). Η ακετυλίωση των ιστονών μετατοπίζει τη θέση των νουκλεοσωμάτων με αποτέλεσμα την προαγωγή ή την καταστολή της μεταγραφής, εκθέτοντας περιοχές που είναι απαραίτητες για την πρόσδεση της μεταγραφικής μηχανής (Σχ. 7).



Σχήμα 7. Μηχανισμοί δράσης της ακετυλίωσης ιστονών. Το γονίδιο στο σχήμα A είναι τυλιγμένο γύρω από τρία νουκλεοσώματα. Οι ιστόνες 3 είναι αποακετυλιωμένες στη λυσίνη 9 (H3K9) από αποακετυλάσες ιστονών (HDAC), ένα επιγενετικό στίγμα

καταστολής της μεταγραφής. Τα δύο νουκλεοσώματα που περιβάλλει το γονίδιο στο σχήμα Β έχουν ακετυλιωθεί στη λυσίνη 9 της ιστόνης 3 (H3K9ac) από ακετυλοτρασφεράσες ιστονών (HAT), το οποίο αποτελεί επιγενετικό στίγμα ενεργοποίησης της μεταγραφής. Προσαρμογή από ²⁰¹.

Οι μεταγραφικοί ενεργοποιητές, επιστρατεύουν πολλούς συν-ρυθμιστικούς παράγοντες, οι οποίοι διαθέτουν ενζυματική δράση έναντι των ιστονών και των μεταγραφικών παραγόντων, και γενικότερα ορίζονται ως σύμπλοκα τροποποίησης της χρωματίνης ²⁰⁵. Δύο οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων ελέγχουν την έκφραση των ειδικών για τους μυς γονιδίων: οι ρυθμιστικοί παράγοντες των μυών (muscle regulatory factors, MRFs) MyoD, Myf5, μυογενίνη και MRF4, και τα μέλη της οικογένειας MEF2, MEF2A έως D ²⁰⁶. Η αναγέννηση των σκελετικών μυών είναι μία πολύ καλά συγχρονισμένη διαδικασία που περιλαμβάνει ενδοκυττάρια μονοπάτια, αναβολικά και καταβολικά. Η E3 λιγάση *MuRF1* είναι γονίδιο κλειδί για τη σκελετική μυϊκή απώλεια και η *MuRF2* παίζει ρόλο στη σκελετική μυϊκή αναγέννηση. Πρόσφατη μελέτη των Moriscot et al. έδειξε ένα συνεργατικό ρόλο για τις E3 λιγάσες *MuRF1* και *MuRF2* στη σκελετική μυϊκή αναγέννηση και στη μυογένεση επάγωντας το άνοιγμα της χρωματίνης ²⁰⁷.

Πολύ λίγα είναι τα δεδομένα που υπάρχουν σχετικά με το ρόλο των ιστονών στην καχεξία. Μία από τις τροποποιήσεις που υφίστανται οι ιστόνες είναι η ακετυλίωση και η αποακετυλίωση. Η Sirtuin 1 (Sirt1), μία αποακετυλάση εξαρτώμενη από NAD, αποακετυλιώνει πρωτεΐνες που συνεισφέρουν στην κυτταρική ρύθμιση και είναι ρυθμιστές κλειδιά της κυτταρικής άμυνας και επιβίωσης ως απόκριση στο στρες. Σε καλλιέργεια μυοβλαστών, η έκφραση της Sirt1 έχει βρεθεί ότι αυξάνεται σε καταστάσεις στρες και συμβάλει στη μείωση του θανάτου των μυοβλαστών, ενώ ρυθμίζει την επιβίωση των σκελετικών μυών και ενισχύει τη διαφοροποίηση παρουσία ρεζερβατρύλης ²⁰⁸.

Η ακετυλίωση και η μεθυλίωση της λυσίνης των πρωτεϊνών αποτελούν κύριους μηχανισμούς μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που ρυθμίζουν τις κυτταρικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της διαφοροποίησης των μυοβλαστών ²⁰⁹. Σε μία μελέτη από τους Byun et al. υποστηρίζεται ότι η HDAC11 μπορεί να καταστείλει τη διαφοροποίηση των μυοβλαστών μέσω ρύθμισης της μεταγραφής που εξαρτάται από τη MyoD ²⁰⁹. Συγκεκριμένα, στην κυτταρική σειρά μυοβλαστών C2C12 το πρότυπο

έκφρασης της HDAC11 έχει βρεθεί ότι αυξάνεται σημαντικά κατά τη διαφοροποίηση των μυοβλαστών, ενώ η έκτοπη έκφραση της HDAC11 ανέστειλε εντελώς τη διαφοροποίηση των μυοβλαστών παράλληλα με τη μείωση της έκφρασης μυογενών παραγόντων, σε αντίθεση με τη μεταλλαγμένη και ανενεργή HDAC11 (H142/143A), η οποία δεν ανέστειλε τη διαφοροποίηση των μυοβλαστών. Επιπλέον, η αγρίου τύπου HDAC11, κατέστειλε τη δράση των MEF2C και MYOG (Myogenin), που επάγεται από τη MyoD και μείωσε την ακετυλίωση των ιστονών πλησίον των E-boxes, της MyoD και των υποκινητών των MEF2C και MYOG, ενώ δεν παρατηρήθηκε η ίδια δράση και για τη μεταλλαγμένη HDAC11 ²⁰⁹.

Η τριχοστατίνη A (TSA), ένας αναστολέας αποακετυλίωσης ιστονών, έχει βρεθεί ότι μπορεί να εξουδετερώσει τη μυϊκή ατροφία που επάγεται από εκφόρτωση σε πειραματικό μοντέλο μυός, μέσω ρύθμισης του γονιδίου *MuRF1* ²¹⁰. Συγκεκριμένα η TSA, μείωσε τη μυϊκή ατροφία, απέτρεψε την απώλεια ινών τύπου I και II και ανέστρεψε τη μετάπτωση των βραδείων ινών σε ταχείες ίνες. Η έκφραση των γονιδίων της μυστατίνης και της φολιστατίνης παρέμεινε αμετάβλητη και το μονοπάτι της αυτοφαγίας-λυσοσωμάτων παρέμεινε μη ενεργοποιημένο, ενώ κατεστάλη η έκφραση της *MuRF1*, χωρίς να επηρεαστεί ο μεταγραφικός παράγοντας Foxo3 ²¹⁰.

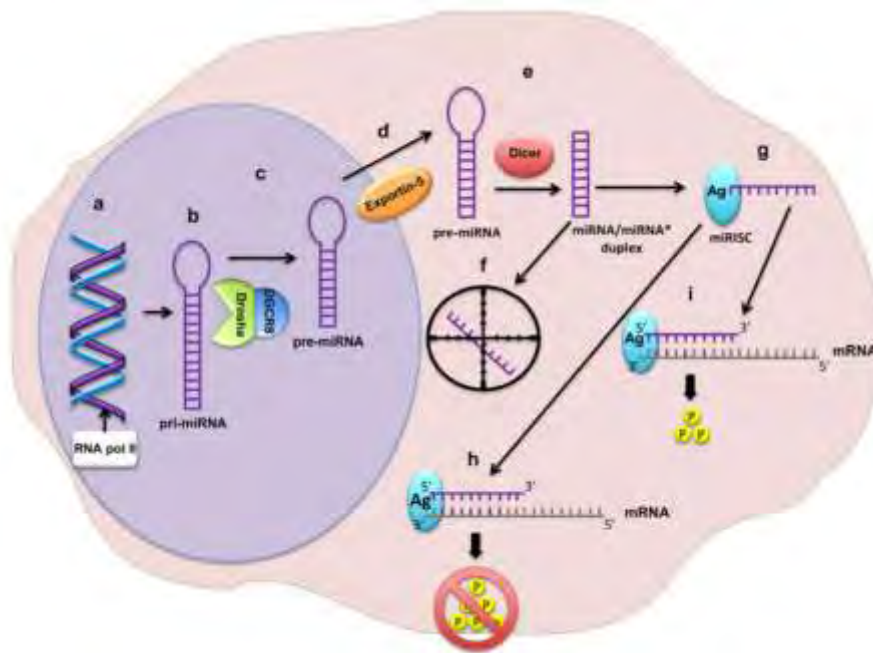
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6. Ο ρόλος των non- coding RNAs στην καρκινική καχεξία

Τα τελευταία χρόνια, έχει αναδειχθεί η σημασία του ρόλου των miRNAs και άλλων ncRNAs στην παθογένεια πολλών ασθενειών. Πρόσφατα, τα ncRNAs έχουν αρχίσει να συσχετίζονται και με την καρκινική καχεξία τροποποιώντας βασικές λειτουργίες, όπως τον κύκλο εργασιών των σκελετικών μυών και του λιπώδους ιστού²¹¹. Επιπλέον, τα κυκλοφορούντα ncRNAs αποτελούν πιθανούς βιοδείκτες για τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκινικής καχεξίας^{212,213}.

6.1. miRNAs

Τα miRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II αρχικά σε πρόδρομα μόρια pri-miRNA (pri-miRNA) και στη συνέχεια επεξεργάζονται από μία ενδοριβονουκλεάση, το ενζυμικό σύμπλοκο Drosha–DGCR8 RNase, σχηματίζοντας ένα πρόδρομο δίκλωνο miRNA (pre-miRNA) (Σχ. 8)²¹⁴. Η Drosha εντοπίζεται στον πυρήνα και μετά την επεξεργασία του pre-miRNA αποτελείται από ένα βρόχο περίπου 70 νουκλεοτιδίων, με ατελή συμπληρωματικότητα¹⁹⁴. Αυτό το pre-miRNA εξάγεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα από την exportin5 (XPO5), ένα Ran μεταφορέα εξαρτώμενο από GTP. Στο κυτταρόπλασμα τα miRNAs υφίστανται επιπλέον ωρίμανση κατά την οποία το δίκλωνο RNA διαχωρίζεται από το ένζυμο Dicer. Η Dicer διαχωρίζει αυτά τα πρόδρομα μόρια δημιουργώντας το ώριμο miRNA και το συμπληρωματικό του (miRNA'), με μήκος περίπου 21-25 νουκλεοτίδια. Στη συνέχεια, τα ώριμα miRNAs προσδένονται από τις πρωτεΐνες Argonaute (Ago) και ενσωματώνονται στο σύμπλοκο miRISC (miRNA induced silencing complex), ενώ το συμπληρωματικό miRNA' μπορεί να αποικοδομηθεί ή να σχηματίσει ένα άλλο σύμπλοκο miRISC¹⁹⁴.

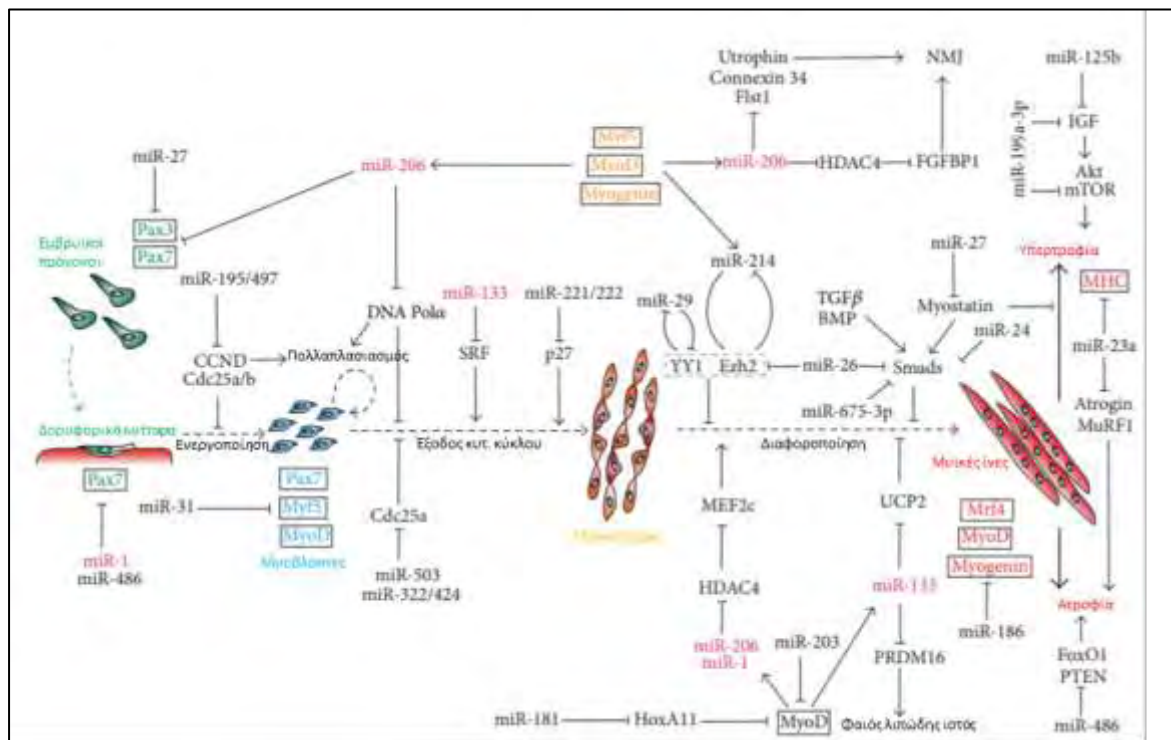


Σχήμα 8. Η βιογένεση των miRNAs και η μειορύθμιση μέσω πρόσδεσης στην 3' UTR των mRNAs. (a) Ένα γονίδιο που κωδικοποιεί ένα miRNA μεταγράφεται από την RNA πολυμέραση II (RNA pol II), (b) παράγοντας ένα πρόδρομο miRNA (pri-miRNA). (c) Το pri-miRNA κόβεται από ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από τη Drosha και τη DGCR8, παράγοντας το pre-miRNA. (d) Το pre-miRNA μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα από την πρωτεΐνη Exportin-5, (e) όπου κόβεται επιπλέον από τη Dicer, σχηματίζοντας ένα διμερές miRNA/miRNA*. (f) Από το διμερές αυτό, το miRNA* αποικοδομείται, ή μπορεί να έχει και αυτό ρόλο στη ρύθμιση των mRNAs. (g) Οι πρωτεΐνες argonaute (Ag) προσκολλώνται στο ώριμο miRNA, σχηματίζοντας το σύμπλοκο (miRISC), (h) το οποίο μπορεί να ρυθμίζει την αφθονία μιας πρωτεΐνης, μέσω καταστολής του μεταγραφέντος RNA, όταν η περιοχή του miRNA είναι μερικώς συμπληρωματική στην 3' UTR του mRNA στόχου (μήκους 7 βάσεων), ή μπορεί να οδηγήσει σε καταστολή του mRNA και ακόλουθη αποικοδόμηση, όταν οι περιοχές ανάμεσα στο miRNA και στην 3' UTR του mRNA στόχου είναι απόλυτα συμπληρωματικές. Προσαρμογή από ²⁰¹.

Τα ώριμα miRNAs προσδένονται σε mRNA-στόχους με αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής ή την αποικοδόμησή τους, ελέγχοντας μετα-μεταγραφικά την έκφραση πολλών γονιδίων ²¹⁴. Παρόλο που κάποια miRNAs εκφράζονται το ίδιο στους περισσότερους ιστούς και κυτταρικούς τύπους, άλλα miRNAs είναι περισσότερο εμπλουτισμένα σε συγκεκριμένους ιστούς ²¹⁴.

6.1.1. miRNAs και απώλεια μυϊκής μάζας

Τα MyomiRs αποτελούν μία ομάδα miRNAs, τα οποία παρουσιάζουν ενισχυμένη έκφραση στους σκελετικούς μυς και περιλαμβάνουν τα miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208, miR-208b, miR-486, και miR-499. Αυτά τα miRNAs βρίσκονται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο μυογενών ρυθμιστικών παραγόντων όπως MyoD, myogenin, Myf5, και MRF4²¹⁵. Η έκφραση των MyomiRs είναι συντονισμένη για την αύξηση των σκελετικών μυών, την ανάπτυξή τους και τη διατήρησή τους και κατά την ατροφία (Σχ. 9)²¹⁵.



Σχήμα 9. Τα miRNAs κατά τη μυογένεση. Το διάγραμμα δείχνει διάφορα miRNAs και τους στόχους τους, τα οποία ρυθμίζουν την αδράνεια και την ενεργοποίηση των δορυφορικών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό των μυοβλαστών και την έξοδό τους από τον κυτταρικό κύκλο και την τελική τους διαφοροποίηση σε μυϊκές ίνες. Οι μυογόνοι μεταγραφικοί παράγοντες παίζουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης πολλών miRNAs που είναι εμπλουτισμένα στους μυς, όπως τα miR-1, miR-206, και miR-133 (φούξια). Οι μυογόνοι μεταγραφικοί παράγοντες που είναι χαρακτηριστικοί σε κάθε στάδιο της μυογόνου διαδικασίας σημειώνονται με τα αντίστοιχα χρώματα σε μαύρα κουτιά. Τα γονίδια -στόχοι των miRNAs που αναφέρονται στο σχήμα είναι τα paired box genes 3 and 7 (*Pax3* και *Pax7*), serum response factor (*SRF*), DNA polymerase catalytic subunit (*DNA polα*), cell-division cycle protein 25A (*Cdc25A*), homeobox A11 (*HoxA11*), Yin and Yang 1 (*YY1*), enhancer of zeste homolog 2 (*Ezh2*), histone deacetylase 4 (*HDAC4*), insulin-like growth factor (*IGF*), uncoupling protein 2 (*UCP2*), και PR domain containing 16 (*PRDM16*). Προσαρμογή από ²¹⁶.

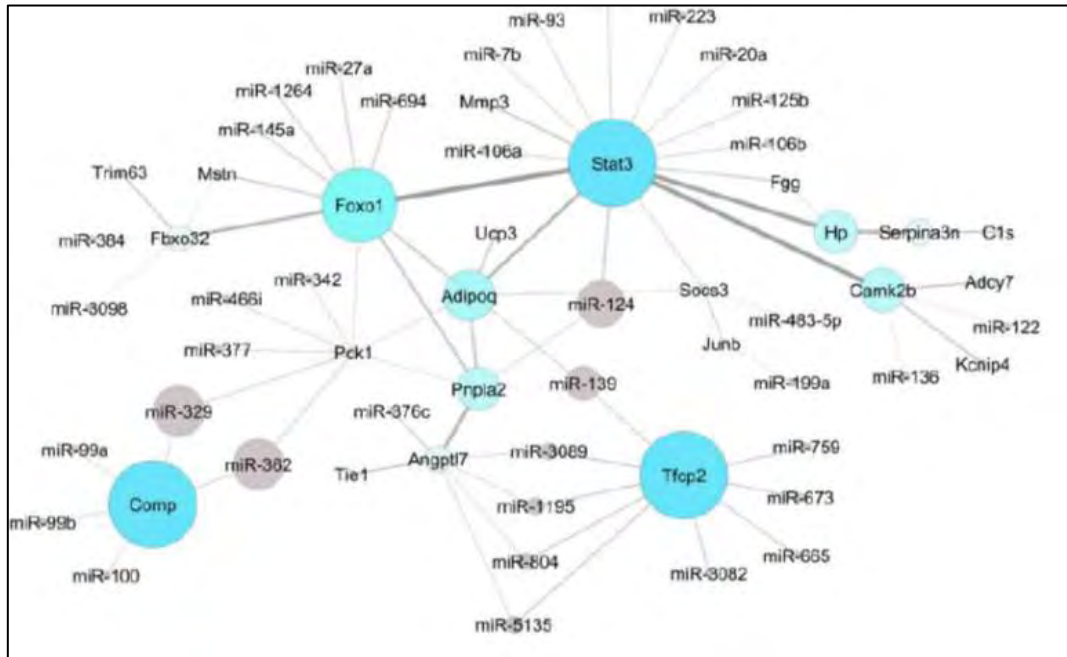
Οι ασκήσεις αντίστασης έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη σαρκοπενία και την καχεξία^{217,218}. Φάρμακα όπως η τριμεταζιδίνη, τα οποία μιμούνται την άσκηση έχουν θέση στη θεραπεία της μυϊκής ατροφίας, αλλά χρειάζονται συνοδούς βιοδείκτες²¹⁹. Το πρότυπο έκφρασης των MyomiRs, τα οποία ρυθμίζονται ισχυρά κατά την άσκηση αντίστασης, στους μυς αλλά και στο πλάσμα, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την άσκηση και την παρακολούθηση των σαρκοπενικών ή καχεκτικών ασθενών προς αποφυγή καταστροφικής υπερβολικής άσκησης.

Δύο μόρια κλειδιά στην απώλεια μυών είναι οι E3 λιγάσες ουβικουΐτινης MAFbx και MuRF-1, με την τελευταία να είναι η μόνη E3 λιγάση ουβικουΐτινης η οποία στοχεύει συσταλτικές πρωτεΐνες σε καταβολικές συνθήκες και μπορεί να ανασταλεί από μικρά μη κωδικά μόρια RNA^{220,221}. Οι σχετιζόμενες πρωτεΐνες MuRF-2 και MuRF-3 προσδένονται σε μικροσωληνίσκους και εμπλέκονται στο σχηματισμό του σαρκομερίου με προφανή λειτουργικό πλεονασμό, το οποίο έχει δείχθει ότι έχει σημασία για τη διατήρηση του σκελετικού μυ, καθώς ποντίκια με απενεργοποιημένα και τα δύο γονίδια παρουσιάζουν μυοπάθεια, μειωμένη δύναμη και αλλαγή τύπου ινών²²².

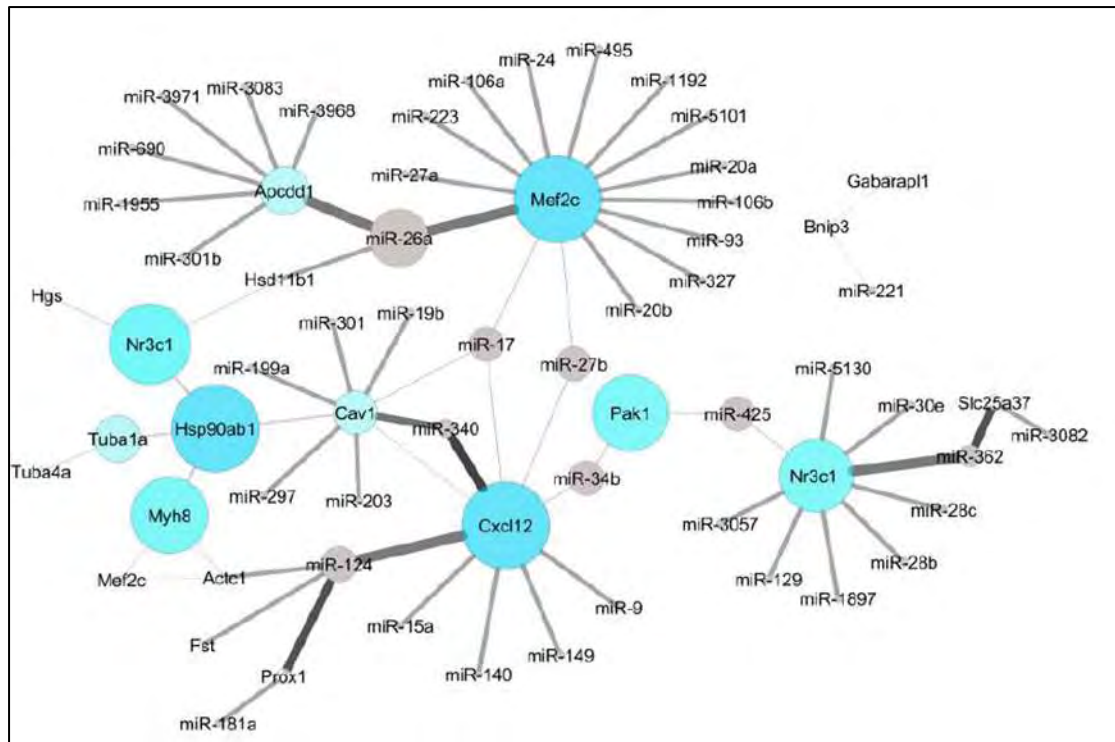
Σε μοντέλο αρουραίου με παραλυμένους μυς λόγω τραυματισμού της σπονδυλικής στήλης, παρατηρήθηκε μειορρύθμιση των miR-23a, miR-23b, miR-27b, miR-145, και miR-206 56 μέρες μετά τον τραυματισμό, ενώ ένεση με miR-206 αναίρεσε τη μυϊκή απώλεια σε μοντέλο απονεύρωσης^{223,224}. Σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (chronic obstructive pulmonary disease, COPD), έχει περιγραφεί αυξορρύθμιση των miR-542-3p/5p στους τετρακέφαλους μυς, τα οποία, όταν υπερεκφράστηκαν σε ποντίκια, προκάλεσαν μυϊκή απώλεια και μειωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία πιθανόν λόγω καταστολής της μιτοχονδριακής ριβοσωματικής πρωτεΐνης MRPS10, μειωμένη έκφραση του 12S rRNA και αυξημένη σηματοδότηση TGF-β²²⁵. Σε ασθενείς με COPD και χαμηλή μάζα ελεύθερης λίπους, η αυξημένη έκφραση του miR-675 που παρατηρήθηκε στους τετρακέφαλους κατέστειλε τη μυϊκή αναγέννηση όταν δοκιμάστηκε *in vitro*²²⁶.

Σε πρόσφατη μετα-ανάλυση για την ανάδειξη δικτύων αλληλεπίδρασης miRNA-mRNA που σχετίζονται με τη μυϊκή απώλεια στην καρκινική καχεξία, αναγνωρίστηκαν απορρυθμισμένα γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης, της μυϊκής

υπερτροφίας, του καταβολισμού και της απόκρισης οξείας φάσης (Σχ. 10 και Σχ. 11). Επιπλέον, η συγκεκριμένη μελέτη προέβλεψε νέες αλληλεπιδράσεις miRNA–mRNA, οι οποίες μπορεί να συνεισφέρουν στη μυϊκή απώλεια κατά την καρκινική καχεξία, όπως miR-27a/Foxo1, miR-27a/Mef2c, miR-27b/Cxcl12, miR-27b/Mef2c, miR-140/Cxcl12, miR-199a/Cav1 και miR-199a/Junb ²²⁷.



Σχήμα 10. Το δίκτυο αλληλεπίδρασης miRNA και mRNA γονιδίων στόχων που αυξορρυθμίζονται κατά τη μυϊκή απώλεια στην καρκινική καχεξία. Προσαρμογή από ²²⁷.



Σχήμα 11. Το δίκτυο αλληλεπίδρασης miRNA και mRNA γονιδίων στόχων που μειορρυθμίζονται κατά τη μυϊκή απώλεια στην καρκινική καχεξία. Προσαρμογή από 227.

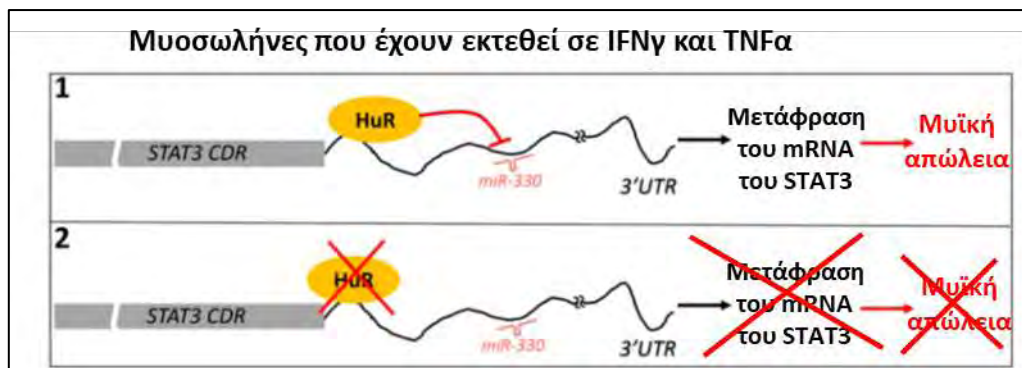
Σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε επέμβαση αορτής, το miR-675 σχετίστηκε θετικά με τα γονίδια των οποίων η έκφραση αυξήθηκε μετά το χειρουργείο, όπως γονίδια που συμμετέχουν στα μονοπάτια της φλεγμονής, ενώ σχετίστηκε αρνητικά με τα γονίδια των οποίων η έκφραση μειώθηκε, τα οποία ήταν μυογόνα γονίδια. Οι ομάδες των γονιδίων αυτών σχετίζονταν με φλεγμονώδη μονοπάτια και μυογόνα μονοπάτια αντίστοιχα ²²⁸. Στους ίδιους ασθενείς, το miR-542-3p σχετίστηκε με μειωμένη μιτοχondριακή γονιδιακή έκφραση, αναστέλλοντας το σχηματισμό ριβοσωμάτων των μιτοχondρίων και το μιτοχondριακό ριβοσωματικό στρες ενεργοποίησε το P53, συμβάλλοντας στη μυϊκή ατροφία που παρατηρείται μετά το χειρουργείο ²²⁸. Επιπλέον, η έκφραση του miR-422a στους τετρακέφαλους σχετίστηκε θετικά με τη μυϊκή δύναμη και αντίστροφα με τη μυϊκή μάζα που θα χανόταν την πρώτη εβδομάδα μετά το χειρουργείο ²²⁹.

Τα microRNAs miR-23a και miR-27a εντοπίζονται μαζί σε συστάδα γονιδίων και ρυθμίζουν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μυϊκή ατροφία. Έχει βρεθεί ότι τα miR-23a και miR-27a μειώνουν την απώλεια μύων και δρουν ως αντι-ινωτικοί παράγοντες. Σε

ποντίκια που έγιναν διαβητικά μετά από επίδραση στρεπτοζοτοκίνης, η υπερέκφραση των miR-23a/27a αύξησε τα επίπεδα της p-Akt, ενώ μείωσε τα επίπεδα των πρωτεϊνών FoxO1 και PTEN, και μείωσε την αφθονία των TRIM63/MuRF1 FBXO32/atrogin-1 στους σκελετικούς μυς. Επίσης, μείωσε τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της μυοστατίνης και των p-SMAD2/3 ²³⁰.

Σε πολλά *in vivo* μοντέλα μυϊκής ατροφίας έχει επίσης παρατηρηθεί θετική ρύθμιση του miR-29b και έχει προταθεί ότι οδηγεί σε σκελετική μυϊκή ατροφία σε απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα μέσω αλληλεπίδρασης με τα mRNA των IGF-1 και p85 ²³¹. Συγκεκριμένα, το miR-29b προάγει την ατροφία σε μυοσωλήνες που έχουν διαφοροποιηθεί από κύτταρα C2C12 ή πρωτογενείς μυοβλάστες και αντίστροφα, ενώ η αναστολή του miR-29b εξασθενεί τη μυϊκή ατροφία που επάγεται από τη δεξαμεθαζόνη, τον TNF-α και το H₂O₂. Για την επαγωγή της μυϊκής ατροφίας ήταν απαραίτητη η στόχευση των IGF-1 και PI3K(p85α) από το miR-29b, ενώ *in vivo*, η υπερέκφραση του miR-29b ήταν αρκετή για να επάγει τη μυϊκή ατροφία και η αναστολή του εξασθένισε τη μυϊκή ατροφία που επάγονταν από ακινητοποίηση και απονεύρωση ²³¹.

Για την έναρξη της καρκινικής καχεξίας, και κυρίως στην απώλεια μυών έχει φανεί να παίζει σημαντικό ρόλο το μετα-μεταγραφικό μονοπάτι που περιλαμβάνει την πρωτεΐνη HuR που συνδέεται στο RNA. Η HuR αλλάζει λειτουργία και από προαγωγέας του σχηματισμού μυϊκών ινών γίνεται επαγωγέας μυϊκής απώλειας. Αρχικά προσδένεται στο mRNA του STAT3, το οποίο κωδικοποιεί έναν από τους βασικούς τελεστές της καχεξίας, προάγοντας την έκφρασή του *in vitro* και *in vivo*. Ενώ η HuR δεν επηρεάζει τη σταθερότητα και την κυτταρική μετακίνηση του μεταγράφου αυτού, προάγει την μετάφρασή του, εμποδίζοντας το miR-330 να προσδεθεί στο mRNA και να αναστείλει την μετάφρασή του. Για να το επιτύχει αυτό, η HuR προσδένεται στην 3' UTR του mRNA του STAT3 σε μία πλούσια σε U περιοχή, η οποία γειτνιάζει με τη συμπληρωματική περιοχή του miR-330. Παρόλο που οι δύο αυτές περιοχές δεν αλληλοεπικαλύπτονται, η επιστράτευση της HuR ή του miR-330 στην 3' UTR του mRNA του STAT3 επηρεάζει αρνητικά την πρόσδεση του άλλου, υποδεικνύοντας ότι αυτή η διασύνδεση των HuR και miR-330 αποτελεί έναν μηχανισμό μέσω του οποίου οι μυϊκές ίνες διαμορφώνουν την έκφραση του STAT3 προκειμένου να καθορίσουν το μέλλον τους στην απόκριση σε προαγωγείς της μυϊκής απώλειας (Σχ. 12)²³².



Σχήμα 12. Μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης του STAT3 εξαρτώμενη από τη HuR κατά την επαγόμενη από TNF α και IFN γ μυϊκή απώλεια. (1) Η HuR αναιρεί τη δράση του miR-330 στην έκφραση του STAT3. Σε μυοσωλήνες που έχουν εκτεθεί σε TNF α και IFN γ , η HuR προσδένεται στην 3'UTR του mRNA του STAT3 σε μία πλούσια σε U περιοχή, προάγοντας τη μετάφρασή του. Η πρόσδεση αυτή αποτρέπει την πρόσδεση του miR-330 στην περιοχή αυτή, η οποία θα είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της μετάφρασης του mRNA του STAT3. (2) Απουσία της HuR το miR-330 προσδένεται στο mRNA και καταστέλλει τη μετάφραση του STAT3.

Επιπλέον, έχουν περιγραφεί *in vitro* και *in vivo* και άλλα μονοπάτια που περιλαμβάνουν miRNAs και τη ρύθμιση της μυογένεσης, της υπερτροφίας και της ατροφίας. Οι Koutalianos et al. έδειξαν ότι η υπερέκφραση του μυογόνου μεταγραφικού παράγοντα MyoD επάγει την έκφραση του miR-206²³³. Επιπλέον, η αύξηση του miR-206 μειορρυθμίζει το Twist-1, μειώνοντας τη δραστηριότητά του και επιτρέποντας την αυξημένη διαφοροποίηση των μυϊκών κυττάρων. Επίσης, τα μυϊκά κύτταρα των ασθενών με μυοτονική δυστροφία τύπου I παρουσιάζουν αναστολή της πρωτεϊνικής έκφρασης της MyoD και αυξημένη έκφραση Twist-1, με ακόλουθη μείωση της έκφρασης του miR-206, ενώ η συνέκφραση των MyoD και miR-206 ρυθμίζει την πρωτεϊνική έκφραση του Twist-1, επιτρέποντας τη διαφοροποίηση των μυϊκών κυττάρων²³³.

Με την απώλεια μυών σχετίζεται και η καρδιακή καχεξία, συχνή επιπλοκή της καρδιακής ανεπάρκειας με κακή πρόγνωση. Στην παθογένεση της μυϊκής απώλειας κατά την καρδιακή καχεξία εμπλέκονται και miRNAs. Τα miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-210-5p, miR-214, και miR-489 έχουν στόχους γονίδια τα οποία είναι απορρυθμισμένα κατά την καρδιακή καχεξία και εμπλέκονται στην οργάνωση της εξωκυττάριας ύλης, στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών του πρωτεασώματος, στον κύκλο κυτταρικού οξέος και στην μεταφορά ηλεκτρονίων. Επιπλέον, πειράματα σε κύτταρα

C2C12 επιβεβαίωσαν ότι το miR-29b μειορρυθμίζει το κολλαγόνο και συμβάλλει στη μυϊκή ατροφία²³⁴.

Οι Kukreti et al. έδειξαν ότι η δεξαμεθαζόνη ή η μυοστατίνη επάγει την ατροφία των σκελετικών μυών μέσω τροποποίησης της έκφρασης του miR-1²³⁵. Το miR-1 μπορεί να προσδεθεί και να μειώσει τη δράση της HSP70 (heat shock protein 70) συμμετέχοντας στην επαγωγή της ατροφίας. Τα μειωμένα επίπεδα της HSP70 σχετίζονται με τη μειορρύθμιση της φωσφορυλίωσης της Akt (p-Akt), καθώς η HSP70 προσδένεται και προστατεύει την ακεραιότητα της p-Akt. Η μείωση της p-Akt προάγει τη μείωση της φωσφορυλίωσης του Foxo3, επιτρέποντας την ενισχυμένη πυρηνική ενεργότητα του Foxo3 και προάγοντας την αυξορρύθμιση των MuRF1 (muscle finger protein) και atrogen-1, τα οποία επάγουν την ατροφία στον σκελετικό μυ²³⁵.

6.1.2. miRNAs και απώλεια λιπώδους ιστού

Εκτός από τη σκελετική μυϊκή ατροφία, η λιπόλυση και η φαιοποίηση του λιπώδους ιστού αποτελούν επίσης σημαντικά χαρακτηριστικά της καρκινικής καχεξίας στα οποία εμπλέκονται miRNAs²³⁶.

Στον γαστρεντερικό καρκίνο, όταν συγκρίθηκε ο κοιλιακός υποδόριος ιστός καχεκτικών και μη καχεκτικών ασθενών, παρατηρήθηκε μειορρύθμιση των miR-483-5p, miR-23a, miR-744 και miR-99b, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική αυξορρύθμιση του miR-378 στους καχεκτικούς ασθενείς, η οποία σχετίστηκε θετικά με την λιπόλυση που προάγεται από τις κατεχολαμίνες²³⁷. Σε *in vitro* πειράματα, όπου καλλιιεργήθηκαν ανθρώπινα λιποκύτταρα από υγιείς δότες, παρατήρησαν αναστολή του miR-378, σημειώθηκε σημαντική μειορρύθμιση της λιπόλυσης που προάγεται από νορεπινεφρίνη και μειορρύθμιση των LIPE (hormone-sensitive lipase E), PNPLA2 (patatin like phospholipase domain containing 2) και PLIN1 (perilipin 1)²³⁷.

6.1.3. miRNAs και έλεγχος ομοιόστασης

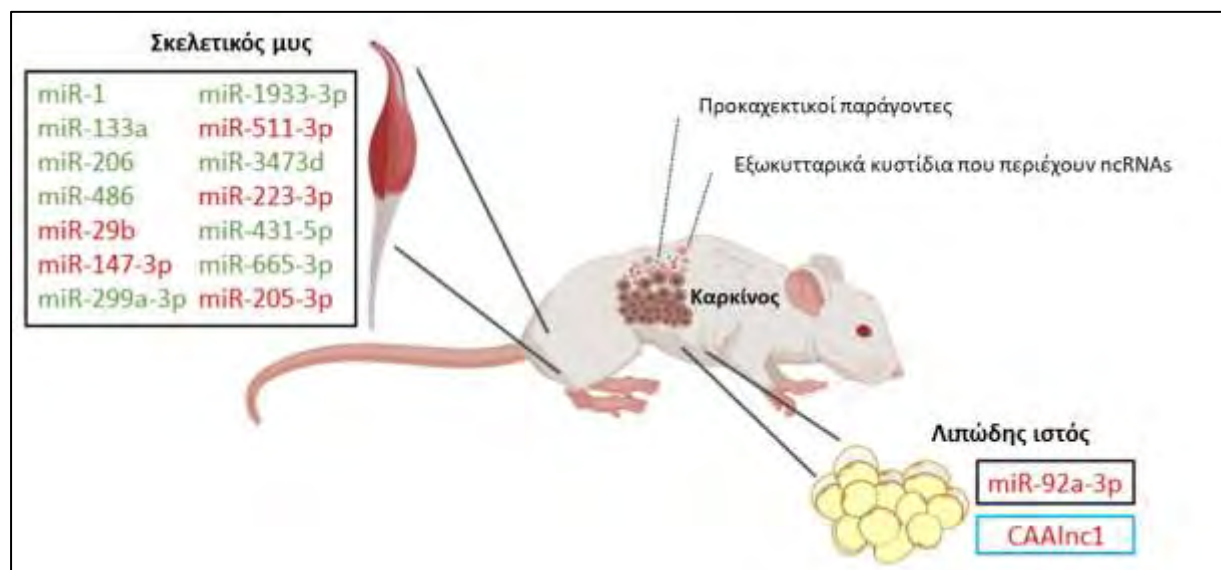
Ο υποθάλαμος είναι υπεύθυνος για τον έλεγχο της ομοιόστασης (π.χ. θερμορρύθμιση) και την πρόσληψη της τροφής^{238,239}. Οι λειτουργίες αυτές ελέγχονται από πολλούς ρυθμιστές, όπως φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που δρουν στις περιοχές του υποθαλάμου

²³⁹. Κατά την καχεξία, διαμεσολαβεί μία αύξηση στη δαπάνη ενέργειας και μείωση της όρεξης ²³⁸. Σε σχετική μελέτη των Mercander et al. οι συγγραφείς ασχολήθηκαν με τη ρύθμιση της υποθαλαμικής λειτουργίας και την παθογένεση της καχεξίας από τα miRNAs, μελετώντας το μεταγράφομα του υποθαλάμου και του φλοιού ποντικών anx/anx, οι οποίοι αναπτύσσουν σύνδρομο ανορεξίας-καχεξίας ²⁴⁰. Στον υποθάλαμο 115 από τους 153 στόχους των miRNAs που εξετάστηκαν βρέθηκαν κατά προτίμηση να αυξορρυθμίζονται, ενώ στο φλοιό μειορρυθμίζονταν ²⁴⁰. Επίσης παρατηρήθηκε στον υποθάλαμο αυξορρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με το σύμπλοκο miRISC, όπως *DGCR8* (microprocessor complex subunit), *Fmr1* (fragile X mental retardation 1) και *Ago2* (argonaute RISC catalytic subunit 2), *Ddx6* (DEAD box polypeptide 6), και *Pabpc1* (poly(A) binding protein cytoplasmic 1), υποδεικνύοντας ότι ο μηχανισμός βιογένεσης των miRNAs στον υποθάλαμο των anx/anx ποντικών είναι τροποποιημένος και η εμπλοκή του στις αλλαγές του υποθαλάμου οδηγεί σε καχεξία ²⁴⁰.

6.1.4. miRNAs και καρκινική καχεξία

Οι αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης των miRNAs μπορεί να είναι ενδεικτικές της παρουσίας ή απουσίας ασθενειών που επηρεάζουν τους μυς ^{216,241}. Αλλαγές όπως η αυξορρύθμιση ή η μειορρύθμιση των miRNAs έχουν μελετηθεί και δείχνουν ότι μπορούν να ρυθμίζουν μονοπάτια που εμπλέκονται στη μυογένεση, τη μυϊκή υπερτροφία και την ατροφία ^{216,241}. Η απώλεια μυϊκής μάζας σχετίζεται με αύξηση στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών και μεταβολικές αλλαγές στους μυς σε απόκριση στην παρουσία όγκου στον οργανισμό και πολλές *In vitro* μελέτες και μελέτες σε μοντέλα ζώων και σε ανθρώπους έχουν αναδείξει τον ρόλο των miRNAs στην απώλεια μυϊκής μάζας κατά την καρκινική καχεξία (Σχ. 13)²⁴¹. Οι Soares et al. παρατήρησαν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των miRNAs σε *in vitro* και *in vivo* προσεγγίσεις σε τέσσερις διαφορετικές καταστάσεις απώλειας σκελετικών μυών: ασιτία, απονεύρωση, διαβήτης και καρκινική καχεξία ²⁴². Κατά την απονεύρωση παρατήρησαν ότι τα miR-206 και miR-21 αυξορρυθμίζονται και προάγουν τη μυϊκή ατροφία. Αυτά τα miRNAs μπορούν να προσδένονται στον μεταγραφικό παράγοντα YY1, καθώς επίσης και στον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E3 και ρυθμίζουν την απώλεια μυϊκής μάζας εμποδίζοντας τη μυογένεση ²⁴³. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το miR-21 είναι αυξημένο στον ορό ασθενών στους περισσότερους τύπους καρκίνου, όπως στον

κολοορθικό καρκίνο, στον γαστρικό καρκίνο, στον καρκίνο του προστάτη και στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα²⁴⁴⁻²⁴⁹.



Σχήμα 13. Απορρύθμιση των non-coding RNAs (ncRNAs) κατά την απώλεια μυών και λιπώδους ιστού σε μοντέλα ποντικών με καρκινική καχεξία. Στο μαύρο πλαίσιο περιέχονται miRNAs, ενώ στο γαλάζιο lncRNAs. Με κόκκινο χρώμα είναι τα ncRNAs που αυξορρυθμίζονται, ενώ με πράσινο χρώμα είναι τα ncRNAs που μειορρυθμίζονται κατά την καρκινική καχεξία (Προσαρμογή από²¹³).

Σε άλλη μελέτη όπου χρησιμοποίησαν αγρίου τύπου ποντίκια και $\text{Parp-1}^{-/-}$ και $\text{Parp-2}^{-/-}$ (poly ADP-ribose polymerase) με καρκίνο πνεύμονα που ανέπτυξαν καχεξία, υπήρχε συσχέτιση με μειωμένη έκφραση miR-1 στους σκελετικούς μυς (διάφραγμα και γαστροκνήμιο)²⁵⁰. Επίσης, στα καχεκτικά αγρίου τύπου και $\text{Parp-2}^{-/-}$ ποντίκια η έκφραση του miR-133a ήταν μειωμένη στο διάφραγμα και στο γαστροκνήμιο σε σχέση με τα ποντίκια μάρτυρες, ενώ στα $\text{Parp-1}^{-/-}$ ποντίκια η έκφραση του miR-133a ήταν μειωμένη μόνο στο διάφραγμα²⁵⁰. Στο διάφραγμα των καχεκτικών $\text{Parp-1}^{-/-}$ και $\text{Parp-2}^{-/-}$ ποντικών ήταν επίσης μειωμένη η έκφραση του miR-206, καθώς επίσης και στο γαστροκνήμιο και στο διάφραγμα των αγρίου τύπου καχεκτικών ποντικών. Η έκφραση του miR-486 ήταν μειωμένη στο γαστροκνήμιο και στο διάφραγμα των αγρίου τύπου και $\text{Parp-2}^{-/-}$ καχεκτικών ποντικών, σε σχέση με τα μη καχεκτικά ποντίκια, ενώ στα $\text{Parp-1}^{-/-}$ καχεκτικά ποντίκια δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην έκφραση του miR-486. Επιπλέον, αναστολή του Parp-1 μέσω των miR-133a, miR-206 και miR-486 προάγει των πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των μυϊκών κυττάρων, ενώ αναστολή του

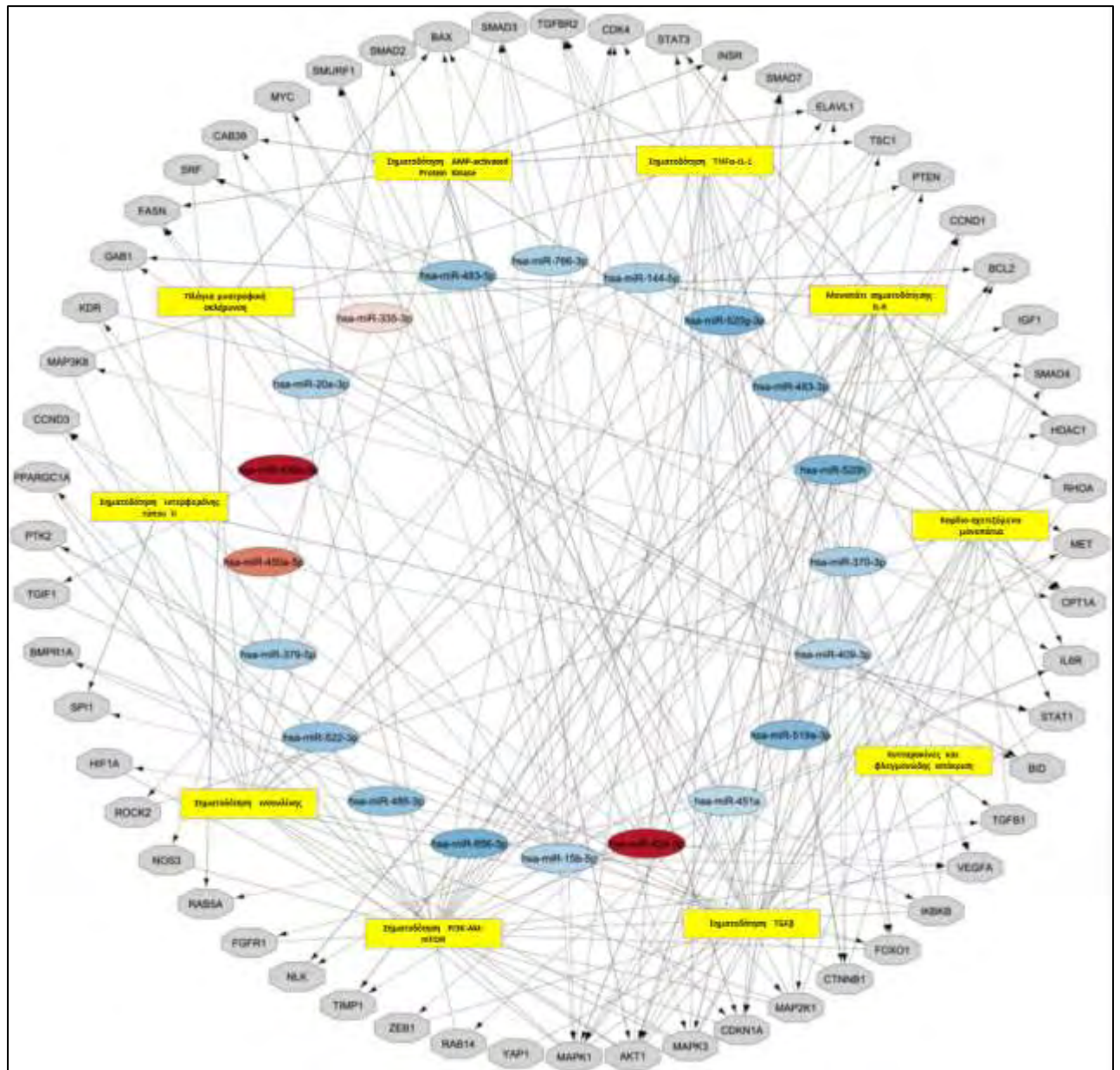
Parp-2 μέσω του miR-206 προάγει τη διαφοροποίηση των μυϊκών κυττάρων στο γαστροκνήμιο των καχεκτικών ποντικών με καρκίνο πνεύμονα ²⁵⁰. Η απαλοιφή του Parp-1 στο διάφραγμα των ποντικών ευνόησε την έκφραση του miR-486, ενώ στα ποντίκια Parp-2^{-/-}, δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές, υποδεικνύοντας ότι περισσότερο η αναστολή του Parp-1 παρά του Parp-2 επιδρά στην έκφραση των miRNAs που σχετίζονται με τους μυς στους καχεκτικούς μυς των άκρων και τα διαφορετικά αποτελέσματα στο διάφραγμα και στο γαστροκνήμιο επισημαίνουν την ειδικότητα των σηματοδοτικών μονοπατιών που ελέγχονται από τα miRNAs και εμπλέκονται στην καρκινική καχεξία ²⁵⁰.

Σε μία άλλη μελέτη, όπου έγινε ανάλυση miRNAs στον πρόσθιο κνημιαίο μυ σε ποντίκια με Lewis καρκίνωμα πνεύμονα που ανέπτυξαν καχεξία, 9 miRNAs βρέθηκαν να έχουν διαφορετική έκφραση ²⁵¹. Συγκεκριμένα, τα miR-147-3p, miR-299a-3p, miR-1933-3p, miR-511-3p, miR-3473d, miR-223-3p, miR-431-5p, miR-665-3p και miR-205-3p, τα οποία εμπλέκονται σε βιολογικές διαδικασίες, όπως η σηματοδότηση κυττάρου με κύτταρο, η κυτταρική ανάπτυξη και φλεγμονώδης απόκριση είχαν διαφορετική έκφραση.

Σε ενδιαφέρουσα εργασία των Narasimhan et al., όπου ανέλυσαν τα miRNAs σε βιοψίες ορθού κοιλιακού μυ από καχεκτικούς και μη καχεκτικούς ασθενείς με καρκίνο χρησιμοποιώντας αλληλούχιση επόμενης γενιάς, ανακάλυψαν 8 miRNAs τα οποία αυξορρυθμίζονται στην καρκινική καχεξία και σχετίζονται με τον μεταβολισμό των μυών, τη μυογένεση και τη φλεγμονή: hsa-let-7d-3p, hsa-miR-345-5p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-1296-5p, hsa-miR-3184-3p, hsa-miR-423-3p, και hsa-miR-199a-3p ²⁵². Το let-7d-3p σχετίζεται με τον υποδοχέα της τρανσφερρίνης και προάγει τη μειορρύθμιση αυτού του μονοπατιού, επηρεάζοντας τον πολλαπλασιασμό των μυϊκών κυττάρων και την μυογόνο διαφοροποίηση. Το miR-345-5p έχει στόχους τα γονίδια *NOV* και *COL1A1* με αποτέλεσμα τη μειορρύθμιση των γονιδίων αυτών και την αυξορρύθμιση του *CYR61*. Τα *NOV* και *CYR61* εμπλέκονται στα μονοπάτια των insulin-like growth factor 1, Akt και mTOR, μειώνοντας την ικανότητα για πρωτεϊνοσύνθεση. Τα miR-423-5p και miR-3184-3p μειορρυθμίζουν δύο γονίδια τα *SQLE* και *FADS2*, τα οποία σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των λιπιδίων. Επίσης, το miR-423-5p ρυθμίζει τη λεπτίνη και άλλα γονίδια που σχετίζονται με την ενεργειακή ισορροπία. Επιπλέον, μειορρυθμίζει το *DLK1*, το οποίο εμπλέκεται στη μυϊκή υπερτροφία, ενώ το miR-423-3p προάγει τη μείωση της σηματοδότησης ασβεστίου,

επηρεάζοντας το γονίδιο *CAMK2A*. Το miR-3184-3p εμπλέκεται στη σηματοδότηση Wnt/ β -catenin, μειώνοντας τη μυογόνο διαφοροποίηση. Επιπλέον, το miR-3184-3p ρυθμίζει τα *BMPRI1B* και *GREM1*, επηρεάζοντας τη σηματοδότηση των TGF- β και BMP. Το miR-532-5p επηρεάζει τα γονίδια *SULF1*, *RPS6KA6*, και *NPY1R*. Το *SULF1* σχετίζεται με τη σηματοδότηση BMP, επηρεάζοντας την ανάπτυξη των σωματιών. Το *NPY1R* εμπλέκεται στη ρύθμιση της όρεξης και το *RPSKA6* συμμετέχει στις δράσεις του CNTF (ciliary neurotrophic factor). Το miR-1296-5p ρυθμίζει τα γονίδια *HTR2A* και *RPS6KA6*. Το *HTR2A* συμμετέχει στη σηματοδότηση της σεροτονίνης, η οποία εμπλέκεται στη μυογένεση, ενώ το *RPS6KA6* εμπλέκεται στη σηματοδότηση του CNTF. Τέλος, το miR-199a-3p επηρεάζει το γονίδιο *IF4EBP1*, το οποίο ρυθμίζει το μονοπάτι mTOR, παρεμβαίνοντας στην πρωτεϊνοσύνθεση. Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα αυτής της δημοσίευσης, φαίνεται ότι τα myomiRs παίζουν ρόλο στη διαμόρφωση των μονοπατιών της ατροφίας.

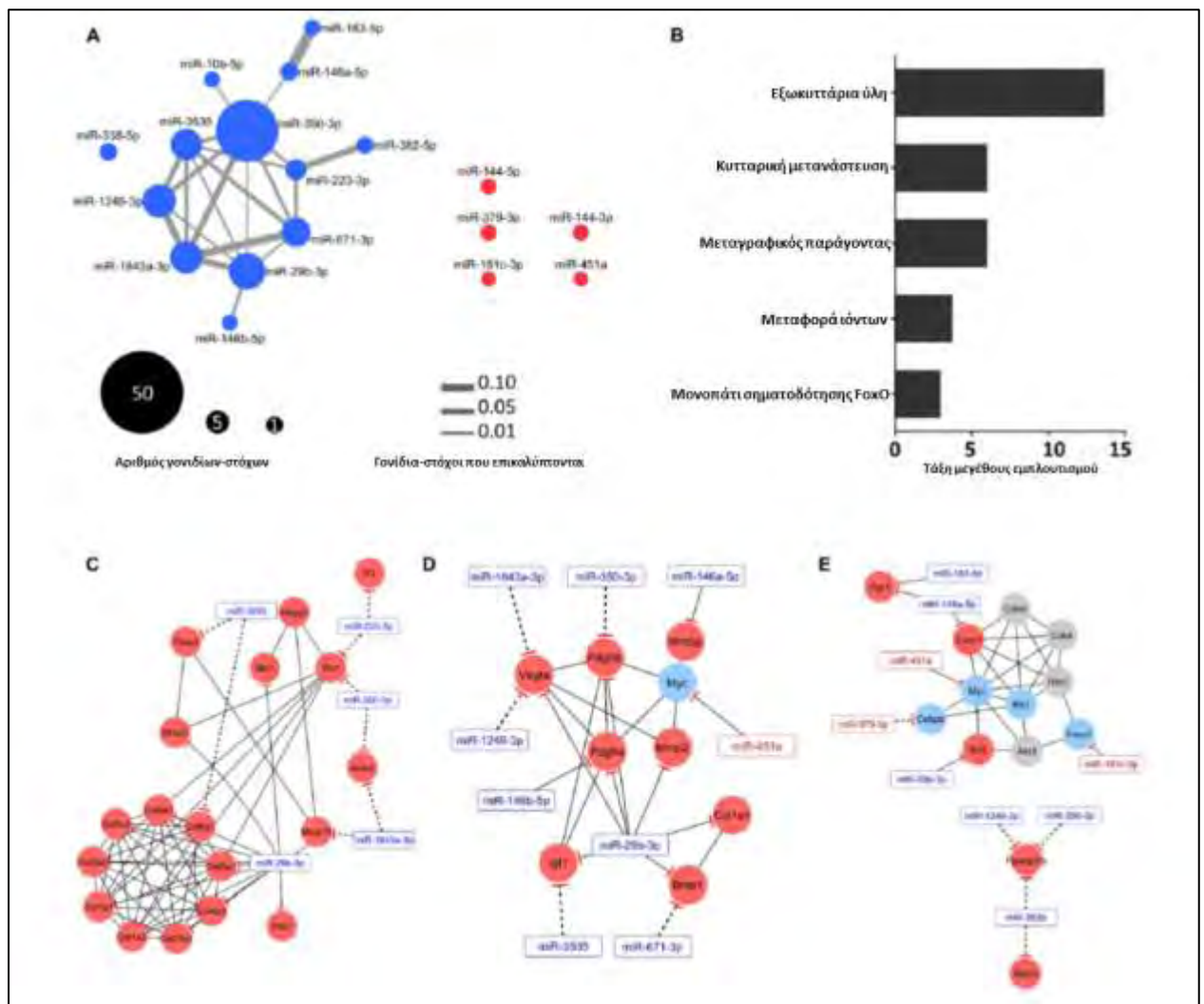
Σε άλλη πρόσφατη μελέτη από τους van de Worp et al. μελετήθηκαν οι διαφορές στην έκφραση των miRNAs στους σκελετικούς μυς καχεκτικών ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα. Συγκεκριμένα ανέλυσαν την έκφραση 754 miRNAs σε βιοψίες έξω πλατύ μηριαίου μυ από 8 καχεκτικούς ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα και 8 υγιείς και επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα σε 15 καχεκτικούς ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, 11 μη καχεκτικούς ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα και 22 υγιείς. Από τα 28 miRNAs που βρέθηκαν να εκφράζονται διαφορετικά, τα 5 είχαν αυξορρύθμιση και τα 23 μειορρύθμιση (Σχ. 14). Περαιτέρω ανάλυση έδειξε 158 πιθανά λειτουργικά γονίδια-στόχους για αυτά τα miRNAs, τα οποία εμπλέκονται σε 22 μονοπάτια σχετιζόμενα με εκφυλιστικές ή αναγεννητικές διαδικασίες του μυϊκού ιστού, όπως IL-6, TGF- β , TNF α , ινσουλίνη και Akt. Τα miR-424-5p, miR-424-3p και miR-450a-5p παρουσίασαν αυξορρύθμιση, ενώ τα miR-144-5p και miR-451a παρουσίασαν μειορρύθμιση στους μυς των καχεκτικών ασθενών σε σχέση με τους υγιείς. Στους μη καχεκτικούς ασθενείς, μόνο το miR-424-3p αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με τους υγιείς. Επιπλέον, ο συνδυασμός της έκφρασης των miR-450-5p και miR-451a, αν και ο αριθμός των ασθενών ήταν μικρός, ανέδειξε συσχέτιση με την επιβίωση των ασθενών²⁵³.



Σχήμα 14. Δίκτυο miRNAs- γονιδίων-μονοπατιών που σχετίζονται με την καχεξία στον καρκίνο του πνεύμονα, σύμφωνα με τις βάσεις miRTarBase και WikiPathways. Με κόκκινο χρώμα είναι τα miRNAs που αυξορρυθμίζονται, με μπλε χρώμα είναι τα miRNAs που μειορρυθμίζονται, με γκρι χρώμα είναι τα πιθανά γονίδια-στόχοι των miRNAs στον σκελετικό μυ και με κίτρινο χρώμα τα πιο σημαντικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται τα γονίδια-στόχοι. Προσαρμογή από ²⁵³.

Οι ολοκληρωμένες ομικές αναλύσεις miRNAs-mRNAs αποτελούν ένα επιπλέον εργαλείο στην κατανόηση των μεταγραφικών και μετα-μεταγραφικών ρυθμιστικών δικτύων που εμπλέκονται στη μυϊκή απώλεια. Σε πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε, αναλύθηκαν τα πρότυπα έκφρασης mRNAs και miRNAs στον

πρόσθιο κνημιαίο μυ από μοντέλο Lewis καρκινώματος πνεύμονα με καρκινική καχεξία, όπου αναδείχθηκαν 1,008 mRNAs και 18 microRNAs τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης ανάμεσα στα καχεκτικά ποντίκια και στα ποντίκια μάρτυρες. Παρά τη μεγάλη ετερογένεια στο πρότυπο έκφρασης mRNA στα καχεκτικά ποντίκια, υπήρχαν γονίδια που ρυθμίζονταν ενιαία στα καχεκτικά ποντίκια. Τα γονίδια αυτά σχετίζονταν με την εξωκυττάρια ύλη, την πρωτεόλυση και τη φλεγμονώδη αντίδραση (Σχ. 15). Επιπλέον ανάλυση των περιοχών πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων έδειξε ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB, Stat3, AP-1, και FoxO, οι οποίοι σχετίζονται με την ατροφία. Η ενσωμάτωση των προτύπων έκφρασης mRNA και microRNA έδειξε μετα-μεταγραφική ρύθμιση από τα microRNAs γονιδίων που εμπλέκονται στην οργάνωση της εξωκυττάριας ύλης, στην κυτταρική μετανάστευση, στην πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων, στη μεταφορά ιόντων και στο σηματοδοτικό μονοπάτι FoxO²⁵⁴.

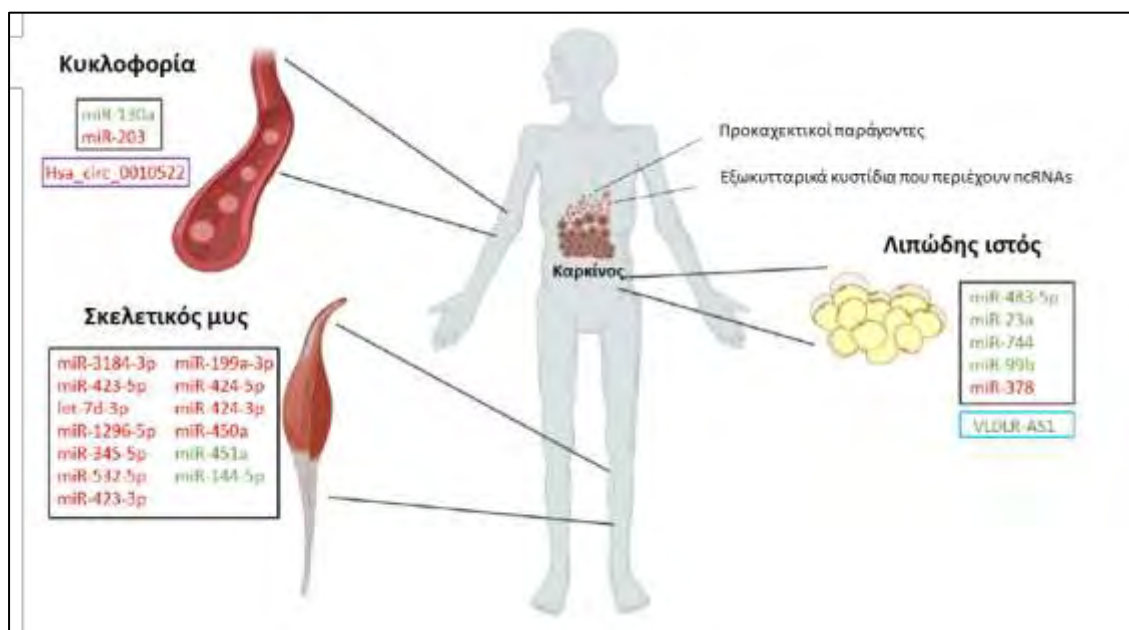


Σχήμα 15. Ολοκληρωμένη ομική ανάλυση microRNAs-mRNAs στην καχεξία στον καρκίνο του πνεύμονα. (A) Το δίκτυο αποτελείται από 171 αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε 18 miRNAs και 131 μετάγραφα γονιδίων-στόχων. Τα miRNAs που αυξορρυθμίζονται αναπαριστώνται με μπλε χρώμα, ενώ αυτά που μειορρυθμίζονται με κόκκινο χρώμα, ενώ το μέγεθος του κύκλου δείχνει τον αριθμό των γονιδίων-στόχων και το πάχος της γκρι γραμμής την επικάλυψη των γονιδίων-στόχων. (B) Ανάλυση οντολογίας γονιδίων των mRNA που προβλέπονται και έχουν επιβεβαιωθεί ότι ρυθμίζονται από τα miRNAs. Κάθε οριζόντια μαύρη ράβδος αναπαριστά τον οντολογικό όρο των γονιδίων και την τάξη μεγέθους εμπλουτισμού. (C)-(E) Τα ρυθμιστικά δίκτυα παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές για τις προβλεπόμενες και με συμπαγείς γραμμές για τις επιβεβαιωμένες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα miRNAs (ορθογώνια) και τα mRNA στόχους (κύκλοι) και τις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-πρωτεϊνών για (C) την εξωκυττάρια ύλη, (D) την κυτταρική μετανάστευση και (E) τους μεταγραφικούς παράγοντες. Τα miRNAs που αυξορρυθμίζονται αναπαριστώνται με μπλε χρώμα, ενώ τα miRNAs που μειορρυθμίζονται αναπαριστώνται με κόκκινο χρώμα, ενώ με γκρι χρώμα αναπαριστώνται τα γονίδια που δεν ρυθμίζονται. Προσαρμογή από ²⁵⁴.

6.1.5. Κυκλοφορούντα miRNAs

Εκτός από την ενδοκυττάρια εντόπισή τους, τα miRNAs μπορούν να εκκριθούν ενεργά από το κύτταρο ή να διαφύγουν μέσω της μεμβράνης σε απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα, με αποτέλεσμα να κυκλοφορούν miRNAs στο αίμα ή σε άλλα βιολογικά υγρά του σώματος και να είναι σταθερά, καθιστώντας τα πιθανούς βιοδείκτες για διάφορες ασθένειες και θεραπευτικούς στόχους ²⁵⁵. Στα υγρά αυτά τα miRNAs είναι συνδεδεμένα σε σύμπλοκα με πρωτεΐνες ή ενθυλακωμένα σε εξωκυτταρικά κυστίδια (π.χ. εξωσώματα) το οποίο τους προσφέρει προστασία από την αποικοδόμηση ²⁵⁶. Αυτό αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην απώλεια μυών, καθώς υπάρχουν πολλοί λίγοι βιοδείκτες στο αίμα, όπως η μυοστατίνη και η αργινίνη, που σχετίζονται με τη μυϊκή μάζα ²⁵⁷⁻²⁵⁹. Αρκετοί άλλοι παράγοντες στην κυκλοφορία, όπως ο GDF-15, η activin A και η χαμηλή τεστοστερόνη έχουν συσχετιστεί με τη μυϊκή απώλεια στη σαρκωπενία και στην καχεξία, και θα μπορούσαν να θεωρηθούν πιθανοί βιοδείκτες, αλλά θα πρέπει να επαληθευτούν σε μεγάλες κλινικές μελέτες ²⁶⁰⁻²⁶². Όλο και περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν το ρόλο των miRNAs ως διαμεσολαβητών ανάμεσα στα κύτταρα αλλά και ως βιοδεικτών για πολλές ασθένειες ^{256,263}.

Τα miRNAs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν, όχι μόνο ως βιοδείκτες για τη μυϊκή κατάσταση και απώλεια, αλλά και ως βιοδείκτες για τη μυϊκή αναγέννηση και την επίδραση της θεραπείας. Τα κυκλοφορούντα miRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση πρώιμων σταδίων της καχεξίας και παρακολούθησης της εξέλιξης της καχεξίας στους ασθενείς με καρκίνο (Σχ. 16). Σε μία μελέτη με ασθενείς με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου οι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα miR-130a στο πλάσμα τους είχαν υψηλότερα επίπεδα TNF-α στο πλάσμα τους και αυξημένο κίνδυνο καχεξίας²⁶⁴. Επιπλέον, τα χαμηλά επίπεδα miR-130a μπορούσαν να διακρίνουν τους καχεκτικούς ασθενείς από τους ήπια υποσιτιζόμενους ασθενείς με ευαισθησία 76,4% και ειδικότητα 80,8%, ενώ όταν συνδυάστηκαν με τα υψηλά επίπεδα TNF-α οι τιμές ευαισθησίας και ειδικότητας αυξήθηκαν σε 83,3% και 91,7%, αντίστοιχα. Σε ασθενείς με απώλεια βάρους >5% η διατροφική αξιολόγηση βελτιώθηκε με τη χρήση του miR-130a με ευαισθησία 88,6% και ειδικότητα 94,3%, αναδεικνύοντας το miR-130a ως ένα πιθανό βιοδείκτη τόσο για την πρόβλεψη της καχεξίας σε ασθενείς με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου, όσο και για τη βελτίωση της ακρίβειας της διάγνωσης της καχεξίας²⁶⁴.



Σχήμα 16. Κυκλοφορούντα ncRNAs και απορρυθμισμένα ncRNAs κατά την απώλεια μυών και λιπώδους ιστού σε ασθενείς με καρκίνο και καχεξία. Στο μαύρο πλαίσιο περιέχονται miRNAs, στο γαλάζιο lncRNAs και στο μωβ κυκλικά RNAs (circRNAs). Με κόκκινο χρώμα είναι τα ncRNAs που αυξορρυθμίζονται, ενώ με πράσινο χρώμα είναι τα ncRNAs που μειορρυθμίζονται κατά την καρκινική καχεξία (Προσαρμογή από 213).

Σε μελέτη των Okugawa et al για τον κολοορθικό καρκίνο, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του miR-21 στον ιστό και στον ορό των ασθενών, προ και μετά χειρουργείου. Σε αντίθεση με τον ιστό, τα επίπεδα του miR-21 στον ορό ήταν αυξημένα σε ασθενείς με χαμηλό δείκτη μάζας ψοΐτη μυ, καθιστώντας το miR-21 μία πιθανή παράμετρο που θα βοηθήσει τον κλινικό γιατρό να αποφασίσει για τη διατροφική στρατηγική που θα ακολουθήσει σε ασθενείς με κολοορθικό καρκίνο ²⁶⁵. Αργότερα, η ίδια ομάδα σε μια μελέτη στον κολοορθικό καρκίνο αξιολογήθηκε η έκφραση του miR-203 στον ορό των ασθενών και ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με χαμηλό δείκτη μυϊκής μάζας ψοΐτη, ενώ ο ενδομυϊκός λιπώδης ιστός δε σχετίστηκε με την έκφραση του miR-203 στον ιστό ή στον ορό ²⁶⁶. Επιπλέον, η μελέτη αυτή έδειξε ότι τα αυξημένα επίπεδα miR-203 είναι ανεξάρτητος προβλεπτικός παράγοντας για μυοπενία στους ασθενείς με κολοορθικό καρκίνο ²⁶⁶. Αποτελέσματα από *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι μετά από επιμόλυνση ανθρώπινων σκελετικών μυϊκών κυττάρων με miRNA-203 mimics, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός καταστάληκε σε μέτριο βαθμό, ο ρυθμός απόπτωσης αυξήθηκε και ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων μειώθηκε σημαντικά ²⁶⁶.

Στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια τα επίπεδα του miR-422a στο πλάσμα των ασθενών συσχετίστηκαν με απώλεια μυών, και με τη μυϊκή δύναμη παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση, ενώ η έκφρασή του ήταν υψηλή στους μυς ²⁶⁷. Σε *in vitro* πειράματα που συμπεριλήφθησαν στην ίδια μελέτη το miR-422a κατέστειλε την έκφραση του SMAD4 και ανέστειλε το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF-β στα μυϊκά κύτταρα, υποδεικνύοντας ότι το miR-422a παρέχει αντίσταση στον καταβολισμό στον μυ ²⁶⁷.

Το miR-486, ένα miRNA το οποίο βρίσκεται ενισχυμένο στους μυς, βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα στην κυκλοφορία ασθενών με καρκίνο μαστού σε σχέση με υγιή άτομα και η διαφορά αυτή επιβεβαιώνεται και σε διαγονιδιακό μοντέλο καρκίνου μαστού ποντικού ²⁶⁸. Στα ποντίκια με καρκίνο μαστού, τα επίπεδα του miR-486 ήταν σχετικά χαμηλά στους μυς, ενώ ήταν αυξημένα τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-στόχων του miR-486, *PTEN* και *FOXO1A* και εξασθενούσε τη σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού PI3K/AKT. Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα MyoD, ο οποίος ελέγχει την έκφραση του miR-486 ήταν επίσης χαμηλή στους σκελετικούς μυς. Το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό από την καλλιέργεια κυττάρων καρκίνου μαστού προκάλεσε μείωση των επιπέδων του miR-486 σε καλλιέργεια C2C12 μυοβλαστών, ενώ τα επίπεδα των *PTEN* και *FOXO1A* αυξήθηκαν. Σε ανάλυση των κυτταροκινών

αναδείχθηκε ο TNFα και τέσσερις επιπλέον κυτταροκίνες ως διαμεσολαβητές της έκφρασης του miR-486 στους μυοβλάστες που είχαν αναπτυχθεί με το θεραπευτικό υλικό από την καλλιέργεια κυττάρων καρκίνου μαστού²⁶⁸.

Η απώλεια μυών μπορεί να είναι συνέπεια χρονίων ή οξείων ασθενειών καθώς επίσης και της γήρανσης και απορρέει από μία ανισορροπία πρωτεϊνικής σύνθεσης και αποικοδόμησης και αντίσταση στη διέγερση για αναβολισμό. Τα ριβοσώματα είναι απαραίτητα για την πρωτεϊνοσύνθεση και παίζουν ρόλο στην μυϊκή απώλεια. Ένα miRNA το οποίο προβλέπεται ότι στοχεύει στα συστατικά του μονοπατιού πρωτεϊνοσύνθεσης είναι το miR-424-5p, το οποίο είναι αυξημένο στους τετρακέφαλους μυς ασθενών με COPD. Σε *in vitro* πειράματα, το miR-424-5p μείωσε την έκφραση RNAs που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που απαιτούνται για το σύμπλοκο PolR1A προ της ενάρξεως της μεταγραφής, μείωσε την έκφραση των rRNAs και ανέστειλε την πρωτεϊνοσύνθεση. Σε ασθενείς με COPD που είχαν υποβληθεί σε επέμβαση αορτής ή ήταν στη μονάδα αυξημένης φροντίδας, τα αυξημένα επίπεδα miR-424-5p σχετίστηκαν με την βαρύτητα της νόσου. Επιπλέον, τα προ χειρουργείου επίπεδα του miR-424-5p σχετίστηκαν με μυϊκή απώλεια τις επόμενες 7 ημέρες²⁶⁹.

Το ραβδομυοσάρκωμα είναι ένας κακοήθης όγκος που αναπτύσσεται από σκελετικό μυ και υπερεκφράζει τα myomiRs. Τα myomiRs απελευθερώνονται από τον όγκο με αποτέλεσμα ασθενείς με ραβδομυοσάρκωμα να έχουν υψηλά επίπεδα ορού των miR-1, miR-133a, miR-133b, και miR-206 σε σχέση με υγιή άτομα ή ασθενείς με άλλου τύπου όγκους²⁷⁰. Ωστόσο, αλλαγές στα κυκλοφορούντα myomiRs έχουν αναφερθεί και σε άλλους τύπους καρκίνου. Στο γαστρικό καρκίνο έχει αναφερθεί διπλάσια αύξηση του miR-1, αλλά στους περισσότερους καρκίνους που έχουν μελετηθεί (μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα, μελάνωμα, αστροκύτωμα, οστεοσάρκωμα), αναφέρονται χαμηλότερα επίπεδα των myomiRs σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό²⁷¹⁻²⁷⁴. Τα miR-206 και miR-133 (a και b) έχουν ογκοκατασταλτικές ιδιότητες και μειορρυθμίζονται σε αρκετούς όγκους, ενώ τα χαμηλά επίπεδα κυκλοφορούντων myomiRs έχουν αρνητική προγνωστική αξία^{271,273,275,276}. Στις μελέτες αυτές υπάρχει περιορισμένη πληροφόρηση για τους βιοδείκτες στις μυϊκές βλάβες ή για τη μυϊκή μάζα. Οι Köberle et al. έχουν προτείνει ότι τα επίπεδα miR-1 στον ορό των ασθενών σχετίζονται με την συνολική επιβίωση στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα²⁷⁷. Άρα, αν οι σκελετικοί μύες απελευθερώνουν συνεχώς μυο-ειδικά miRNAs, μία ουσιαστική μείωση μυϊκής μάζας, θα είχε ως αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα των αντίστοιχων myomiRs

στην κυκλοφορία. Επομένως, όπως έχει δειχθεί και στη μυϊκή δυστροφία Duchenne, τα κυκλοφορούντα myomiRs θα ήταν χρήσιμα στην παρακολούθηση της μάζας μυοϊνών στον καρκίνο και στην πρόγνωση^{255,278}.

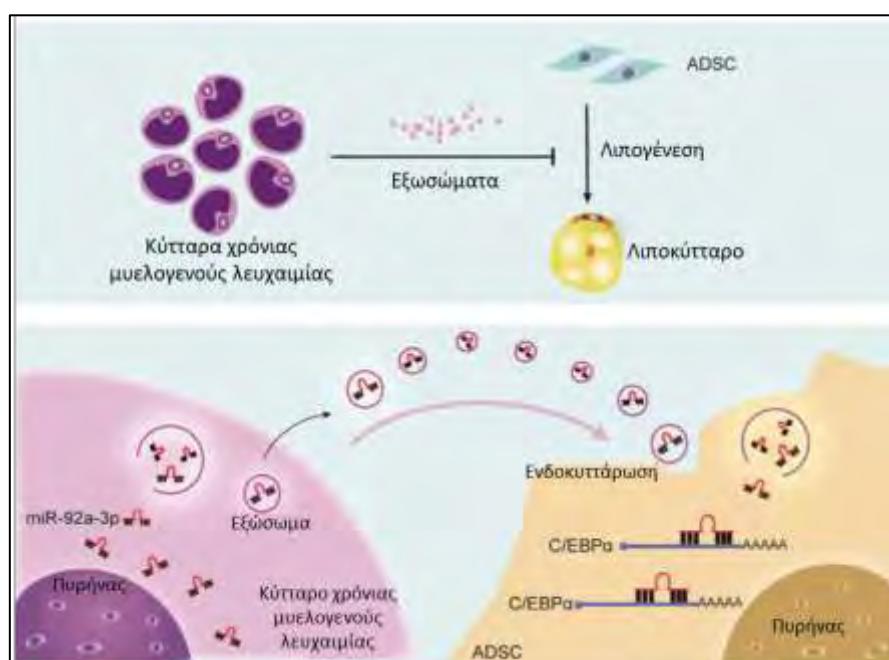
6.1.5.1. Εξωσωματικά miRNAs στην καρκινική καχεξία

Τα εξωσώματα είναι μικρά μεμβρανικά κυστίδια μεγέθους 30-100nm²⁴¹. Η βιογένεση των εξωσωμάτων συνδέεται με την σύνθεση των miRNAs^{279,280}. Έχουν υψηλή σταθερότητα και ειδικότητα στη μεταφορά φορτίων στα κύτταρα στόχους, και έτσι εμπλέκονται στην επικοινωνία ιστού με ιστό με αυτοκρινή, παρακρινή και ενδοκρινή τρόπο^{279,281}. Τα εξωσώματα αναπαριστούν έναν αποτελεσματικό τρόπο μεταφοράς μορίων, όπως πρωτεΐνες, RNA (ακέραια ή τμήματα RNA, lncRNAs, miRNAs, rRNAs, τμήματα tRNA) και κυτταροκίνες μειώνοντας την αποικοδόμηση εξαιτίας της μεταφοράς τους στην κυκλοφορία του αίματος^{279,282}. Οι παρακρινείς και ενδοκρινείς δράσεις των miRNAs έχουν συσχετιστεί με την εξάπλωση της συστηματικής φλεγμονής στην ανάπτυξη της μετάστασης και στην ενεργοποίηση μονοπατιών που προάγουν τη μυϊκή απώλεια²⁸⁰. Εναλλακτικά, μπορεί να εξαχθούν μέσα σε εξωσώματα και να δράσουν με παρακρινή ή ενδοκρινή τρόπο²¹⁶.

Μία *in vitro* μελέτη από τους Wu et al. έδειξε ότι τα εξωσώματα που παράγονται από κύτταρα καρκίνου μαστού (4T1) μπορούν να προκαλέσουν καρκινική καχεξία μέσω του miR-155²⁸³. Τα λιποκύτταρα που καλλιεργήθηκαν μαζί με τα 4T1 κύτταρα παρουσίασαν αυξημένη έκφραση UCP1 (uncoupling protein 1) και δραματική μείωση PPARG (peroxisome proliferator activated receptor gamma) και φωσφορυλιωμένου (P)-PPARG, τα οποία εμπλέκονται στη συσσώρευση λίπους²⁸³. Η ρύθμιση της φωσφορυλιωμένης ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) ήταν αρνητική, ενώ της φωσφορυλιωμένης p38 ήταν θετική. Επιπλέον, τα ώριμα μυϊκά κύτταρα που συγκαλλιεργήθηκαν μαζί με κύτταρα καρκίνου μαστού υπέστησαν κυτταρικό θάνατο, απώλεια της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης, ατροφία μυοσωλήνων, αύξηση επιπέδων UCP3, υπερέκφραση P-p38 και μειορρυθμισμό των P-ERK1/2, PPARG και P-PPARG, σε σύγκριση με μυϊκά κύτταρα που καλλιεργήθηκαν μόνα τους, προτείνοντας ότι τα miRNAs που περιέχονται σε εξωσώματα που παράγονται από τον όγκο προάγουν τον καταβολισμό των λιποκυττάρων και των μυϊκών ινών²⁸³. Επίσης, παρατηρήθηκε αυξορρυθμισμό του miR-155 στα εξωσώματα που παράγονται από τα 4T1 κύτταρα και

στόχευση του PPAR γ στα λιποκύτταρα προήγαγε τη φαιοποίηση και την αναδιαμόρφωση του μεταβολισμού των λιποκυττάρων ²⁸³. Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα που συγκαλλιεργήθηκαν με λιπολύτταρα ή μυοκύτταρα παρουσίασαν αυξημένη διεισδυτικότητα ²⁸³. Μετά την καλλιέργειά τους με ώριμα λιποκύτταρα ή με μυοβλάστες C2C12, τα καρκινικά κύτταρα μαστού αποκτούσαν επιθετικό φαινότυπο μέσω επαγωγής της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάπτωσης, ενώ τα εξωσώματα που προέρχονταν από τα καρκινικά κύτταρα μαστού αύξησαν τον καταβολισμό και την απελευθέρωση μεταβολιτών στα λιποκύτταρα και στα μυοκύτταρα. Στα λιποκύτταρα, το miR-155 που εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα μαστού προάγει τη φαιοποίηση και αναπρογραμματίζει το μεταβολισμό στα λιποκύτταρα μέσω μειορρύθμισης του PPAR γ , προτείνοντας έναν πιθανό ρόλο του miR-155 στον καταβολισμό των λιποκυττάρων και των μυοκυττάρων μέσω στόχευσης του PPAR γ ²⁸⁴.

Σε συμφωνία με την παραπάνω μελέτη, ποντίκια στα οποία είχαν ενέσει εξωσώματα από κύτταρα χρόνιας μυελοειδούς λευχαιμίας (K562) παρουσίασαν σημαντική απώλεια σωματικού βάρους και λίπους ²⁸⁵. Επιπλέον, τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα του λιπώδους ιστού μπορούσαν να προσλάβουν τα εξωσώματα των K562 κυττάρων και με τη σειρά τους να καταστείλουν την ικανότητα για λιπογένεση (Σχ. 17)²⁸⁵. Τόσο στα K562 κύτταρα όσο και στα εξωσώματα που παρήγαγαν παρατηρήθηκε αυξορρύθμιση του miR-92a-3p, το οποίο μπορούσε να καταστείλει την ικανότητα για λιπογένεση μειώνοντας την έκφραση του *Cebpa* (*CCAAT enhancer binding protein alpha*).



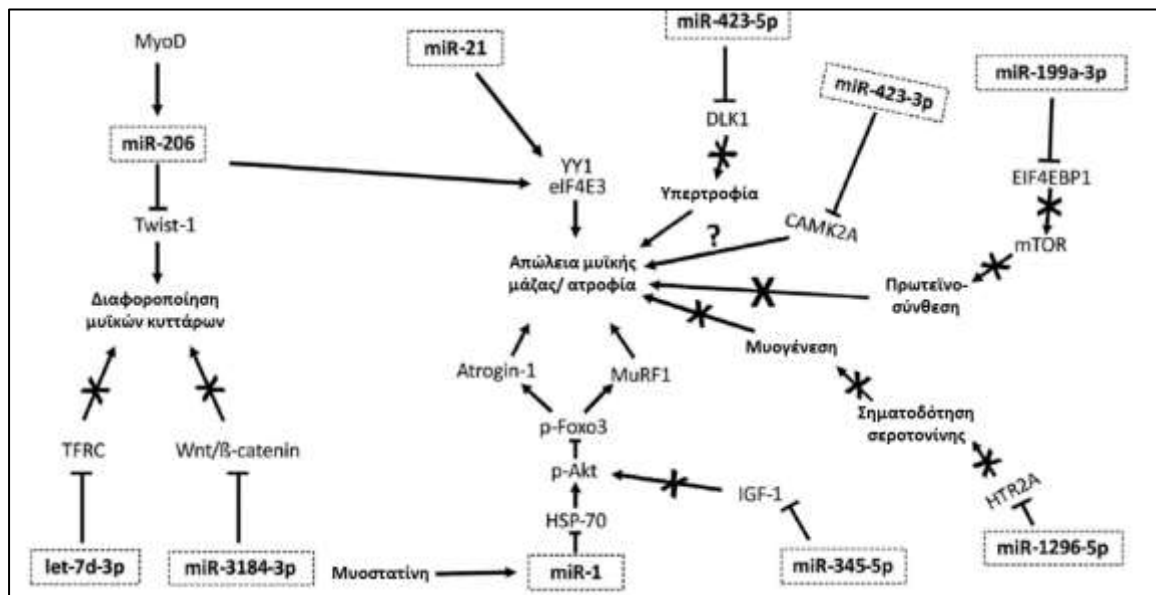
Σχήμα 17. Τα εξωσώματα που παράγονται από τον όγκο εξασθενούν την λιπογένεση στα ADSCs μέσω του miR-92a-3p που περιέχουν, το οποίο προσδένεται στο mRNA του *C/EBPα* και καταστέλλει την έκφρασή του, συμβάλλοντας στην καρκινική καχεξία. ADSC: adipose-derived mesenchymal stem cell, μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα του λιπώδους ιστού. Προσαρμογή από ²⁸⁵.

6.1.5.1.1. Εξωσωματικά miRNAs και μυϊκή απώλεια

Τα miRNAs συμβάλλουν τόσο στην έναρξη όσο και στη διατήρηση της φλεγμονής που σχετίζεται με την καχεξία ^{195,280}. Οι δράσεις τους σχετίζονται και με την παρουσία κυκλοφορούντων εξωσωμάτων εμπλουτισμένων με miRNAs ^{241,280}. Η υπερέκφραση του miR-21 σε μικροκυστίδια που εκκρίνονται από καρκινικά κύτταρα πνεύμονα και παγκρέατος έδειξε να επάγει την απόπτωση σε σκελετικά μυϊκά κύτταρα ²⁸⁶. Σε μυοβλάστες που απομονώθηκαν από ποντίκια TLR7^{-/-} (toll-like receptor 7) και επώαστηκαν με θρεπτικό υπερκείμενο από κύτταρα Lewis καρκινώματος πνεύμονα παρατηρήθηκε μειωμένος ρυθμός κυτταρικού θανάτου σε σχέση με μυοβλάστες που απομονώθηκαν από ποντίκια TLR7^{+/+} και καλλιιεργήθηκαν στο ίδιο θρεπτικό μέσο. Όταν μυοβλάστες που απομονώθηκαν από ποντίκια TLR7^{-/-} καλλιιεργήθηκαν με θρεπτικό μέσο που περιείχε ορό από καχεκτικούς ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο, παρατηρήθηκε επίσης μειωμένος κυτταρικός θάνατος ²⁸⁶. Επιπλέον, η εξωγενής προσθήκη miR-21 σε μυοβλάστες από TLR7^{+/+} αύξησε το ρυθμό κυτταρικού θανάτου σε σχέση με μυοβλάστες από ποντίκια TLR7^{-/-}, ενώ σε μυοβλάστες που πολλαπλασιάζονταν επάγονταν παροδικά η έκφραση των JNK και c-Jun μετά από έκθεση σε miR-21, υποδεικνύοντας ότι το miR-21 προάγει τον κυτταρικό θάνατο ενεργοποιώντας τη σηματοδότηση του TLR7 καθοδικά του JNK ²⁸⁶.

Σε μια άλλη μελέτη, οι Hudson et al. έδειξαν ότι το miR-182 που βρίσκεται στα εξωσώματα μπορεί να εξασθενίσει τον ρόλο του Foxo3 στην επαγωγή της ατροφίας στους σκελετικούς μυς ²⁸⁷. Ο Foxo3 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που προάγει την αύξηση γονιδίων που σχετίζονται με την ατροφία, όπως η *atrogen-1*, η *ATG12* (autophagy-related protein 12), και η *microtubule-associated protein light chain 3*. Η επεξεργασία των μυοσωλήνων C2C12 με δεξαμεθαζόνη, ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές με έντονη αντιφλεγμονώδη δράση προάγει τη μείωση της έκφρασης του miR-182 και αύξηση της αυτοφαγίας, μέσω ενισχυμένης δραστηριότητας του Foxo3. Παρόμοιος μηχανισμός ατροφίας έχει παρατηρηθεί και στους

γαστροκνημιαίους μυς από αρουραίους διαβητικούς (με στρεπτοζοκίνη) με μειωμένη έκφραση miR-182 και αυξημένο mRNA του *Foxo3*²⁸⁷. Σε άλλη μελέτη από τους Zhang et al. έχει δειχθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν εξωσώματα και οι πρωτεΐνες HSP70 και HSP90 στη μεμβράνη των εξωσωμάτων μπορούν να επάγουν απώλεια μυϊκής μάζας σε μοντέλα καρκινικής καχεξίας¹¹¹. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τον TLR-4 και να επάγουν την ενεργοποίησή του και ακολούθως το καταβολικό σηματοδοτικό μονοπάτι της p38β MAPK-C/EBPβ στον μυ¹¹¹ (Σχ. 18).



Σχήμα 18. Ο ρόλος των myomiRs στην απώλεια μυϊκής μάζας και στα μονοπάτια ατροφίας. Η MyoD μπορεί να ενεργοποιεί το miR-206, προάγοντας την αναστολή της δράσης της Twist-1, μειώνοντας τη διαφοροποίηση των μυϊκών κυττάρων. Τα miR-206 και miR-21 ρυθμίζουν τη δράση των YY1 και eIF4E3, προάγοντας την απώλεια μυϊκής μάζας. Η μυοστατίνη αυξάνει την έκφραση του miR-1 expression, προάγοντας την μείωση της δράσης της HSP70, την μείωση της φωσφορυλίωσης της Akt, και της ρύθμισης του Foxo3. Όταν ο Foxo3 δεν είναι φωσφορυλιωμένος, ενισχύεται η έκφραση αρκετών πρωτεϊνών που επάγουν την ατροφία, όπως οι Atrogin-1 και MuRF1. Το let-7d-3p μειορρυθμίζει τον υποδοχέα της τρανσφερίνης (TFRC), επηρεάζοντας τον πολλαπλασιασμό των μυϊκών κυττάρων και τη μυογόνο διαφοροποίηση. Το miR-3184-3p αναστέλλει το μονοπάτι Wnt/β-catenin, ελαττώνοντας την μυογόνο διαφοροποίηση. Το miR-345-5p μειορρυθμίζει γονίδια και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μονοπάτι IGF1 pathway, μειώνοντας την αναβολική σηματοδότηση. Το miR-1296-5p ρυθμίζει το γονίδιο HTR2A, μειώνοντας τη συμμετοχή της σεροτονίνης στην επαγωγή της μυογένεσης. Το miR-199a-3p επηρεάζει το γονίδιο EIF4EBP1, ελαττώνοντας την ενεργότητα του μονοπατιού mTOR, παρεμβαίνοντας στην πρωτεϊνοσύνθεση. Το miR-423-3p προάγει τη μείωση της σηματοδότησης του ασβεστίου, επηρεάζοντας το

γονίδιο CAMK2A. Το miR-423-5p μειορρυθμίζει το DLK1, το οποίο εμπλέκεται στην υπερτροφία των μυών (Προσαρμογή από ²⁸⁸).

Το miRNA-26a έχει βρεθεί στα εξωσώματα που παράγονται από τους μυς ποντικών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Η υπερέκφραση του miRNA-26a στους μυς αποτρέπει την απώλεια μυών και την καρδιακή ίνωση λόγω της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, μέσω αλληλεπίδρασης μυών και καρδιάς μέσω εξωσωμάτων ²⁸⁹.

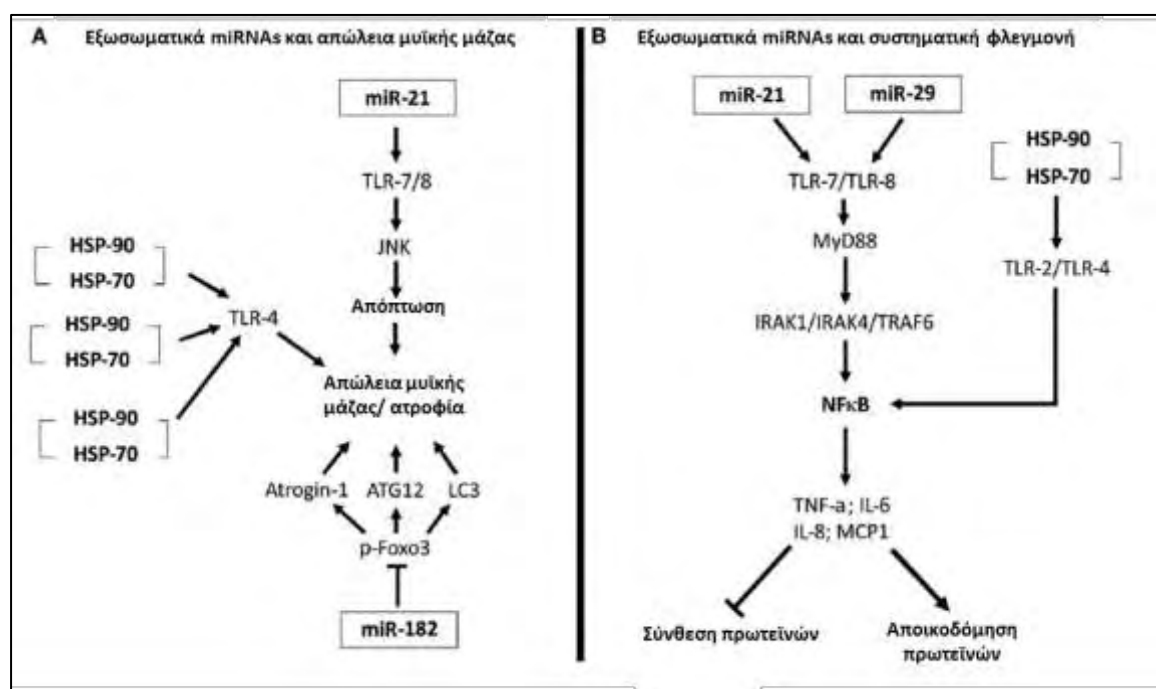
Ο βελονισμός με χαμηλής συχνότητας ηλεκτρική διέγερση (Acu/LFES) έχει βρεθεί ότι μπορεί να αποτρέψει τη μυϊκή ατροφία αυξάνοντας τον αναβολισμό των μυϊκών πρωτεϊνών σε μοντέλα ποντικών με νεφρική ανεπάρκεια, διαβήτη και απονεύρωση. Σε ποντίκια που εφαρμόστηκε Acu/LFES για 15 μέρες παρατηρήθηκε ενισχυμένη αιματική ροή στους νεφρούς και αύξηση στη συγκέντρωση των εξωσωμάτων στην κυκλοφορία. Σε ανάλυση των εξωσωμάτων του ορού, 34 miRNA είχαν διαφορά στην έκφραση με το miR-181d-5p να έχει την υψηλότερη έκφραση στον ορό των ποντικών που είχαν θεραπεία με Acu/LFES. Σε επιπλέον πειράματα, φάνηκε ότι το miR-181 αναστέλλει απευθείας το αγγειοτενσινογόνο, το οποίο εξηγεί έμμεσα πώς θεραπεία με Acu/LFES ρυθμίζει την αιματική ροή στους νεφρούς ²²⁸.

6.1.5.1.2. Εξωσωματικά miRNAs και συστηματική φλεγμονή

Ένας από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην έναρξη της φλεγμονής στην καρκινική καχεξία είναι και ο λευκός λιπώδης ιστός, μέσω αύξησης των κυκλοφορούντων φλεγμονωδών κυτταροκινών ¹⁵⁵. Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι ο λευκός λιπώδης ιστός εκκρίνει εξωσώματα τα οποία περιέχουν miRNAs τα οποία ρυθμίζουν φλεγμονώδεις διαδικασίες στους ιστούς και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού ^{290,291}. Επιπλέον, τα εξωσώματα του λιπώδους ιστού μπορούν να διεγείρουν και να ρυθμίσουν την αύξηση, ανάπτυξη και επιθετικότητα των όγκων ²⁹⁰. Παρομοίως, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι και οι όγκοι μπορούν να εκκρίνουν εξωσώματα που περιέχουν miRNAs τα οποία παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση της φλεγμονώδους διαδικασίας στον καρκίνο ^{292,293}. Αυτά τα εξωσώματα που παράγονται από τους όγκους αλληλεπιδρούν με τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα και αυξάνουν την σύνθεση και την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, προάγοντας την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων ²⁹². Επιπλέον, τα εξωσώματα που παράγονται από τους όγκους

επάγουν την εξέλιξη του όγκου τροποποιώντας το μικροπεριβάλλον του όγκου και προάγοντας τη μετάσταση^{292,293}.

Παράλληλα με την εμπλοκή των miRNAs στη ρύθμιση της απώλειας μυών και στα μονοπάτια της ατροφίας, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα εξωσώματα περιέχουν miRNAs τα οποία μπορούν να προάγουν και να διαιωνίζουν στη συστηματική φλεγμονή στην καρκινική καχεξία (Σχ. 19)^{280,294–297}. Οι Fabbri et al. έδειξαν ότι τα miR-21 και miR-29 μπορούν να συσχετίζονται και να αλληλεπιδρούν με τους TLR-7 και TLR-8, πυροδοτώντας ένα φλεγμονώδες σήμα. Όταν ενεργοποιηθούν, οι toll-like υποδοχείς προάγουν την επιστράτευση του MyD88 και τον σχηματισμό του συμπλόκου IRAK1, IRAK4, και TRAF6, το οποίο ενεργοποιεί τον NFκB (nuclear factor kappa B). Στον πυρήνα, ο NFκB επάγει την έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων των TNF-α και IL-6^{294,295}.



Σχήμα 19. (A) Ο ρόλος των εξωσωματικών miRNAs στην απώλεια μυϊκής μάζας. Το miR-21 αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί τον υποδοχέα TLR-7. Ο TLR-7, μέσω του μονοπατιού JNK, επάγει την απόπτωση των μυϊκών κυττάρων, οδηγώντας σε ατροφία. Οι πρωτεΐνες HSP70 και HSP90 που βρίσκονται στην μεμβράνη των εξωσωμάτων μπορούν να προσδένουν τον TLR-4, ενεργοποιώντας τον υποδοχέα αυτό στα μυϊκά κύτταρα και επάγοντας την απώλεια μυϊκής μάζας. Το εξωσωματικό miR-182 μπορεί να αναστείλει τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα Foxo3, με αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης αρκετών γονιδίων ατροφίας, όπως τα *LC3*, *Atrogin-1*, και

ATG12. (B) Ο ρόλος των εξωσωματικών miRNAs στην συστηματική φλεγμονή. Τα miR-21 και miR-29 μπορούν να αλληλεπιδρούν και να ενεργοποιούν τους υποδοχείς TLR-7/8 και μέσω της MyD88 το μονοπάτι του NFκB pathway, επάγοντας την αυξημένη έκφραση και απελευθέρωση των προφλεγμονωδών TNF-α, IL-6, IL-8, και MCP-1. Αυτή η προφλεγμονώδης κατάσταση ενισχύει την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και αναστέλλει στην πρωτεϊνική σύνθεση. Οι πρωτεΐνες HSP70 και HSP90 οι οποίες βρίσκονται στη μεμβράνη των εξωσωμάτων μπορούν να προσδένονται και να ενεργοποιούν τους υποδοχείς TLR-2 και TLR-4. Όταν ενεργοποιηθούν οι υποδοχείς αυτοί προάγουν την ενεργοποίηση του μονοπατιού του NFκB, επάγοντας ακόμα περισσότερο τη φλεγμονή (Προσαρμογή από ²⁸⁸).

Επιπλέον, οι Li et al. αναφέρουν ότι όταν μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα επώαστηκαν με εξωσώματα που απομονώθηκαν από κύτταρα καρκίνου πνεύμονα (A659) παρατηρήθηκε προφλεγμονώδης φαινότυπος στα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα ²⁹⁶. Τα κύτταρα αυτά ενίσχυαν τη σύνθεση και έκκριση των IL-6, IL-8, και MCP-1. Η HSP70 της μεμβράνης των εξωσωμάτων μπορούσε να προσδέεται στον TLR-2 και να ενεργοποιεί το μονοπάτι NFκB, οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση και έκκριση των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6, IL-8, και MCP-1 ²⁹⁶.

Στην εργασία τους οι Zhang et al. έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες HSP70 και HSP90 υπάρχουν στη μεμβράνη των εξωσωμάτων, αλληλεπιδρούν και ενεργοποιούν τους TLR-2 και TLR-4 στα κύτταρα του ανοσοποιητικού πυροδοτώντας την έμφυτη ανοσολογική απόκριση ¹¹¹. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών προάγει την αύξηση στη σύνθεση και έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF-α και IL-6), συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της συστηματικής φλεγμονής που υπάρχει στην καρκινική καχεξία ¹¹¹.

Συνοψίζοντας, τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν την ανάμιξη των εξωσωματικών miRNAs και πρωτεϊνών στην ενεργοποίηση και διατήρηση της συστηματικής φλεγμονής στον καρκίνο και στην καρκινική καχεξία. Η συστηματική φλεγμονή επιδρά αρνητικά στον μεταβολισμό των μυών, ρυθμίζοντας σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη σύνθεση και στην καταστροφή των πρωτεϊνών στους μύς, συμβάλλοντας στην απώλεια μυϊκής μάζας που παρατηρείται στην καρκινική καχεξία ^{280,294,295}.

6.2. lncRNAs και καρκινική καχεξία

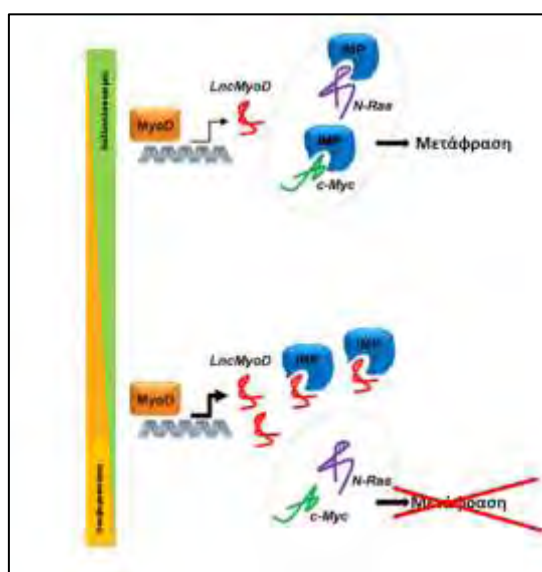
Τα lncRNAs (long non-coding RNAs) είναι RNAs μεγαλύτερα των 200 νουκλεοτιδίων τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες ²⁹⁸. Αυτό το είδος ncRNAs ποικίλλει ως προς το

μήκος, το σχήμα και τη λειτουργικότητα ²⁹⁸. Είναι γνωστό ότι τα lncRNAs έχουν διάφορες λειτουργίες όπως ρύθμιση και αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, μεταγραφική ρύθμιση, ρύθμιση πυρηνικών σωματίων, κύκλος mRNA και μετάφραση και μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις ²⁹⁸. Τα lncRNAs δρουν ρυθμιστικά κυρίως αλληλεπιδρώντας με miRNAs ^{298,299}.

Τα lncRNAs εμπλέκονται σε πολλές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου και της καχεξίας, ενώ κάποιες μελέτες εμπλέκουν τα lncRNAs και στην καρκινική καχεξία ^{199,300–302}.

6.2.1. lncRNAs και απώλεια μυών

Εφόσον η διαταραγμένη μυογένεση σχετίζεται με την καχεξία, είναι πιθανό το lncMyoD να σχετίζεται με την καχεξία ³⁰³. Το lncMyoD είναι ένα lncRNA το οποίο ενεργοποιείται κατά τη διαφοροποίηση των μυοβλαστών απευθείας από το MyoD (myogenic differentiation 1) ³⁰³. Όταν είναι ενεργό, το lncMyoD προσδένεται στο IMP2 (IGF2-mRNA-binding protein 2) και ρυθμίζει αρνητικά τη μετάφραση που μεσολαβείται από το IMP2 γονιδίων κρίσιμων για τον πολλαπλασιασμό, όπως το *N-Ras* (neuroblastoma ras oncogene) και το *c-Myc* (myelocytomatosis oncogene) (Σχ. 20) ³⁰³. Σε μια μελέτη των Gong et al. οι συγγραφείς προτείνουν το lncMyoD ως ένα πιθανό lncRNA που σχετίζεται με την καχεξία, καθώς η καταστολή του προκάλεσε αναστολή της μυϊκής διαφοροποίησης, οδηγώντας το κύτταρο σε αποτυχία εξόδου του κυτταρικού κύκλου ³⁰³.



Σχήμα 20. Ρύθμιση της διαφοροποίησης του σκελετικού μυ από το LncMyoD. Το LncMyoD, μεταγράφεται δίπλα στο γονίδιο *Myod* και ενεργοποιείται απευθείας από το MyoD κατά τη διαφοροποίηση των μυοβλαστών. Απενεργοποίηση του LncMyoD αναστέλει ισχυρά την τελική μυϊκή διαφοροποίηση, κυρίως λόγω της αδυναμίας εξόδου από τον κυτταρικό κύκλο. Το LncMyoD απευθείας προσδένεται στο IGF2-mRNA-binding protein 2 (IMP2) και ρυθμίζει αρνητικά τη μετάφραση γονιδίων που μεσολαβείται από το IMP2, όπως τα *N-Ras* και *c-Myc*. Προσαρμογή από ³⁰³.

Το lncIRS1 (insulin receptor substrate 1) είναι ένα άλλο lncRNA το οποίο πρόσφατα βρέθηκε εμπλουτισμένο στους σκελετικούς μυς των ποντικών και θεωρείται ότι δρα ως ενδογενές ανταγωνιστικό RNA ³⁰⁴. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι μπορεί να ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των μυοβλαστών *in vitro* και *in vivo* και ρυθμίζει *in vivo* τη μυϊκή μάζα και το εμβαδόν διατομής των ινών ³⁰⁴. Το lncIRS1 δρα ως σπόγγος για την οικογένεια miR-15 ώστε να ρυθμίσει την έκφραση του IRS1, και η υπερέκφρασή του ενεργοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης IGF1-PI3K/Akt. Το μονοπάτι IGF1-PI3K/Akt ελέγχει την σύνθεση και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και καταστολή του IRS1 προκαλεί μείωση των επιπέδων IGF1, οδηγώντας σε απώλεια βάρους στα ποντίκια ^{305,306}. Έτσι, η υπερέκφραση του lncIRS1 επάγει την έκφραση του IGF1 και την ενεργοποίηση της φωσφορυλίωσης της AKT, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των σκελετικών μυϊκών κυττάρων, αυξάνοντας τη μυϊκή μάζα και αντιμετωπίζοντας τη μυϊκή ατροφία ³⁰⁴.

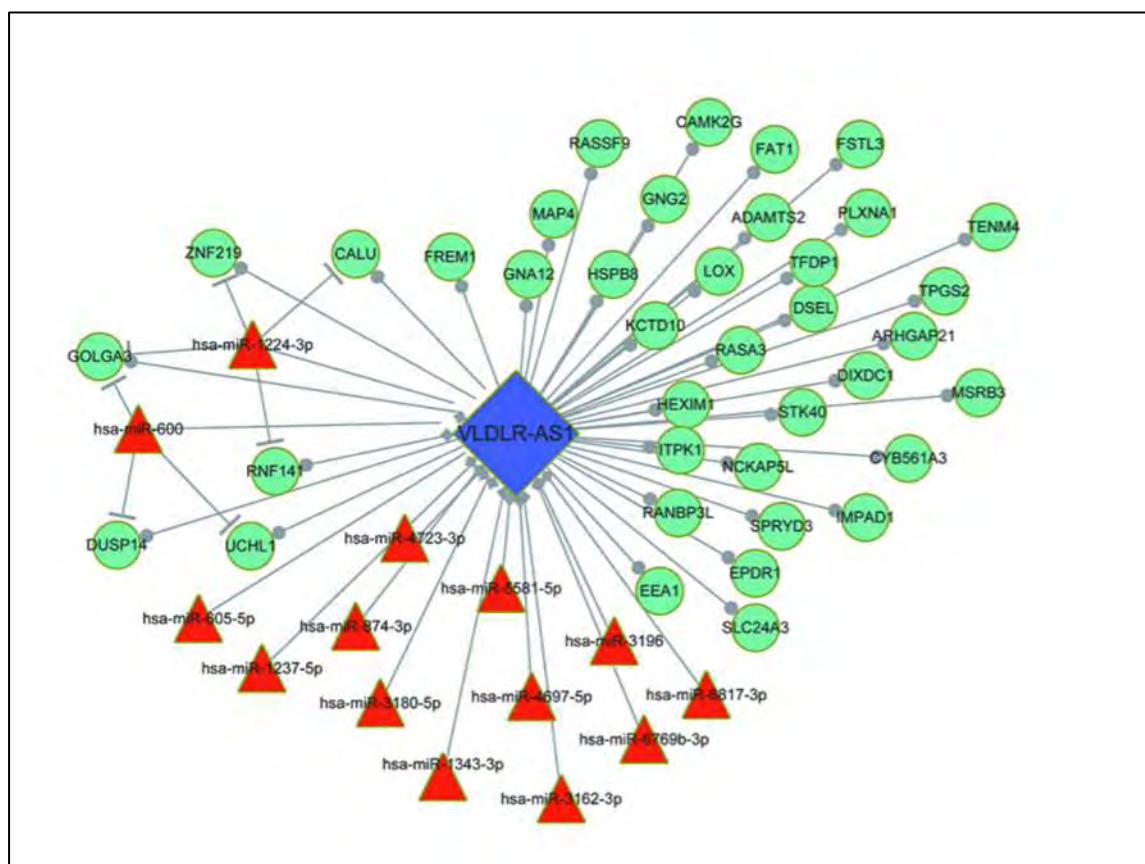
Ένα άλλο lncRNA, το Atrolnc-1 βρέθηκε σε αυξημένα επίπεδα σε ατροφικούς μυς καχεκτικών ποντικών με χρόνια νεφρική νόσο ³⁰⁷. Το Atrolnc-1 προάγει την ενεργοποίηση του NF-κB (nuclear factor-κB) και αυξάνει τη μεταγραφή του Trim63 (tripartite motif-containing 63), το οποίο με τη σειρά του διεγείρει την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και την ατροφία στους μυς ³⁰⁷. Η αναστολή του Atrolnc-1 βελτίωσε την απώλεια μυών στα ποντίκια μέσω καταστολής της έκφρασης του Trim63, υποδεικνύοντας ότι το Atrolnc-1 έχει ουσιώδη ρόλο στην έναρξη της καχεξίας μέσω ενεργοποίησης του NF-κB ³⁰⁷.

Πρόσφατα περιεγράφηκε το lncRNA MAR1 (muscle anabolic regulator 1), το οποίο συσχετίστηκε με τη μυϊκή διαφοροποίηση και αναγέννηση ³⁰⁸. Το lncRNA MAR1 βρέθηκε να εκφράζεται σε αυξημένα επίπεδα στους σκελετικούς μυς των ποντικών και να σχετίζεται θετικά με μυϊκή διαφοροποίηση και αύξηση, *in vitro* και *in vivo* ³⁰⁸. Το lncRNA MAR1 δρα ως σπόγγος για το miR-487b, το οποίο ρυθμίζει το Wnt5a (Wnt

family member 5A) και προάγει την μυϊκή διαφοροποίηση και αναγέννηση. Η υπερέκφρασή του εξασθένησε την μυϊκή ατροφία, διατηρώντας τη μυϊκή δύναμη και μάζα, καθιστώντας το υποψήφιο θεραπευτικό στόχο για τη μυϊκή ατροφία που σχετίζεται με την καρκινική καχεξία ³⁰⁸.

6.2.2. lncRNAs και απώλεια λιπώδους ιστού

Σε πρόσφατη μελέτη οι συγγραφείς ανέλυσαν δείγματα λιπώδους ιστού από ασθενείς με γαστρεντερικό καρκίνο με/χωρίς καχεξία και παρατήρησαν ότι το VLDLR-AS1 (VLDLR Antisense RNA 1), σχετίστηκε με καχεξία και απώλεια λιπώδους ιστού (Σχ. 21)³⁰¹. Οι συγγραφείς προέβλεψαν ότι το VLDLR-AS1 ρυθμίζει το GOLGA3 (golgin A3), DUSP14 (dual specificity phosphatase 14) και το UCHL1 (ubiquitin C-terminal hydrolase L1) μέσω αλληλεπίδρασης με το miR-600, το ZNF219 (zinc finger protein 219), RNF141 (ring finger protein 141) και την CALU (calumenin) μέσω αλληλεπίδρασης με το miR-1224-3p ³⁰¹.



Σχήμα 21. Ολοκληρωμένη ανάλυση του δικτύου ρύθμισης και αλληλεπιδράσεων του lncRNA VLDLR-AS1 και των miRNAs- και mRNAs-στόχων στην καχεξία στον γαστρεντερικό καρκίνο. Προσαρμογή από ³⁰¹.

Τα lncRNAs έχουν βρεθεί να εμπλέκονται και στη βιολογία του λιπώδους ιστού σε καχεκτικά ποντίκια τα οποία ενέθηκαν με καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου (C26). Συγκεκριμένα, η καταστολή του CAAInc1 (cachexia-related anti-adipogenesis lncRNA 1) βρέθηκε ότι προάγει τη λιπογένεση ³⁰⁰. Το CAAInc1 βρέθηκε να είναι περισσότερο εμπλουτισμένο στο ήπαρ και στον φαιό λιπώδη ιστό, παρά στον λευκό λιπώδη ιστό και θεωρείται ότι καταστέλλει τη λιπογένεση μέσω αλληλεπίδρασης με τη HuR (πρωτεΐνη που προσδένει RNA και απαιτείται για τη λιπογένεση) οδηγώντας σε απώλεια λιπώδους ιστού ³⁰⁰.

6.3. Κυκλικά RNAs και καρκινική καχεξία

Τα κυκλικά RNAs (circRNAs) αποτελούν είδος RNA που παράγονται από την κυκλοποίηση συγκεκριμένων εξωνίων μέσω ομοιοπολικού δεσμού του 3' άκρου του ενός εξωνίου με το 5' άκρο του ανοδικού εξωνίου ³⁰⁹. Τα circRNAs έχουν κατηγοριοποιηθεί ως μη κωδικά μόρια RNA, ενώ κάποιες μελέτες αναφέρουν ότι συγκεκριμένα circRNAs μπορεί να κωδικοποιούν πρωτεΐνες ³¹⁰. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι τα circRNAs μπορεί να λειτουργούν ως σπόγγοι miRNAs, καθώς διαθέτουν πολλές περιοχές πρόσδεσης για miRNAs και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ανθρώπινων ασθενειών, αλλά ο ρόλος τους στην καρκινική καχεξία δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς ^{311,312}.

Σχετικά με το ρόλο των circRNAs στην καρκινική καχεξία, σε μελέτη με ασθενείς με γαστρικό καρκίνο βρέθηκε ότι τα εξωσώματα των ασθενών είχαν υψηλότερη έκφραση του ciRS-133 (circRNA Hsa_circ_0010522) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ²¹². Επίσης, η έκφραση του ciRS-133 ήταν υψηλότερη στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον παρακείμενο ιστό. Επιπλέον, σε ασθενείς με γαστρικό καρκίνο, η έκφραση του ciRS-133 σχετίστηκε θετικά με τη μάζα του φαιού λιπώδους ιστού και το ποσοστό σωματικού λίπους. Σε in vitro μελέτες που ακολούθησαν φάνηκε ότι το miR-133 σχετίζεται άμεσα με το ciRS-133 ²¹². Εξωσώματα που απομονώθηκαν από την κυτταρική σειρά γαστρικού καρκίνου (SGC7091) είχαν υψηλότερη έκφραση του ciRS-

133, και όταν προστέθηκαν στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων 3T3L1 προκάλεσαν αυξορρύθμιση των PRDM16 (PR-domain containing 16) και UCP1. Η υπερέκφραση του miR-133 κατέστειλε το PRDM16 και το UCP1, ενώ η καταστολή του miR-133 προκάλεσε αύξηση των επιπέδων του PRDM16 και του UCP1 ²¹². Επίσης, τα εξωσώματα από τα SGC7091 κύτταρα προκάλεσαν αύξηση του ρυθμού κατανάλωσης γλυκόζης και οξυγόνου και αύξησαν τη μέγιστη αναπνευστική ικανότητα των κυττάρων 3T3L1. Όταν ποντίκια ενέθηκαν με κύτταρα SGC7901 που υπερεξέφραζαν το ciRS-133, η έκφραση του ciRS-133 αυξήθηκε τόσο στον καρκινικό ιστό και στα εξωσώματα του ορού, όσο και στον βουβωνικό λιπώδη ιστό, και τα ποντίκια αυτά παρουσίασαν μειωμένο βάρος του βουβωνικού λιπώδους ιστού και φαιοποίηση. Με τα ευρήματα της μελέτης αυτής φάνηκε ότι το ciRS-133 επιδεινώνει την καρκινική καχεξία, πιθανόν μέσω φαιοποίησης του λιπώδους ιστού και αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο ²¹².

Στον πίνακα 3 και 4 φαίνονται συγκεντρωτικά τα ncRNAs των οποίων τα επίπεδα στην κυκλοφορία ή στους ιστούς, αντίστοιχα, διαφοροποιούνται στην καρκινική καχεξία, είτε σε ασθενείς είτε σε μοντέλα ζώων.

Πίνακας 3. Μεταβολές στην έκφραση των ncRNAs στους ιστούς στην καρκινική καχεξία.

ncRNA	Έκφραση	Ιστός	Αναφορά
miR-3184-3p	Αυξημένη	Μυς καχεκτικών ασθενών με κολοορθικό ή παγκρεατικό καρκίνο	252
miR-423-5p			
let-7d-3p			
miR-1296-5p			
miR-345-5p			
miR-532-5p			
miR-423-3p			
miR-199a-3p			
miR-1	Μειωμένη	Διάφραγμα και γαστροκνήμιο καχεκτικών ποντικών	250
miR-133a			
miR-206			
miR-486			
miR-486	Μειωμένη	Σκελετικοί μύες ποντικών με καρκίνο μαστού	268
miR-424-5p	Αυξημένη	Έξω πλατύς μηριαίος μυς καχεκτικών ασθενών με προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα	253
miR-424-3p			
miR-450a			
miR-451a	Μειωμένη		
miR-144-5p			
miR-147-3p	Αυξημένη		251

miR-205-5p	Μειωμένη	Πρόσθιος κνημιαίος μυς ποντικών με Lewis καρκίνωμα πνεύμονα που ανέπτυξαν καχεξία	
miR-511-3p			
miR-223-3p			
miR-299a-3p			
miR-1933-3p			
miR-3473d			
miR-431-5p			
miR-665-3p			
miR-483-5p	Μειωμένη	Κοιλιακός υποδόριος ιστός καχεκτικών ασθενών με γαστρεντερικό καρκίνο	237
miR-23a			
miR-744			
miR-99b			
miR-378	Αυξημένη		
VLDLR-AS1	Αυξημένη	Λιπώδης ιστός καχεκτικών ασθενών με γαστρεντερικό καρκίνο	301
CAAInc1	Αυξημένη	Ήπαρ και φαιός λιπώδης ιστός καχεκτικών ποντικών με καρκίνο	300

Πίνακας 4. Μεταβολές στα επίπεδα των ncRNAs στην κυκλοφορία στην καρκινική καχεξία.

ncRNA	Έκφραση	Κυκλοφορία	Αναφορά
miR-21	Αυξημένη	Εξωσώματα από καρκινικά κύτταρα πνεύμονα ή παγκρέατος	286
miR-21	Αυξημένη	Ορός καχεκτικών ασθενών με κολοορθικό καρκίνο	265
miR-155	Αυξημένη	Εξωσώματα από κύτταρα καρκίνου μαστού	283
miR-92a-3p	Αυξημένη	Εξωσώματα από κύτταρα χρόνιας μυελοειδούς λευχαιμίας	285
miR-130a	Μειωμένη	Πλάσμα καχεκτικών ασθενών με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου	264
miR-203	Αυξημένη	Ορός ασθενών με κολοορθικό καρκίνο	266
miR-486	Μειωμένη	Ορός ασθενών με καρκίνο μαστού	268
ciRS-133	Αυξημένη	Εξωσώματα ασθενών με γαστρικό καρκίνο	212

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7. Επιγενετική και θεραπεία της καχεξίας

Εφόσον αρκετά μονοπάτια εμπλέκονται στην απώλεια μυών, γίνεται αντιληπτή η σημαντικότητα των παρεμβάσεων που θα μπορούν ταυτόχρονα να τροποποιούν πολλαπλούς στόχους. Μία τέτοια θεραπευτική επιλογή αποτελεί η επιγενετική θεραπεία, η οποία μπορεί να επιδρά με αναστρέψιμες αλλαγές στη γονιδιακή ρύθμιση, ανεξάρτητα από την αλληλουχία του DNA. Επιγενετικές αλλαγές όπως η μεθυλίωση, η φωσφορυλίωση, η ακετυλίωση κ.ά. ρυθμίζουν λεπτομερώς τη γονιδιακή έκφραση αναστρέψιμα, γεγονός που τις καθιστά ελκυστικό θεραπευτικό στόχο ³¹³. Για παράδειγμα, μία DNA μεθυλατρανσφεράση, όπως επίσης η σουλφοραφάνη, ένας αναστολέας αποακετυλασών τάξης II, φαίνεται να ενισχύουν τη διαφοροποίηση των δορυφόρων κυττάρων των μυών καταστέλλοντας το μονοπάτι σηματοδότησης της μυστατίνης ³¹⁴. Οι sirtuins επίσης ρυθμίζουν πολλαπλούς επιγενετικούς συνενεργοποιητές και οι θετικές πλειοτροπικές τους δράσεις γενικότερα στην υγεία τις καθιστούν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο ^{315,316}.

7.1. Αναστολείς αποακετυλασών και θεραπεία της καρκινικής καχεξίας

Οι αναστολείς αποακετυλασών αποτελούν ένα παράδειγμα φαρμακολογικής παρέμβασης στη χρωματίνη και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για θεραπευτικό σκοπό. Έχει δειχθεί ότι έκθεση των μυοβλαστών στους αναστολείς αποακετυλασών οδηγεί σε υπερακετυλίωση του *MyoD* και των ιστονών που βρίσκονται γύρω από τα σημεία πρόσδεσης του *MyoD*, οδηγώντας στην πρόιμη μεταγραφή μυϊκών γονιδίων και στο σχηματισμό υπερπυρηνωμένων μυοσωλήνων αυξημένου μεγέθους ³¹⁷. Ένας πιθανός στόχος των αναστολέων αποακετυλασών είναι το γονίδιο της φολιστατίνης ³¹⁸. Η φολιστατίνη, είναι φυσιολογικός ανταγωνιστής της μυστατίνης, η οποία είναι αρνητικός ρυθμιστής της μυϊκής μάζας και της μυϊκής αναγέννησης ^{319,320}. Οι μύες που εκτίθενται σε αναστολείς αποακετυλασών εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα φολιστατίνης και σχηματίζουν μυϊκές ίνες μεγαλύτερες από τις κανονικές ³¹⁷. Οι αναστολείς αποακετυλασών χρησιμοποιούνται ήδη στην κλινική πράξη και επομένως θα ήταν χρήσιμοι στην φαρμακολογική τροποποίηση της μυϊκής μάζας ^{321,322}. Μελέτες σε μοντέλα ποντικών με νευρομυϊκές παθήσεις έδειξαν ότι η αναστολή της μυστατίνης οδηγεί τα MDX ποντίκια σε δυστροφικό φαινότυπο ^{323,324}.

Ο αναστολέας της HDAC AR-42 (Arno Therapeutics, Inc.) είναι αποτελεσματικός στη θεραπεία της καρκινικής καχεξίας, όπως έχει φανεί στο μοντέλο αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου ποντικών C26 ³²⁵. Συγκεκριμένα, η απώλεια μυϊκής μάζας που επάγεται από την καχεξία μειώθηκε και η μείωση αυτή σχετίστηκε με καταστολή προκαχεκτικών παραγόντων, όπως IL-6, FoxO1, και E3 λιγάσες, atrogin-1 και MuRF1. Βασισμένοι στους διαφορετικούς τρόπους δράσης, συνδύασαν την αναστολή της HDAC με έναν αναβολικό παράγοντα GTx-024 (enobosarm; GTx, Inc.), ο οποίος είναι μη στεροειδής επιλεκτικός ρυθμιστής του υποδοχέα των ανδρογόνων και έχει δείξει αναβολική δραστηριότητα στους μύς. Ενώ η μονοθεραπεία με GTx-024 ήταν αναποτελεσματική στη διατήρηση του σωματικού βάρους και της μάζας οπίσθιων άκρων σε ποντίκια C-26 με όγκο, όταν συνδυάστηκε με τον αναστολέα AR-42 η απώλεια βάρους και μάζας σκελετικών μυών λόγω καχεξίας ήταν σαφώς μικρότερη. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και στο συνδυασμό του AR-42 με διϋδροτεστοστερόνη ³²⁶. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε μοντέλο καρκίνου πνεύμονα, καθιστώντας τον αναστολέα AR-42 μία υποσχόμενη θεραπεία για την καρκινική καχεξία ³²⁷.

Ένας επιγενετικός ρυθμιστής της μυϊκής μάζας που έχει αναγνωριστεί είναι η πρωτεΐνη BRD4 (bromodomain and extra-terminal domain, BET). Χρησιμοποιώντας ένα rap-BET αναστολέα (+)-JQ1 οι Segatto et al. έδειξαν ότι ποντίκια που έχουν όγκο προστατεύονται από την απώλεια βάρους, μυϊκού και λιπώδους ιστού. Επιπλέον, ο αναστολέας (+)-JQ1 αύξησε την επιβίωση των ποντικών, χωρίς να επηρεάσει άμεσα την ανάπτυξη του όγκου. Επίσης έδειξαν ότι οι BET πρωτεΐνες απαιτούνται για την πυρηνική σηματοδότηση του μονοπατιού AMPK που εξαρτάται από την IL-6 και συγκλίνει στον μεταγραφικό παράγοντα FoxO3, καθιστώντας τις υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο για την καρκινική καχεξία ³²⁸.

7.2. Τα miRNAs στη θεραπεία της καχεξίας

Το πλεονέκτημα των θεραπευτικών προσεγγίσεων με miRNAs διαταραχών με πολυπαραγοντικό υπόβαθρο σε σχέση με τη γονιδιακή θεραπεία έγκειται στη δυνατότητα των miRNAs να ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων ταυτόχρονα. Τα miRNAs έχουν παρόμοιο μηχανισμό δράσης με αυτό των μικρών παρεμβαλλόμενων RNA, όπως το Nusinersen για τη θεραπεία της νωτιαίας μυϊκής ατροφίας και το

Patisiran για τη θεραπεία της κληρονομούμενης αμυλοείδωσης προκαλούμενης από τρανσθυρετίνη, τα οποία προσδένονται στο mRNA με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του mRNA^{329,330}. Ενώ η στόχευση πολλών γονιδίων μέσω miRNAs μπορεί να έχει και δράσεις εκτός στόχου, επειδή είναι παρόμοια με τις παραδοσιακές θεραπείες στόχευσης μεμονωμένων γονιδίων, δεν αποκλείουν τα miRNAs από τις μελλοντικές θεραπείες³³⁰.

Σήμερα δεν χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη φάρμακα με miRNAs για τη θεραπεία της καχεξίας, αλλά βρίσκονται σε εξέλιξη κλινικές μελέτες φάσης I και II (NCT02508090, NCT03603431, NCT03373786) οι οποίες διερευνούν θεραπευτικές προσεγγίσεις βασισμένες σε miRNAs για τον καρκίνο, καρδιαγγειακά νοσήματα και νόσους του εγκεφάλου³³¹.

Το αμυλοειδές ορού 1 και 2 (SAA) είναι κλασικές απολιποπρωτεΐνες που παράγονται κυρίως από το ήπαρ και επάγονται σε απόκριση σε φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, ενώ συμβάλλει και στην απώλεια ιστού *in vitro*. Σε λιποκύτταρα 3T3-L1 και μυοσωλήνες C2C12 που επέδρασαν με ανασυνδυασμένο SAA1, βρέθηκε σημαντική μείωση της διαμέτρου των μυοσωλήνων, χαρακτηριστικό της ατροφίας, ενώ ο ρυθμός λιπόλυσης παρέμεινε αμετάβλητος. Όταν ποντίκια C26 με καρκίνο ενέθηκαν με AAV-miRNA που στοχεύει τα SAA1/2, αν και παρατηρήθηκε 4 φορές μείωση των επιπέδων SAA1/2 στον ορό, τα επίπεδα ήταν ακόμα υψηλά και δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην εξέλιξη της καχεξίας. Προχωρώντας σε ανάλυση ηπατο-ειδικού RNA και πρωτεομική ανάλυση των C26 καχεκτικών ποντικών, παρατηρήθηκε μία υψηλού βαθμού αλληλοεπικάλυψη, υποδεικνύοντας ότι ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών αυτών που εκκρίνονται από τα ηπατοκύτταρα και η διερεύνησή τους ως προς τις ιδιότητες λιπόλυσης και μεσολάβησης της ατροφίας των μυοσωλήνων μπορεί να προετοιμάσει το έδαφος για νέες στρατηγικές θεραπείας³³².

Σε μελέτη που περιγράφεται παραπάνω, αναφέρθηκε ότι το miR-21 εκκρίνεται μέσω εξωκυτταρικών κυστιδίων από καρκινικά κύτταρα πνεύμονα και παγκρέατος και προάγουν τον κυτταρικό θάνατο που εξαρτάται από τη JNK μέσω πρόσδεσης σε υποδοχέα TLR7 σε μυοβλάστες ποντικού. Η ίδια ομάδα μελέτησε τον ανταγωνιστή των TLR7, 8, και 9, IMO-8503, στην αναστολή της καρκινικής καχεξίας. Χρησιμοποιώντας εξωκυττάρια κυστίδια που είχαν απομονωθεί από καρκινικά κύτταρα πνεύμονα και παγκρέατος και δείγματα πλάσματος ασθενών έδειξαν ότι ο

IMO-8503 μπορεί να αναστείλει τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από τα κυκλοφορούντα miRNAs χωρίς σημαντική τοξικότητα. Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του ανταγωνιστή σε μοντέλο ποντικού με καρκίνωμα Lewis πνεύμονα με καχεξία εξασθένησε πολλά από τα χαρακτηριστικά της καχεξίας, όπως την έκφραση των Pax7 και caspase-3 και την διάσπαση της PARP στους σκελετικούς μυς, και απέτρεψε την απώλεια μυϊκής μάζας σε ποντίκια που είχαν όγκους. Επιπλέον, ο IMO-8503 ελάττωσε τον επαγόμενο από τα κυκλοφορούντα miRNAs κυτταρικό θάνατο σε ανθρώπινους μυοβλάστες, καθιστώντας τον μία υποψήφια μελλοντική θεραπεία για την καρκινική καχεξία ³³³.

Μία άμεση προσέγγιση στη στόχευση μονοπατιών που σχετίζονται με την καχεξία μέσω θεραπευτικών που βασίζονται σε miRNAs θα μπορούσε να αποκαταστήσει την ομοιόσταση χρονίως απορρυθμισμένων δικτύων και να προδιαθέσει τους μυς σε θετική ανταπόκριση σε θεραπεία με άσκηση και διατροφή. Επομένως, τα miRNAs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και επικουρικά, για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των ήδη υπαρχουσών θεραπειών ³³⁴.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η καρκινική καχεξία έχει επιπτώσεις στην ποιότητα ζωής των ασθενών, εξαιτίας της σοβαρής αδυναμίας που αισθάνονται, μειώνει την ανταπόκριση των ασθενών στην αντικαρκινική θεραπεία και επομένως αυξάνει τη νοσηρότητα και τη θνητότητα, ενώ τα χημειοθεραπευτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως επιδεινώνουν την καρκινική καχεξία. Η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός των μοριακών μονοπατιών που οδηγούν στην καχεξία είναι πολύ σημαντικά για την κατανόηση της παθογένειας και την αναγνώριση νέων θεραπευτικών στόχων και βιοδεικτών.

Δυστυχώς, οι βιοδείκτες που έχουν προταθεί μέχρι σήμερα είναι γενικευμένοι και δεν είναι έτοιμοι για την εφαρμογή τους στην κλινική πράξη. Επιπλέον, κάποιοι από τους προτεινόμενους βιοδείκτες είναι πρωτεΐνες (π.χ. προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και προϊόντα αποικοδόμησης των μυών) και η ανίχνευση πρωτεϊνών για τη χρήση τους ως βιοδείκτες μπορεί να κοστίζει περισσότερο σε χρήμα και χρόνο, εξαιτίας των πολύπλοκων δομών τους και την ανάγκη για την ανεύρεση μεθόδων ανίχνευσης υψηλής ακριβείας ή την παραγωγή νέων αντισωμάτων. Από την άλλη πλευρά, τα ncRNAs, όπως τα microRNAs φαίνεται να ρυθμίζουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην παθογένεια της καρκινικής καχεξίας. Η απορρυθμισμένη έκφραση πολλών microRNAs έχει παρατηρηθεί σε καχεκτικά ποντίκια και ασθενείς, υποδεικνύοντας τη συσχέτισή τους με διαφορετικά χαρακτηριστικά της καχεξίας και τη χρήση τους ως πιθανών βιοδεικτών ή θεραπευτικών στόχων. Η χρήση νουκλεϊκών οξέων ως βιοδεικτών (π.χ. microRNAs) απαιτεί λιγότερο χρόνο και χρήματα, καθώς οι τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται σήμερα για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων μπορούν εύκολα να πραγματοποιηθούν.

Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης της καρκινικής καχεξίας είναι η θεραπεία του καρκίνου. Ωστόσο, αυτό δεν είναι πάντα εφικτό, όπως για παράδειγμα σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου που σχετίζονται με την καρκινική καχεξία (π.χ. παγκρεατικός καρκίνος). Από την άλλη πλευρά, πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η στοχευμένη απαλοιφή των σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με την προ-καχεξία επιμηκύνει την επιβίωση, ακόμα και παρά την συνεχιζόμενη αύξηση του όγκου. Επιπλέον, η καχεξία αυξάνει τον κίνδυνο επιπλοκών και τοξικοτήτων, αυξάνει την ευαισθησία σε μολύνσεις, προκαλεί αδυναμία και αυξάνει τον χρόνο νοσηλείας. Έτσι, η αντιμετώπιση της καρκινικής καχεξίας βελτιώνει όχι μόνο την ποιότητα ζωής των ασθενών, αλλά και την επιβίωσή τους. Αρκετές θεραπευτικές παρεμβάσεις έχουν

δοκιμαστεί αλλά οι θεραπευτικές επιλογές παραμένουν περιορισμένες, ίσως επειδή οι ασθενείς που περιλαμβάνονται στις μελέτες ανήκουν κυρίως στο στάδιο της δυσίατης καχεξίας. Ο ρόλος των miRNAs, καθώς και κάποιων lncRNAs και circRNAs, στην παθογένεια της καρκινικής καχεξίας αναδεικνύεται ολοένα και πιο σημαντικός, και αποτελεί υποσχόμενο πεδίο στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση της καρκινικής καχεξίας. Επίσης, η καχεξία είναι ένα πολυπαραγοντικό σύνδρομο και πιθανόν μία συνδυαστική θεραπευτική προσέγγιση να ήταν πιο αποτελεσματική στους καχεκτικούς ασθενείς.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Rosenberg, I. H. Sarcopenia: Origins and Clinical Relevance. *J. Nutr.* **127**, 990S-991S (1997).
2. Cruz-Jentoft, A. J. *et al.* Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing* **48**, 16–31 (2019).
3. Cruz-Jentoft, A. J. *et al.* Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing* **39**, 412–423 (2010).
4. Dodds, R. M. *et al.* Grip strength across the life course: Normative data from twelve British studies. *PLoS One* **9**, (2014).
5. Cruz-Jentoft, A. J. & Sayer, A. A. Sarcopenia. *The Lancet* vol. 393 2636–2646 (2019).
6. Barazzoni, R. *et al.* Sarcopenic Obesity: Time to Meet the Challenge. *Obesity Facts* vol. 11 294–305 (2018).
7. Scott, D. *et al.* Sarcopenic obesity and dynapenic obesity: 5-year associations with falls risk in middle-aged and older adults. *Obesity* **22**, 1568–1574 (2014).
8. Batsis, J. A. & Villareal, D. T. Sarcopenic obesity in older adults: aetiology, epidemiology and treatment strategies. *Nature Reviews Endocrinology* vol. 14 513–537 (2018).
9. Cava, E., Yeat, N. C. & Mittendorfer, B. Preserving Healthy Muscle during Weight Loss. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* **8**, 511–519 (2017).
10. Hamer, M. & O'Donovan, G. Sarcopenic obesity, weight loss, and mortality: The English Longitudinal Study of Ageing. *Am. J. Clin. Nutr.* **106**, 125–129 (2017).
11. Fujishima, I. *et al.* Sarcopenia and dysphagia: Position paper by four professional organizations. *Geriatr. Gerontol. Int.* **19**, 91–97 (2019).
12. Roberts, H. C. *et al.* A review of the measurement of grip strength in clinical and epidemiological studies: Towards a standardised approach. *Age and Ageing* vol. 40 423–429 (2011).
13. Manini, T. M. & Clark, B. C. Editor's Choice: Special Issue on Muscle

- Function and Sarcopenia: Dynapenia and Aging: An Update. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **67A**, 28 (2012).
14. Buckinx, F. *et al.* Pitfalls in the measurement of muscle mass: a need for a reference standard. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **9**, 269–278 (2018).
 15. Stringer, H. J. & Wilson, D. The Role of Ultrasound as a Diagnostic Tool for Sarcopenia. *The Journal of frailty & aging* vol. 7 258–261 (2018).
 16. Correa-de-Araujo, R. *et al.* The Need for Standardized Assessment of Muscle Quality in Skeletal Muscle Function Deficit and Other Aging-Related Muscle Dysfunctions: A Symposium Report. *Frontiers in Physiology* vol. 8 (2017).
 17. Shankaran, M. *et al.* Dilution of oral D 3 -Creatine to measure creatine pool size and estimate skeletal muscle mass: development of a correction algorithm. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **9**, 540–546 (2018).
 18. Thomas, D. R. Loss of skeletal muscle mass in aging: Examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia. *Clinical Nutrition* vol. 26 389–399 (2007).
 19. Hilmi, M. *et al.* Body composition and sarcopenia: The next-generation of personalized oncology and pharmacology? *Pharmacology and Therapeutics* vol. 196 135–159 (2019).
 20. Fearon, K. *et al.* Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. *The Lancet Oncology* vol. 12 489–495 (2011).
 21. Baracos, V. E., Martin, L., Korc, M., Guttridge, D. C. & Fearon, K. C. H. Cancer-associated cachexia. *Nature Reviews Disease Primers* vol. 4 (2018).
 22. Cesari, M., Calvani, R. & Marzetti, E. Frailty in Older Persons. *Clinics in Geriatric Medicine* vol. 33 293–303 (2017).
 23. Fried, L. P. *et al.* Frailty in Older Adults: Evidence for a Phenotype. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **56**, M146–M157 (2001).
 24. Mayhew, A. J. *et al.* The prevalence of sarcopenia in community-dwelling older adults, an exploration of differences between studies and within definitions: a systematic review and meta-analyses. *Age Ageing* **48**, 48–56

- (2019).
25. Churilov, I., Churilov, L., MacIsaac, R. J. & Ekinci, E. I. Systematic review and meta-analysis of prevalence of sarcopenia in post acute inpatient rehabilitation. *Osteoporosis International* vol. 29 805–812 (2018).
 26. Gielen, E. *et al.* Endocrine determinants of incident sarcopenia in middle-aged and elderly European men. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **6**, 242–252 (2015).
 27. Yu, R. *et al.* Incidence, reversibility, risk factors and the protective effect of high body mass index against sarcopenia in community-dwelling older Chinese adults. *Geriatr. Gerontol. Int.* **14**, 15–28 (2014).
 28. Dodds, R. M. *et al.* Prevalence and incidence of sarcopenia in the very old: findings from the Newcastle 85+ Study. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **8**, 229–237 (2017).
 29. Ciciliot, S., Rossi, A. C., Dyar, K. A., Blaauw, B. & Schiaffino, S. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* vol. 45 2191–2199 (2013).
 30. Verdijk, L. B. *et al.* Satellite cells in human skeletal muscle; From birth to old age. *Age (Omaha)*. **36**, 545–557 (2014).
 31. Zamboni, M., Rubele, S. & Rossi, A. P. Sarcopenia and obesity. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* vol. 22 13–19 (2019).
 32. Picca, A. *et al.* Update on mitochondria and muscle aging: all wrong roads lead to sarcopenia. *Biol. Chem.* **399**, 421–436 (2018).
 33. Ziaaldini, M. M., Marzetti, E., Picca, A. & Murlasits, Z. Biochemical pathways of sarcopenia and their modulation by physical exercise: A narrative review. *Frontiers in Medicine* vol. 4 (2017).
 34. Manini, T. M., Hong, S. L. & Clark, B. C. Aging and muscle: A neuron's perspective. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* vol. 16 21–26 (2013).
 35. Brown, D. M. & Goljanek-Whysall, K. MicroRNAs: Modulators of the underlying pathophysiology of sarcopenia? *Ageing Research Reviews* vol. 24

- 263–273 (2015).
36. Bonewald, L. Use it or lose it to age: A review of bone and muscle communication. *Bone* **120**, 212–218 (2019).
 37. Vinel, C. *et al.* The exerkinin apelin reverses age-associated sarcopenia. *Nat. Med.* **24**, 1360–1371 (2018).
 38. Aagaard, P. *et al.* A mechanism for increased contractile strength of human pennate muscle in response to strength training: Changes in muscle architecture. *J. Physiol.* **534**, 613–623 (2001).
 39. Meng, S. J. & Yu, L. J. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 11 1509–1526 (2010).
 40. Sakuma, K. & Yamaguchi, A. Novel intriguing strategies attenuating to sarcopenia. *Journal of Aging Research* vol. 2012 (2012).
 41. Toth, M. J., Ades, P. A., Tischler, M. D., Tracy, R. P. & LeWinter, M. M. Immune activation is associated with reduced skeletal muscle mass and physical function in chronic heart failure. *Int. J. Cardiol.* **109**, 179–187 (2006).
 42. Chung, H. Y. *et al.* Molecular inflammation: Underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews* vol. 8 18–30 (2009).
 43. Chabi, B. *et al.* Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell* **7**, 2–12 (2008).
 44. Peterson, C. M., Johannsen, D. L. & Ravussin, E. Skeletal muscle mitochondria and aging: A review. *Journal of Aging Research* vol. 2012 (2012).
 45. Marzetti, E. & Leeuwenburgh, C. Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age. *Experimental Gerontology* vol. 41 1234–1238 (2006).
 46. Whitman, S. A., Wacker, M. J., Richmond, S. R. & Godard, M. P. Contributions of the ubiquitin-proteasome pathway and apoptosis to human skeletal muscle wasting with age. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **450**, 437–446 (2005).
 47. Cavanagh, M. M., Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. Chronic inflammation and

- aging: DNA damage tips the balance. *Current Opinion in Immunology* vol. 24 488–493 (2012).
48. Jylhävä, J. *et al.* Characterization of the role of distinct plasma cell-free DNA species in age-associated inflammation and frailty. *Aging Cell* **12**, 388–397 (2013).
 49. Mijnders, D. M. *et al.* Physical activity and incidence of sarcopenia: The population-based AGES-Reykjavik Study. *Age Ageing* **45**, 614–621 (2016).
 50. Prado, C. M. M., Wells, J. C. K., Smith, S. R., Stephan, B. C. M. & Siervo, M. Sarcopenic obesity: A Critical appraisal of the current evidence. *Clinical Nutrition* vol. 31 583–601 (2012).
 51. Johnson Stoklossa, C. A. *et al.* Prevalence of sarcopenic obesity in adults with class II/III obesity using different diagnostic criteria. *J. Nutr. Metab.* **2017**, (2017).
 52. Kalinkovich, A. & Livshits, G. Sarcopenic obesity or obese sarcopenia: A cross talk between age-associated adipose tissue and skeletal muscle inflammation as a main mechanism of the pathogenesis. *Ageing Research Reviews* vol. 35 200–221 (2017).
 53. Barbat-Artigas, S., Pion, C. H., Leduc-Gaudet, J. P., Rolland, Y. & Aubertin-Leheudre, M. Exploring the role of muscle mass, obesity, and age in the relationship between muscle quality and physical function. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **15**, 303.e13-303.e20 (2014).
 54. Newman, A. B. *et al.* Strength and muscle quality in a well-functioning cohort of older adults: The Health, Aging and Body Composition Study. *J. Am. Geriatr. Soc.* **51**, 323–330 (2003).
 55. Tian, S. & Xu, Y. Association of sarcopenic obesity with the risk of all-cause mortality: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Geriatrics and Gerontology International* vol. 16 155–166 (2016).
 56. Cederholm, T. *et al.* ESPEN guidelines on definitions and terminology of clinical nutrition. *Clin. Nutr.* **36**, 49–64 (2017).
 57. Muscaritoli, M. *et al.* Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-

- cachexia: Joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) ‘cachexia-anorexia in chronic wasting diseases’ and ‘nutrition in geriatrics’. *Clin. Nutr.* **29**, 154–159 (2010).
58. Beaudart, C. *et al.* Quality of life and physical components linked to sarcopenia: The SarcoPhAge study. *Exp. Gerontol.* **69**, 103–110 (2015).
 59. Patel, H. P. *et al.* Prevalence of sarcopenia in community-dwelling older people in the UK using the European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) definition: Findings from the Hertfordshire Cohort Study (HCS). *Age Ageing* **42**, 378–384 (2013).
 60. Tsekoura, M., Kastrinis, A., Katsoulaki, M., Billis, E. & Gliatis, J. Sarcopenia and its impact on quality of life. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 987 213–218 (Springer New York LLC, 2017).
 61. Go, S. W., Cha, Y. H., Lee, J. A. & Park, H. S. Association between sarcopenia, bone density, and health-related quality of life in Korean men. *Korean J. Fam. Med.* **34**, 281–288 (2013).
 62. Kull, M., Kallikorm, R. & Lember, M. Impact of a New Sarco-Osteopenia Definition on Health-related Quality of Life in a Population-Based Cohort in Northern Europe. *J. Clin. Densitom.* **15**, 32–38 (2012).
 63. Dent, E. *et al.* International Clinical Practice Guidelines for Sarcopenia (ICFSR): Screening, Diagnosis and Management. *J. Nutr. Heal. Aging* **22**, 1148–1161 (2018).
 64. Peterson, M. D., Rhea, M. R., Sen, A. & Gordon, P. M. Resistance exercise for muscular strength in older adults: A meta-analysis. *Ageing Research Reviews* vol. 9 226–237 (2010).
 65. Peterson, M. D., Sen, A. & Gordon, P. M. Influence of resistance exercise on lean body mass in aging adults: A meta-analysis. *Med. Sci. Sports Exerc.* **43**, 249–258 (2011).
 66. Hita-Contreras, F. *et al.* Effect of exercise alone or combined with dietary supplements on anthropometric and physical performance measures in community-dwelling elderly people with sarcopenic obesity: A meta-analysis

- of randomized controlled trials. *Maturitas* vol. 116 24–35 (2018).
67. Lozano-Montoya, I. *et al.* Nonpharmacological interventions to treat physical frailty and sarcopenia in older patients: A systematic overview – the SENATOR project ONTOP series. *Clinical Interventions in Aging* vol. 12 721–740 (2017).
 68. Vlietstra, L., Hendrickx, W. & Waters, D. L. Exercise interventions in healthy older adults with sarcopenia: A systematic review and meta-analysis. *Australasian Journal on Ageing* vol. 37 169–183 (2018).
 69. Robinson, S. M. *et al.* Does nutrition play a role in the prevention and management of sarcopenia? *Clinical Nutrition* vol. 37 1121–1132 (2018).
 70. Cramer, J. T. *et al.* Impacts of High-Protein Oral Nutritional Supplements Among Malnourished Men and Women with Sarcopenia: A Multicenter, Randomized, Double-Blinded, Controlled Trial. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **17**, 1044–1055 (2016).
 71. Bhasin, S. *et al.* Effect of protein intake on lean body mass in functionally limited older men a randomized clinical trial. *JAMA Intern. Med.* **178**, 530–541 (2018).
 72. J Cruz-Jentoft, A. Beta-hydroxy-beta-methyl butyrate (HMB): From experimental data to clinical evidence in sarcopenia. *Curr. Protein Pept. Sci.* **18**, (2017).
 73. Sanz-Paris, A. *et al.* Role of Oral Nutritional Supplements Enriched with B-hydroxy-B-Methylbutyrate in Maintaining Muscle Function and Improving Clinical Outcomes in Various Clinical Settings. *J. Nutr. Heal. Aging* **22**, 664–675 (2018).
 74. Smith, M. R. *et al.* Sarcopenia during androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **30**, 3271–3276 (2012).
 75. De Spiegeleer, A. *et al.* Pharmacological Interventions to Improve Muscle Mass, Muscle Strength and Physical Performance in Older People: An Umbrella Review of Systematic Reviews and Meta-analyses. *Drugs and Aging* vol. 35 719–734 (2018).

76. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* vol. 144 646–674 (2011).
77. Biswas, A. K. & Acharyya, S. Understanding cachexia in the context of metastatic progression. *Nature Reviews Cancer* (2020) doi:10.1038/s41568-020-0251-4.
78. Doehner, W. & Anker, S. D. Cardiac cachexia in early literature: A review of research prior to Medline. *International Journal of Cardiology* vol. 85 7–14 (2002).
79. Jeejeebhoy, K. N. Malnutrition, fatigue, frailty, vulnerability, sarcopenia and cachexia: Overlap of clinical features. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* vol. 15 213–219 (2012).
80. Kotler, D. P. Cachexia. *Annals of Internal Medicine* vol. 133 622–634 (2000).
81. Evans, W. J. *et al.* Cachexia: A new definition. *Clin. Nutr.* **27**, 793–799 (2008).
82. Fox, K. M., Brooks, J. M., Gandra, S. R., Markus, R. & Chiou, C. F. Estimation of cachexia among cancer patients based on four definitions. *J. Oncol.* (2009) doi:10.1155/2009/693458.
83. Fearon, K. C., Voss, A. C. & Hustead, D. S. Definition of cancer cachexia: Effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 1345–1350 (2006).
84. Bozzetti, F. & Mariani, L. Defining and classifying cancer cachexia: A proposal by the SCRINIO Working Group. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **33**, 361–367 (2009).
85. Tan, B. H. L. & Fearon, K. C. H. Cachexia: Prevalence and impact in medicine. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* vol. 11 400–407 (2008).
86. Dewys, W. D. *et al.* Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am. J. Med.* **69**, 491–7 (1980).
87. Teunissen, S. C. C. M. *et al.* Symptom Prevalence in Patients with Incurable

- Cancer: A Systematic Review. *Journal of Pain and Symptom Management* vol. 34 94–104 (2007).
88. Lees, J. Incidence of weight loss in head and neck cancer patients on commencing radiotherapy treatment at a regional oncology centre. *Eur. J. Cancer Care (Engl)*. **8**, 133–136 (1999).
 89. Bachmann, J. *et al.* Cachexia worsens prognosis in patients with resectable pancreatic cancer. *J. Gastrointest. Surg.* **12**, 1193–1201 (2008).
 90. Sun, L., Quan, X. Q. & Yu, S. An Epidemiological Survey of Cachexia in Advanced Cancer Patients and Analysis on Its Diagnostic and Treatment Status. *Nutr. Cancer* **67**, 1056–1062 (2015).
 91. Kazemi-Bajestani, S. M. R., Becher, H., Fassbender, K., Chu, Q. & Baracos, V. E. Concurrent evolution of cancer cachexia and heart failure: Bilateral effects exist. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* vol. 5 95–104 (2014).
 92. Antoun, S. *et al.* Association of skeletal muscle wasting with treatment with sorafenib in patients with advanced renal cell carcinoma: Results from a placebo-controlled study. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1054–1060 (2010).
 93. Johns, N. *et al.* New genetic signatures associated with cancer cachexia as defined by low skeletal muscle index and weight loss. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **8**, 122–130 (2017).
 94. World Health Organization. WHO : Global Database on Body Mass Index. https://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html (2004).
 95. Obesity and overweight. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
 96. Martin, L. *et al.* Diagnostic criteria for the classification of cancer-associated weight loss. *J. Clin. Oncol.* **33**, 90–99 (2015).
 97. Martin, L. *et al.* Cancer cachexia in the age of obesity: Skeletal muscle depletion is a powerful prognostic factor, independent of body mass index. *J. Clin. Oncol.* **31**, 1539–1547 (2013).
 98. Demark-Wahnefried, W., Campbell, K. L. & Hayes, S. C. Weight management

- and its role in breast cancer rehabilitation. *Cancer* vol. 118 2277–2287 (2012).
99. Kubrak, C. *et al.* Clinical determinants of weight loss in patients receiving radiation and chemoirradiation for head and neck cancer: A prospective longitudinal view. *Head Neck* **35**, 695–703 (2013).
 100. Silver, H. J., Dietrich, M. S. & Murphy, B. A. Changes in body mass, energy balance, physical function, and inflammatory state in patients with locally advanced head and neck cancer treated with concurrent chemoradiation after low-dose induction chemotherapy. *Head Neck* **29**, 893–900 (2007).
 101. Baracos, V. E. Skeletal muscle anabolism in patients with advanced cancer. *The Lancet Oncology* vol. 16 13–14 (2015).
 102. van Dijk, D. P. J. *et al.* Effects of oral meal feeding on whole body protein breakdown and protein synthesis in cachectic pancreatic cancer patients. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **6**, 212–221 (2015).
 103. Engelen, M. P. K. J., Klimberg, V. S., Allasia, A. & Deutz, N. E. P. Presence of early stage cancer does not impair the early protein metabolic response to major surgery. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **8**, 447–456 (2017).
 104. Engelen, M. P. K. J., Safar, A. M., Bartter, T., Koeman, F. & Deutz, N. E. P. High anabolic potential of essential amino acid mixtures in advanced nonsmall cell lung cancer. *Ann. Oncol.* **26**, 1960–1966 (2015).
 105. Hall, K. D. & Baracos, V. E. Computational modeling of cancer cachexia. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* vol. 11 214–221 (2008).
 106. Friesen, D. E., Baracos, V. E. & Tuszynski, J. A. Modeling the energetic cost of cancer as a result of altered energy metabolism: Implications for cachexia. *Theor. Biol. Med. Model.* **12**, (2015).
 107. Beck, S. A. & Tisdale, M. J. Effect of cancer cachexia on triacylglycerol/fatty acid substrate cycling in white adipose tissue. in *Lipids* vol. 39 1187–1189 (Lipids, 2004).
 108. Kir, S. & Spiegelman, B. M. Cachexia and Brown Fat: A Burning Issue in Cancer. *Trends in Cancer* vol. 2 461–463 (2016).

109. Petruzzelli, M. *et al.* A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. *Cell Metab.* **20**, 433–447 (2014).
110. Vanderveen, B. N., Fix, D. K. & Carson, J. A. Disrupted Skeletal Muscle Mitochondrial Dynamics, Mitophagy, and Biogenesis during Cancer Cachexia: A Role for Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* vol. 2017 (2017).
111. Zhang, G. *et al.* Tumor induces muscle wasting in mice through releasing extracellular Hsp70 and Hsp90. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
112. Murphy, K. T. The pathogenesis and treatment of cardiac atrophy in cancer cachexia. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* vol. 310 H466–H477 (2016).
113. Tashjian, A. H. Role of Prostaglandins in the Production of Hypercalcemia by Tumors. *Cancer Res.* **38**, 4138–4141 (1978).
114. Fearon, K. C. H., Glass, D. J. & Guttridge, D. C. Cancer cachexia: Mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell Metabolism* vol. 16 153–166 (2012).
115. Loomans, H. A. *et al.* Intertwining of activin a and TGF β signaling: Dual roles in cancer progression and cancer cell invasion. *Cancers* vol. 7 70–91 (2014).
116. Chen, J. L. *et al.* Differential effects of IL6 and activin A in the development of cancer-associated cachexia. *Cancer Res.* **76**, 5372–5382 (2016).
117. Togashi, Y. *et al.* Activin signal promotes cancer progression and is involved in cachexia in a subset of pancreatic cancer. *Cancer Lett.* **356**, 819–827 (2015).
118. Loumaye, A. *et al.* Role of activin A and myostatin in human cancer cachexia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, 2030–2038 (2015).
119. Johnston, A. J. *et al.* Targeting of Fn14 Prevents Cancer-Induced Cachexia and Prolongs Survival. *Cell* **162**, 1365–1378 (2015).
120. Mittal, A. *et al.* The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *J. Cell Biol.* **188**, 833–849 (2010).
121. Sato, S., Ogura, Y., Tajrishii, M. M. & Kumar, A. Elevated levels of TWEAK

- in skeletal muscle promote visceral obesity, insulin resistance, and metabolic dysfunction. *FASEB J.* **29**, 988–1002 (2015).
122. Gomes, M. D., Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Navon, A. & Goldberg, A. L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 14440–14445 (2001).
 123. Bodine, S. C. *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science (80-.)*. **294**, 1704–1708 (2001).
 124. Clarke, B. A. *et al.* The E3 Ligase MuRF1 Degrades Myosin Heavy Chain Protein in Dexamethasone-Treated Skeletal Muscle. *Cell Metab.* **6**, 376–385 (2007).
 125. Acharyya, S. *et al.* Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *J. Clin. Invest.* **114**, 370–378 (2004).
 126. Milan, G. *et al.* Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
 127. Sandri, M. Protein breakdown in muscle wasting: Role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* vol. 45 2121–2129 (2013).
 128. Song, Y. H. *et al.* Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin II-induced skeletal muscle wasting. *J. Clin. Invest.* **115**, 451–458 (2005).
 129. Sartori, R. *et al.* BMP signaling controls muscle mass. *Nat. Genet.* **45**, 1309–1321 (2013).
 130. Zimmers, T. A., Fishel, M. L. & Bonetto, A. STAT3 in the systemic inflammation of cancer cachexia. *Seminars in Cell and Developmental Biology* vol. 54 28–41 (2016).
 131. Zhang, G., Lin, R. K., Kwon, Y. T. & Li, Y. P. Signaling mechanism of tumor cell-induced up-regulation of E3 ubiquitin ligase UBR2. *FASEB J.* **27**, 2893–2901 (2013).
 132. Marchildon, F., Lamarche, É., Lala-Tabbert, N., St-Louis, C. & Wiper-

- Bergeron, N. Expression of CCAAT/enhancer binding protein beta in muscle satellite cells inhibits myogenesis in cancer cachexia. *PLoS One* **10**, (2015).
133. Sun, R. *et al.* Valproic acid attenuates skeletal muscle wasting by inhibiting C/EBP β -regulated atrogin1 expression in cancer cachexia. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **311**, C101–C115 (2016).
134. Guttridge, D. C., Mayo, M. W., Madrid, L. V., Wang, C. Y. & Baldwin, J. NF- κ B-induced loss of MyoD messenger RNA: Possible role in muscle decay and cachexia. *Science (80-.)*. **289**, 2363–2365 (2000).
135. Cai, D. *et al.* IKK β /NF- κ B activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* **119**, 285–298 (2004).
136. Silva, K. A. S. *et al.* Inhibition of Stat3 activation suppresses caspase-3 and the ubiquitin-proteasome system, leading to preservation of muscle mass in cancer cachexia. *J. Biol. Chem.* **290**, 11177–11187 (2015).
137. Mueller, T. C., Bachmann, J., Prokopchuk, O., Friess, H. & Martignoni, M. E. Molecular pathways leading to loss of skeletal muscle mass in cancer cachexia - can findings from animal models be translated to humans? *BMC Cancer* vol. 16 (2016).
138. Lindmark, L., Svaninger, G., Bennegård, K., Edén, E. & Lundholm, K. Flux of Amino Acids across the Leg in Weight-losing Cancer Patients. *Cancer Res.* **44**, 386–393 (1984).
139. Dejong, C. H. C. *et al.* Systemic inflammation correlates with increased expression of skeletal muscle ubiquitin but not uncoupling proteins in cancer cachexia. *Oncol. Rep.* **14**, 257–263 (2005).
140. Johns, N. *et al.* New genetic signatures associated with cancer cachexia as defined by low skeletal muscle index and weight loss. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **8**, 122–130 (2017).
141. Gallagher, I. J. *et al.* Suppression of skeletal muscle turnover in cancer cachexia: Evidence from the transcriptome in sequential human muscle biopsies. *Clin. Cancer Res.* **18**, 2817–2827 (2012).
142. Schmitt, T. L. *et al.* Activity of the Akt-dependent anabolic and catabolic

- pathways in muscle and liver samples in cancer-related cachexia. *J. Mol. Med.* **85**, 647–654 (2007).
143. Penna, F. *et al.* Muscle atrophy in experimental cancer cachexia: Is the IGF-1 signaling pathway involved? *Int. J. Cancer* **127**, 1706–1717 (2010).
144. Stephens, N. A. *et al.* Evaluating potential biomarkers of cachexia and survival in skeletal muscle of upper gastrointestinal cancer patients. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **6**, 53–61 (2015).
145. Burfeind, K. G., Michaelis, K. A. & Marks, D. L. The central role of hypothalamic inflammation in the acute illness response and cachexia. *Seminars in Cell and Developmental Biology* vol. 54 42–52 (2016).
146. Grossberg, A. J. *et al.* Arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons mediate the acute anorectic actions of leukemia inhibitory factor via gp130. *Endocrinology* **151**, 606–616 (2010).
147. Bodnar, R. J. *et al.* Mediation of Anorexia by Human Recombinant Tumor Necrosis Factor through a Peripheral Action in the Rat. *Cancer Res.* **49**, 6280–6284 (1989).
148. Braun, T. P. *et al.* Central nervous system inflammation induces muscle atrophy via activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J. Exp. Med.* **208**, 2449–2463 (2011).
149. DeBoer, M. D. Ghrelin and cachexia: Will treatment with GHSR-1a agonists make a difference for patients suffering from chronic wasting syndromes? *Molecular and Cellular Endocrinology* vol. 340 97–105 (2011).
150. Fouladiun, M. *et al.* Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care - Correlations with food intake, metabolism, exercise capacity, and hormones. *Cancer* **103**, 2189–2198 (2005).
151. Agustsson, T. *et al.* Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer Res.* **67**, 5531–5537 (2007).
152. Das, S. K. *et al.* Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. *Science (80-.).* **333**, 233–238 (2011).

153. Kir, S. *et al.* Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. *Nature* **513**, 100–104 (2014).
154. Camargo, R. G. *et al.* Nf- κ b65 and expression of its pro-inflammatory target genes are upregulated in the subcutaneous adipose tissue of cachectic cancer patients. *Nutrients* **7**, 4465–4479 (2015).
155. Neves, R. X. *et al.* White adipose tissue cells and the progression of cachexia: Inflammatory pathways. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **7**, 193–203 (2016).
156. Zimmermann, R. *et al.* Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science (80-.)*. **306**, 1383–1386 (2004).
157. Rohm, M. *et al.* An AMP-activated protein kinase-stabilizing peptide ameliorates adipose tissue wasting in cancer cachexia in mice. *Nat. Med.* **22**, 1120–1130 (2016).
158. Fearon, K., Arends, J. & Baracos, V. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. *Nature Reviews Clinical Oncology* vol. 10 90–99 (2013).
159. Op Den Kamp, C. M., Langen, R. C., Haegens, A. & Schols, A. M. Muscle atrophy in cachexia: Can dietary protein tip the balance? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* vol. 12 611–616 (2009).
160. Nicolini, A. *et al.* Malnutrition, anorexia and cachexia in cancer patients: A mini-review on pathogenesis and treatment. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 67 807–817 (2013).
161. Engelen, M. P. K. J., Van Der Meij, B. S. & Deutz, N. E. P. Protein anabolic resistance in cancer: Does it really exist? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* vol. 19 39–47 (2016).
162. Deutz, N. E. P. *et al.* Muscle protein synthesis in cancer patients can be stimulated with a specially formulated medical food. *Clin. Nutr.* **30**, 759–768 (2011).
163. Argilés, J. M., Busquets, S., López-Soriano, F. J., Costelli, P. & Penna, F. Are there any benefits of exercise training in cancer cachexia? *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* vol. 3 73–76 (2012).

164. Aoyagi, T., Terracina, K. P., Raza, A., Matsubara, H. & Takabe, K. Cancer cachexia, mechanism and treatment. *World J. Gastrointest. Oncol.* **7**, 17 (2015).
165. Ali, S. & Garcia, J. M. Sarcopenia, cachexia and aging: Diagnosis, mechanisms and therapeutic options - A mini-review. *Gerontology* vol. 60 294–305 (2014).
166. Madeddu, C. *et al.* Randomized phase III clinical trial of a combined treatment with carnitine + celecoxib ± megestrol acetate for patients with cancer-related anorexia/cachexia syndrome. *Clin. Nutr.* **31**, 176–182 (2012).
167. Sánchez-Lara, K. *et al.* Effects of an oral nutritional supplement containing eicosapentaenoic acid on nutritional and clinical outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer: RANDOMISED trial. *Clin. Nutr.* **33**, 1017–1023 (2014).
168. Peterson, S. J. & Mozer, M. Differentiating Sarcopenia and Cachexia among Patients with Cancer. *Nutrition in Clinical Practice* vol. 32 30–39 (2017).
169. Minami, S., Ihara, S., Nishimatsu, K. & Komuta, K. Low Body Mass Index Is an Independent Prognostic Factor in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer Treated With Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor. *World J. Oncol.* **10**, 187–198 (2019).
170. Yang, M., Shen, Y., Tan, L. & Li, W. Prognostic Value of Sarcopenia in Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Chest* **156**, 101–111 (2019).
171. Fukushima, H., Takemura, K., Suzuki, H. & Koga, F. Impact of sarcopenia as a prognostic biomarker of bladder cancer. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 (2018).
172. Fukushima, H. *et al.* Posttherapeutic skeletal muscle mass recovery predicts favorable prognosis in patients with advanced urothelial carcinoma receiving first-line platinum-based chemotherapy. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **36**, 156.e9-156.e16 (2018).
173. Deng, C. Y. *et al.* Progressive sarcopenia in patients with colorectal cancer predicts survival. *Am. J. Roentgenol.* **210**, 526–532 (2018).
174. Lee, J. S., Kim, Y. S., Kim, E. Y. & Jin, W. Prognostic significance of CT-

- determined sarcopenia in patients with advanced gastric cancer. *PLoS One* **13**, (2018).
175. Davis, M. P. & Panikkar, R. Sarcopenia associated with chemotherapy and targeted agents for cancer therapy. *Annals of Palliative Medicine* vol. 8 86–101 (2019).
 176. Roch, B. *et al.* Cachexia - sarcopenia as a determinant of disease control rate and survival in non-small lung cancer patients receiving immune-checkpoint inhibitors. *Lung Cancer* **143**, 19–26 (2020).
 177. Nishioka, N. *et al.* Association of Sarcopenia with and Efficacy of Anti-PD-1/PD-L1 Therapy in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Med.* **8**, 450 (2019).
 178. Waddington, C. H. An Introduction to Modern Genetics. By C. H. Waddington. *Proc. R. Entomol. Soc. London. Ser. A, Gen. Entomol.* **14**, 82–82 (1939).
 179. Waddington, C. H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* **150**, 563–565 (1942).
 180. Holliday, R. The inheritance of epigenetic defects. *Science (80-.)*. **238**, 163–170 (1987).
 181. Kim, J. K., Samaranyake, M. & Pradhan, S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 66 596–612 (2009).
 182. Antequera, F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1647–1658 (2003).
 183. Holliday, R. DNA methylation and epigenetic mechanisms. *Cell Biophys.* **15**, 15–20 (1989).
 184. Ferguson-Smith, A. C. Genomic imprinting: The emergence of an epigenetic paradigm. *Nature Reviews Genetics* vol. 12 565–575 (2011).
 185. Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **21**, 5427–5440 (2002).
 186. Esteller, M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* **358**, 1148–1159 (2008).
 187. Cock-Rada, A. & Weitzman, J. B. The methylation landscape of tumour metastasis. *Biol Cell* **105**, 73–90 (2013).

188. Carmona, F. J. & Esteller, M. DNA methylation in early neoplasia. *Cancer Biomark* **9**, 101–111 (2010).
189. Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–45 (2000).
190. Javaid, N. & Choi, S. Acetylation- and methylation-related epigenetic proteins in the context of their targets. *Genes* vol. 8 (2017).
191. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
192. Costa, F. F. Non-coding RNAs: lost in translation? *Gene* **386**, 1–10 (2007).
193. Dermitzakis, E. T., Reymond, A. & Antonarakis, S. E. Conserved non-genic sequences - an unexpected feature of mammalian genomes. *Nat Rev Genet* **6**, 151–157 (2005).
194. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 15 509–524 (2014).
195. Acunzo, M., Romano, G., Wernicke, D. & Croce, C. M. MicroRNA and cancer - A brief overview. *Adv. Biol. Regul.* **57**, 1–9 (2015).
196. Hwang, H. W. & Mendell, J. T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br. J. Cancer* **94**, 776–780 (2006).
197. Baranwal, S. & Alahari, S. K. miRNA control of tumor cell invasion and metastasis. *Int. J. Cancer* **126**, 1283–1290 (2010).
198. Lujambio, A. & Esteller, M. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer. *Cell Cycle* **6**, 1455–1459 (2007).
199. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics* vol. 12 861–874 (2011).
200. Liz, J. & Esteller, M. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development. *Biochim Biophys Acta* **1859**, 169–176 (2016).
201. Denham, J., Marques, F. Z., O'Brien, B. J. & Charchar, F. J. Exercise: Putting action into our epigenome. *Sport. Med.* **44**, 189–209 (2014).

202. Voisin, S. *et al.* An epigenetic clock for human skeletal muscle. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* (2020) doi:10.1002/jcsm.12556.
203. He, L., Khanal, P., Morse, C. I., Williams, A. & Thomis, M. Differentially methylated gene patterns between age-matched sarcopenic and non-sarcopenic women. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **10**, 1295–1306 (2019).
204. Sharples, A. P. *et al.* Skeletal muscle cells possess a ‘memory’ of acute early life TNF- α exposure: role of epigenetic adaptation. *Biogerontology* **17**, 603–617 (2016).
205. Roeder, R. G. Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. in *FEBS Letters* vol. 579 909–915 (Elsevier, 2005).
206. Molkenin, J. D. & Olson, E. N. Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9366–9373 (1996).
207. Moriscot, A. S. *et al.* MuRF1 and MuRF2 are key players in skeletal muscle regeneration involving myogenic deficit and deregulation of the chromatin-remodeling complex. *JCSM Rapid Commun.* **2**, 1–25 (2019).
208. Saini, A., Al-Shanti, N., Sharples, A. P. & Stewart, C. E. Sirtuin 1 regulates skeletal myoblast survival and enhances differentiation in the presence of resveratrol. *Exp. Physiol.* **97**, 400–418 (2012).
209. Byun, S. K. *et al.* HDAC11 inhibits myoblast differentiation through repression of myod-dependent transcription. *Mol. Cells* **40**, 667–676 (2017).
210. Dupré-Aucouturier, S., Castells, J., Freyssenet, D. & Desplanches, D. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, modulates unloaded-induced skeletal muscle atrophy. *J. Appl. Physiol.* **119**, 342–351 (2015).
211. Suzuki, T. & Springer, J. MicroRNAs in muscle wasting. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **9**, 1209–1212 (2018).
212. Zhang, H. *et al.* Exosomal circRNA derived from gastric tumor promotes white adipose browning by targeting the miR-133/PRDM16 pathway. *Int. J. Cancer* **144**, 2501–2515 (2019).

213. Santos, J. M. O., Peixoto da Silva, S., Gil da Costa, R. M. & Medeiros, R. The Emerging Role of MicroRNAs and Other Non-Coding RNAs in Cancer Cachexia. *Cancers (Basel)*. **12**, 1004 (2020).
214. He, L. & Hannon, G. J. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 522–531 (2004).
215. Sharma, M., Juvvuna, P. K., Kukreti, H. & McFarlane, C. Mega roles of microRNAs in regulation of skeletal muscle health and disease. *Front. Physiol.* **5 JUN**, (2014).
216. Nie, M., Deng, Z.-L., Liu, J. & Wang, D.-Z. Noncoding RNAs, Emerging Regulators of Skeletal Muscle Development and Diseases. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–17 (2015).
217. Snijders, T. *et al.* Muscle fibre capillarization is a critical factor in muscle fibre hypertrophy during resistance exercise training in older men. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **8**, 267–276 (2017).
218. Barbat-Artigas, S. *et al.* Caloric restriction and aerobic exercise in sarcopenic and non-sarcopenic obese women: an observational and retrospective study. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **7**, 284–289 (2016).
219. Molinari, F. *et al.* The mitochondrial metabolic reprogramming agent trimetazidine as an ‘exercise mimetic’ in cachectic C26-bearing mice. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **8**, 954–973 (2017).
220. Bowen, T. S. *et al.* Small-molecule inhibition of MuRF1 attenuates skeletal muscle atrophy and dysfunction in cardiac cachexia. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **8**, 939–953 (2017).
221. Polge, C. *et al.* A muscle-specific MuRF1-E2 network requires stabilization of MuRF1-E2 complexes by telethonin, a newly identified substrate. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **9**, 129–145 (2018).
222. Lodka, D. *et al.* Muscle RING-finger 2 and 3 maintain striated-muscle structure and function. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **7**, 165–180 (2016).
223. De Gasperi, R. *et al.* The signature of MicroRNA dysregulation in muscle paralyzed by spinal cord injury includes downregulation of MicroRNAs that

- target myostatin signaling. *PLoS One* **11**, (2016).
224. Huang, Q. K. *et al.* MiR-206 attenuates denervation-induced skeletal muscle atrophy in rats through regulation of satellite cell differentiation via TGF- β 1, Smad3, and HDAC4 signaling. *Med. Sci. Monit.* **22**, 1161–1170 (2016).
225. Garros, R. F. *et al.* MicroRNA-542 promotes mitochondrial dysfunction and SMAD activity and is elevated in intensive care unit–acquired weakness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 1422–1433 (2017).
226. Lewis, A. *et al.* Increased expression of H19/miR-675 is associated with a low fat-free mass index in patients with COPD. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **7**, 330–344 (2016).
227. Freire, P. P. *et al.* The pathway to cancer Cachexia: Microrna-regulated networks in muscle wasting based on integrative meta-analysis. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 (2019).
228. Abstracts. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **9**, 1121–1184 (2018).
229. Paul, R. *et al.* miR-422a suppresses SMAD4 protein expression and promotes resistance to muscle loss. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **9**, 119–128 (2018).
230. Zhang, A. *et al.* miRNA-23a/27a attenuates muscle atrophy and renal fibrosis through muscle-kidney crosstalk. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **9**, 755–770 (2018).
231. Li, J. *et al.* MiR-29b contributes to multiple types of muscle atrophy. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
232. Mubaid, S. *et al.* HuR counteracts miR-330 to promote STAT3 translation during inflammation-induced muscle wasting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, (2019).
233. Koutalianos, D., Koutsoulidou, A., Mastrogiannopoulos, N. P., Furling, D. & Phylactou, L. A. MyoD transcription factor induces myogenesis by inhibiting Twist-1 through miR-206. *J. Cell Sci.* **128**, 3631–3645 (2015).
234. Moraes, L. N. *et al.* Integration of miRNA and mRNA expression profiles reveals microRNA-regulated networks during muscle wasting in cardiac

- cachexia. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
235. Kukreti, H. *et al.* Muscle-specific MicroRNA1 (miR1) targets heat shock protein 70 (HSP70) during dexamethasone-mediated atrophy. *J. Biol. Chem.* **288**, 6663–6678 (2013).
236. Daas, S. I., Rizeq, B. R. & Nasrallah, G. K. Adipose tissue dysfunction in cancer cachexia. *J. Cell. Physiol.* **234**, 13–22 (2018).
237. Kulyté, A. *et al.* MicroRNA profiling links miR-378 to enhanced adipocyte lipolysis in human cancer cachexia. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **306**, (2014).
238. Porporato, P. E. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. *Oncogenesis* **5**, (2016).
239. Grossberg, A. J., Scarlett, J. M. & Marks, D. L. Hypothalamic mechanisms in cachexia. *Physiol. Behav.* **100**, 478–489 (2010).
240. Mercader, J. M. *et al.* Aberrant brain microRNA target and miRISC gene expression in the anx/anx anorexia mouse model. *Gene* **497**, 181–190 (2012).
241. Wang, H. & Wang, B. Extracellular vesicle microRNAs mediate skeletal muscle myogenesis and disease (Review). *Biomed. Reports* **5**, 296–300 (2016).
242. Soares, R. J. *et al.* Involvement of MicroRNAs in the regulation of muscle wasting during catabolic conditions. *J. Biol. Chem.* **289**, 21909–21925 (2014).
243. Soares, R. J. *et al.* Involvement of MicroRNAs in the regulation of muscle wasting during catabolic conditions. *J. Biol. Chem.* **289**, 21909–21925 (2014).
244. Basati, G., Emami Razavi, A., Abdi, S. & Mirzaei, A. Elevated level of microRNA-21 in the serum of patients with colorectal cancer. *Med. Oncol.* **31**, 1–5 (2014).
245. Yamada, A. *et al.* Serum MIR-21, MIR-29a, and MIR-125b are promising biomarkers for the early detection of colorectal neoplasia. *Clin. Cancer Res.* **21**, 4234–4242 (2015).
246. Huang, Y. K. & Yu, J. C. Circulating microRNAs and long non-coding RNAs in gastric cancer diagnosis: An update and review. *World J. Gastroenterol.* **21**,

- 9863–9886 (2015).
247. Kotb, S. *et al.* Circulating miRNAs 21 and 221 as biomarkers for early diagnosis of prostate cancer. *Tumor Biol.* **35**, 12613–12617 (2014).
 248. H, W. *et al.* Expression of serum exosomal microRNA-21 in human hepatocellular carcinoma. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
 249. Wang, X. *et al.* Significance of serum microRNA-21 in diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC): Clinical analyses of patients and an HCC rat model. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 1466–1478 (2015).
 250. Chacon-Cabrera, A., Fermoselle, C., Salmela, I., Yelamos, J. & Barreiro, E. MicroRNA expression and protein acetylation pattern in respiratory and limb muscles of Parp-1^{-/-} and Parp-2^{-/-} mice with lung cancer cachexia. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1850**, 2530–2543 (2015).
 251. Lee, D. E. *et al.* Cancer cachexia-induced muscle atrophy: evidence for alterations in microRNAs important for muscle size. *Physiol Genomics* **49**, 253–260 (2017).
 252. Narasimhan, A. *et al.* Small RNAome profiling from human skeletal muscle: novel miRNAs and their targets associated with cancer cachexia. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **8**, 405–416 (2017).
 253. van de Worp, W. R. P. H. *et al.* Identification of microRNAs in skeletal muscle associated with lung cancer cachexia. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **11**, 452–463 (2020).
 254. Fernandez, G. J. *et al.* MicroRNA-mRNA Co-sequencing Identifies Transcriptional and Post-transcriptional Regulatory Networks Underlying Muscle Wasting in Cancer Cachexia. *Front. Genet.* **11**, (2020).
 255. Siracusa, J., Koulmann, N. & Banzet, S. Circulating myomiRs: a new class of biomarkers to monitor skeletal muscle in physiology and medicine. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* vol. 9 20–27 (2018).
 256. Ghai, V., Lee, I. & Wang, K. Circulating miRNAs as tumor biomarkers. in *Oncogenomics: From Basic Research to Precision Medicine* 191–206 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-811785-9.00013-2.

257. Scherbakov, N. *et al.* Evaluation of C-terminal Agrin Fragment as a marker of muscle wasting in patients after acute stroke during early rehabilitation. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **7**, 60–67 (2016).
258. Nishikawa, H. *et al.* Elevated serum myostatin level is associated with worse survival in patients with liver cirrhosis. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **8**, 915–925 (2017).
259. Calvani, R. *et al.* Biomarkers for physical frailty and sarcopenia: State of the science and future developments. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* vol. 6 278–286 (2015).
260. Patel, M. S. *et al.* Growth differentiation factor-15 is associated with muscle mass in chronic obstructive pulmonary disease and promotes muscle wasting in vivo. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **7**, 436–448 (2016).
261. Loumaye, A. *et al.* Circulating Activin A predicts survival in cancer patients. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **8**, 768–777 (2017).
262. Cheung, A. S. *et al.* Androgen deprivation causes selective deficits in the biomechanical leg muscle function of men during walking: a prospective case–control study. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **8**, 102–112 (2017).
263. Reid, G., Kirschner, M. B. & van Zandwijk, N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **80**, 193–208 (2011).
264. Powrózek, T. *et al.* MiRNA-130a significantly improves accuracy of SGA nutritional assessment tool in prediction of malnutrition and cachexia in radiotherapy-treated head and neck cancer patients. *Cancers (Basel)*. **10**, (2018).
265. Okugawa, Y. *et al.* Prognostic impact of sarcopenia and its correlation with circulating miR-21 in colorectal cancer patients. *Oncol. Rep.* **39**, 1555–1564 (2018).
266. Okugawa, Y. *et al.* Circulating miR-203 derived from metastatic tissues promotes myopenia in colorectal cancer patients. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **10**, 536–548 (2019).

267. Paul, R. *et al.* miR-422a suppresses SMAD4 protein expression and promotes resistance to muscle loss. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **9**, 119–128 (2018).
268. Chen, D. *et al.* Cancer affects microRNA expression, release, and function in cardiac and skeletal muscle. *Cancer Res.* **74**, 4270–4281 (2014).
269. Connolly, M. *et al.* miR-424-5p reduces ribosomal RNA and protein synthesis in muscle wasting. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **9**, 400–416 (2018).
270. Miyachi, M. *et al.* Circulating muscle-specific microRNA, miR-206, as a potential diagnostic marker for rhabdomyosarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **400**, 89–93 (2010).
271. Liu, R. *et al.* A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis. *Eur. J. Cancer* **47**, 784–791 (2011).
272. Li, M. *et al.* Serum miR-499 as a novel diagnostic and prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* **31**, 1961–1967 (2014).
273. Hu, Z. *et al.* Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1721–1726 (2010).
274. Tian, R., Liu, T., Qiao, L., Gao, M. & Li, J. Decreased serum microRNA-206 level predicts unfavorable prognosis in patients with melanoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 3097–3103 (2015).
275. Nohata, N., Hanazawa, T., Enokida, H. & Seki, N. MicroRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: Dysregulation and functional roles in human cancers. *Oncotarget* **3**, 9–21 (2012).
276. Zhang, C., Yao, C., Li, H., Wang, G. & He, X. Serum levels of microRNA-133b and microRNA-206 expression predict prognosis in patients with osteosarcoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 4194–4203 (2014).
277. Köberle, V. *et al.* Serum microRNA-1 and microRNA-122 are prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Cancer* **49**, 3442–3449 (2013).

278. Shachar, S. S., Williams, G. R., Muss, H. B. & Nishijima, T. F. Prognostic value of sarcopenia in adults with solid tumours: A meta-analysis and systematic review. *Eur. J. Cancer* **57**, 58–67 (2016).
279. Iraci, N., Leonardi, T., Gessler, F., Vega, B. & Pluchino, S. Focus on extracellular vesicles: Physiological role and signalling properties of extracellular membrane vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
280. Camargo, R. G. *et al.* Cancer Cachexia and MicroRNAs. *Mediators Inflamm.* **2015**, 1–5 (2015).
281. Yáñez-Mó, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* **4**, 1–60 (2015).
282. Rashed, M. H. *et al.* Exosomes: From garbage bins to promising therapeutic targets. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
283. Wu, Q. *et al.* Tumour-originated exosomal miR-155 triggers cancer-associated cachexia to promote tumour progression. *Mol. Cancer* **17**, 155 (2018).
284. Wu, Q. *et al.* Breast cancer-released exosomes trigger cancer-associated cachexia to promote tumor progression. *Adipocyte* **8**, 31–45 (2019).
285. Wan, Z. *et al.* Chronic myeloid leukemia-derived exosomes attenuate adipogenesis of adipose derived mesenchymal stem cells via transporting miR-92a-3p. *J. Cell. Physiol.* **234**, 21274–21283 (2019).
286. He, W. A. *et al.* Microvesicles containing miRNAs promote muscle cell death in cancer cachexia via TLR7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 4525–4529 (2014).
287. Hudson, M. B. *et al.* miR-182 attenuates atrophy-related gene expression by targeting FoxO3 in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **307**, (2014).
288. Marinho, R., Alcântara, P. S. M., Ottoch, J. P. & Seelaender, M. Role of Exosomal MicroRNAs and myomiRs in the Development of Cancer Cachexia-Associated Muscle Wasting. *Frontiers in Nutrition* vol. 4 (2018).
289. Ebner, N., Anker, S. D. & Haehling, S. Recent developments in the field of cachexia, sarcopenia, and muscle wasting: highlights from the 11th Cachexia

- Conference. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **10**, 218–225 (2019).
290. Lazar, I. *et al.* Adipocyte Exosomes Promote Melanoma Aggressiveness through Fatty Acid Oxidation: A Novel Mechanism Linking Obesity and Cancer. *Cancer Res.* **76**, 4051–4057 (2016).
291. Huang-Doran, I., Zhang, C. Y. & Vidal-Puig, A. Extracellular Vesicles: Novel Mediators of Cell Communication In Metabolic Disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism* vol. 28 3–18 (2017).
292. Lobb, R. J., Lima, L. G. & Möller, A. Exosomes: Key mediators of metastasis and pre-metastatic niche formation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **67**, 3–10 (2017).
293. Tomasetti, M., Lee, W., Santarelli, L. & Neuzil, J. Exosome-derived microRNAs in cancer metabolism: Possible implications in cancer diagnostics and therapy. *Exp. Mol. Med.* **49**, (2017).
294. Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R. & Croce, C. M. A new role for microRNAs, as ligands of Toll-like receptors. *RNA Biol.* **10**, 169–174 (2013).
295. Fabbri, M. *et al.* MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, (2012).
296. Li, X. *et al.* Lung tumor exosomes induce a pro-inflammatory phenotype in mesenchymal stem cells via NFκB-TLR signaling pathway. *J. Hematol. Oncol.* **9**, (2016).
297. Altevogt, P., Bretz, N. P., Ridinger, J., Utikal, J. & Umansky, V. Novel insights into exosome-induced, tumor-associated inflammation and immunomodulation. *Seminars in Cancer Biology* vol. 28 51–57 (2014).
298. Yao, R. W., Wang, Y. & Chen, L. L. Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nat. Cell Biol.* **21**, 542–551 (2019).
299. Paraskevopoulou, M. D. & Hatzigeorgiou, A. G. Analyzing MiRNA–LncRNA interactions. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1402 271–286 (Humana Press Inc., 2016).
300. Shen, L. *et al.* Cachexia-related long noncoding RNA, CAAInc1, suppresses

- adipogenesis by blocking the binding of HuR to adipogenic transcription factor mRNAs. *Int. J. Cancer* **145**, 1809–1821 (2019).
301. Liu, H. *et al.* Identification and functional analysis of a potential key lncRNA involved in fat loss of cancer cachexia. *J. Cell. Biochem.* **119**, 1679–1688 (2018).
 302. Mercer, T. R., Dinger, M. E. & Mattick, J. S. Long non-coding RNAs: Insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 155–159 (2009).
 303. Gong, C. *et al.* A Long Non-coding RNA, LncMyoD, Regulates Skeletal Muscle Differentiation by Blocking IMP2-Mediated mRNA Translation. *Dev. Cell* **34**, 181–191 (2015).
 304. Li, Z. *et al.* LncIRS1 controls muscle atrophy via sponging miR-15 family to activate IGF1-PI3K/AKT pathway. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **10**, 391–410 (2019).
 305. Schiaffino, S. & Mammucari, C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: Insights from genetic models. *Skelet. Muscle* **1**, (2011).
 306. Dong, X. *et al.* Irs1 and Irs2 signaling is essential for hepatic glucose homeostasis and systemic growth. *J. Clin. Invest.* **116**, 101–114 (2006).
 307. Sun, L. *et al.* Long-noncoding RNA AtroLnc-1 promotes muscle wasting in mice with chronic kidney disease. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **9**, 962–974 (2018).
 308. Zhang, Z. K. *et al.* A newly identified lncRNA MAR1 acts as a miR-487b sponge to promote skeletal muscle differentiation and regeneration. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **9**, 613–626 (2018).
 309. Shang, Q., Yang, Z., Jia, R. & Ge, S. The novel roles of circRNAs in human cancer. *Mol. Cancer* **18**, (2019).
 310. Schneider, T. & Bindereif, A. Circular RNAs: Coding or noncoding? *Cell Res.* **27**, 724–725 (2017).
 311. Lee, E. C. S. *et al.* The roles of circular RNAs in human development and

- diseases. *Biomed. Pharmacother.* **111**, 198–208 (2019).
312. Patop, I. L., Wüst, S. & Kadener, S. Past, present, and future of circ RNAs. *EMBO J.* **38**, (2019).
313. Carr, R. M. *et al.* Epigenetics of cancer-associated muscle catabolism. *Epigenomics* vol. 9 1259–1265 (2017).
314. Fan, H. *et al.* Sulforaphane causes a major epigenetic repression of myostatin in porcine satellite cells. *Epigenetics* **7**, 1379–1390 (2012).
315. Jing, H. & Lin, H. Sirtuins in epigenetic regulation. *Chem. Rev.* **115**, 2350–2375 (2015).
316. Vinciguerra, M., Fulco, M., Ladurner, A., Sartorelli, V. & Rosenthal, N. SirT1 in muscle physiology and disease: Lessons from mouse models. *DMM Dis. Model. Mech.* **3**, 298–303 (2010).
317. Iezzi, S., Cossu, G., Nervi, C., Sartorelli, V. & Puri, P. L. Stage-specific modulation of skeletal myogenesis by inhibitors of nuclear deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7757–7762 (2002).
318. Iezzi, S. *et al.* Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin. *Dev. Cell* **6**, 673–684 (2004).
319. Matzuk, M. M. *et al.* Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature* **374**, 360–363 (1995).
320. Lee, S. J. & McPherron, A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9306–9311 (2001).
321. Marks, P. A., Richon, V. M., Breslow, R. & Rifkind, R. A. Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Current Opinion in Oncology* vol. 13 477–483 (2001).
322. Arts, J., Schepper, S. & Emelen, K. Histone Deacetylase Inhibitors: From Chromatin Remodeling to Experimental Cancer Therapeutics. *Curr. Med. Chem.* **10**, 2343–2350 (2005).
323. Bogdanovich, S. *et al.* Functional improvement of dystrophic muscle by

- myostatin blockade. *Nature* **420**, 418–421 (2002).
324. Wagner, K. R., McPherron, A. C., Winik, N. & Lee, S. J. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann. Neurol.* **52**, 832–836 (2002).
325. Liva, S. G. *et al.* Overcoming resistance to anabolic SARM therapy in experimental cancer cachexia with an HDAC inhibitor. *EMBO Mol. Med.* **12**, e9910–e9910 (2020).
326. Abstracts. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **9**, 1121–1184 (2018).
327. Abstracts of the 2nd Cancer Cachexia Conference, Montreal, Canada, 26-28 September 2014. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **6**, 2–31 (2015).
328. Segatto, M. *et al.* Epigenetic targeting of bromodomain protein BRD4 counteracts cancer cachexia and prolongs survival. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
329. Yang, J. Patisiran for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **12**, 95–99 (2019).
330. Hanna, J., Hossain, G. S. & Kocerha, J. The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Front. Genet.* **10**, 478 (2019).
331. Bonneau, E., Neveu, B., Kostantin, E., Tsongalis, G. J. & De Guire, V. How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *Electron. J. Int. Fed. Clin. Chem. Lab. Med.* **30**, 114–127 (2019).
332. Ebner, N., Anker, S. D. & von Haehling, S. Recent developments in the field of cachexia, sarcopenia, and muscle wasting: highlights from the 12th Cachexia Conference. in *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* vol. 11 274–285 (Wiley Blackwell, 2020).
333. Calore, F. *et al.* The TLR7/8/9 antagonist IMO-8503 inhibits cancer-induced cachexia. *Cancer Res.* **78**, 6680–6690 (2018).
334. Sannicandro, A. J., McDonagh, B. & Goljanek-Whysall, K. MicroRNAs as potential therapeutic targets for muscle wasting during cancer cachexia. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **23**, 157–163 (2020).