



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ: ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ »**

**ΜΑΡΟΥ ΕΜΜΑΝΟΥΕΛΑ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ**

**ΛΑΡΙΣΑ
ΙΟΥΛΙΟΣ, 2014**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Α. ΤΣΕΖΟΥ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΗΜΑΣ ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Π.Θ

Συνεπιβλέποντες

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΓΚΡΕΤΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Γ ΕΚΕΤΑ

ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Π.Θ

Περιεχόμενα

1)Περίληψη	σελ 3
2)Εισαγωγή	σελ 4
• Ήπαρ	σελ 4
• Ανατομία	σελ 5
• Φυσιολογία	σελ 5
• Σύνθεση	σελ 5
• Νοσήματα του ήπατος	σελ 7
3)Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	σελ 8
• Επιδημιολογία	σελ 8
• Κλινική εικόνα	σελ 8
• Διάγνωση	σελ 8
• Παράγοντες κινδύνου του ΗΚΚ	σελ 9
• Αιτιολογία	σελ 10
• Ιστοπαθολογική εξέλιξη και μοριακά χαρακτηριστικά	σελ 12
• Σταδιοποίηση	σελ 13
• Μηχανισμός ηπατοκαρκινογένεσης	σελ 13
4)Επιρροή του ιού HBV στην ανάπτυξη ΗΚΚ	σελ 15
• Μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον ιό του HBV	σελ 19
5)Πως ο HCV επηρεάζει την ανάπτυξη του ΗΚΚ	σελ 22
• Διαφορές του HCV από τον HBV σε σχέση με την ανάπτυξη ΗΚΚ	σελ 23
6)Η αφλατοξίνη B1 προάγει την ηπατοκαρκινογένεση	σελ 24
7)Παραγωγή ηπατοκαρκινογένεσης από αλκοόλ	σελ 25
8)Ανάπτυξη του ΗΚΚ και σηματοδοτικά μονοπάτια	σελ 28
• Δομικές μεταλλαγές στον ΗΚΚ	σελ 29
• Μοριακά σηματοδοτικά μονοπάτια επιβίωσης	σελ 30
• Σηματοδοτικά μονοπάτια αυξητικών παραγόντων	σελ 33
• Μοριακά μονοπάτια μεταγραφικών παραγόντων	σελ 35
• Μονοπάτια ογκοκατασταλτικών γονιδίων	σελ 39
• Αποπτωτικά μονοπάτια	σελ 43
• Μονοπάτια μεταβολισμού της γλυκόζης	σελ 45
9)Θεραπευτική αντιμετώπιση του ΗΚΚ	σελ 50
• Χειρουργική αντιμετώπιση	σελ 50
• Επεμβατική ακτινολογία	σελ 51
• Μεταμόσχευση ήπατος	σελ 52
10)Φαρμακευτική αντιμετώπιση	σελ 53
• Στατίνες	σελ 53
• Στόχευση του μονοπατιού VEGF/VEGFR, PDGFR ΚΑΙ FGFR	σελ 54
• Στόχευση του μονοπατιού MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK)	σελ 58
• Στόχευση του μονοπατιού PI3K/AKT/MTOR PATHWAY	σελ 60

• Στόχευση των σημάτων EGFR, IGF, HGF/c-MET	σελ 60
• Στόχευση μονοπατιών μεταβολισμού γλυκόζης (GAPDH)	σελ 64
• Στόχευση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου DLC1	σελ 67
• Στόχευση του ογκογονιδίου MYC	σελ 68
• Non-Coding RNAs ως θεραπεία για ΗΚΚ	σελ 70
11)Συμπεράσματα	σελ 79

Περίληψη

Ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος (ΗΚΚ) είναι η τρίτη πιο θανατηφόρα μορφή καρκίνου σε όλο τον κόσμο. Ετερογενή φαινοτυπικά και γενετικά χαρακτηριστικά των ατόμων που πλήττονται και ένα ευρύ φάσμα των παραγόντων κινδύνου έχουν χαρακτηρίσει την ασθένεια σύνθετη. Ένας από τους κύριους λόγους για την κακή πρόγνωση των ασθενών με ΗΚΚ είναι η έλλειψη αποτελεσματικών θεραπευτικών επιλογών, ειδικότερα γι' αυτούς που είναι σε προχωρημένο στάδιο της ασθένειας. Ο ΗΚΚ δεν είναι δεκτικός στην κλασσική χημειοθεραπεία και είναι ανθεκτικός στην ακτινοθεραπεία. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η χειρουργική εκτομή και η μεταμόσχευση ήπατος παραμένουν οι μόνες θεραπευτικές επιλογές.

Σήμερα, η βελτιωμένη γνώση των ογκογενετικών διαδικασιών και των σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την διαφοροποίηση, την αγγειογένεση, την διεισδυτικότητα και την μετάσταση, έχει οδηγήσει στην αναγνώριση πολλών θεραπευτικών στόχων και στην ανάπτυξη στοχευμένων μοριακών θεραπειών. Πρόσφατες μελέτες, που χρησιμοποιούν ένα συνδυασμό τεχνολογιών συνδυαστικής χημείας, γονιδιωματικής και βιοπληροφορικής, παρέχουν νέες γνώσεις σχετικά με τα γονίδια έκφρασης και των πρωτεϊνικών μορφών κατά τα διάφορα στάδια της νόσου.

Παρακάτω αναλύονται οι κύριες αιτίες που μπορούν να προκαλέσουν ΗΚΚ, οι μοριακοί μηχανισμοί και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται στην καρκινογένεση όπως και κάποιες σύγχρονες μοριακές θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Οι κυριότερες αιτίες που έχουν συσχετιστεί με ΗΚΚ είναι: μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας Β, τον ιό της ηπατίτιδας C, η κατανάλωση αλκοόλ, και η έκθεση σε αφλατοξίνες Β1 που περιέχονται σε κάποια τρόφιμα και που οδηγούν σε γενετικές αλλαγές στα ηπατοκύτταρα, καταλήγοντας σε πολλαπλασιασμό, απόπτωση, δυσπλασία και νεοπλασία.

Για την ανάπτυξη καρκίνου είναι απαραίτητη η απορρύθμιση συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία μπορούν να χωριστούν σε κάποιες κατηγορίες όπως: μονοπάτια επιβίωσης (όπως αυτό των MAPK), αυξητικών παραγόντων (όπως ο VEGF), μεταγραφικών παραγόντων (όπως Jak/stat), ογκοκατασταλτικών γονιδίων (όπως το DLC-1), και μεταβολισμού της γλυκόζης (όπως το GAPDH). Ο ρόλος των σηματοδοτικών μονοπατιών είναι τόσο σημαντικός που μια μετάλλαξη σε ένα από τα παραπάνω μπορεί να οδηγήσει στην καρκινογένεση.

Τέλος παρουσιάζονται κάποιες θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν διάφορους μοριακούς μηχανισμούς χρησιμοποιώντας φάρμακα όπως στατίνες, σοραφενίβη, καθώς και θεραπευτικές προσεγγίσεις, οι οποίες είναι ακόμη υπό κλινικές δοκιμές.

Εισαγωγή

Ήπαρ

Το **ήπαρ** ή συκώτι είναι ένα ζωτικό όργανο του ανθρώπινου οργανισμού με ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών όπως η αποτοξίνωση, η σύνθεση πρωτεϊνών και η παραγωγή βιοχημικών ουσιών απαραίτητων για την πέψη των τροφών. Το ήπαρ παίζει κυρίαρχο ρόλο στο μεταβολισμό αφού ευθύνεται για την αποθήκευση γλυκογόνου, την καταστροφή ερυθροκυττάρων, τη σύνθεση των πρωτεϊνών του πλάσματος, την παραγωγή ορμονών και την απομάκρυνση των τοξικών ουσιών από το σώμα. Εντοπίζεται κάτω από το διάφραγμα, στο δεξιό και άνω μέρος της κοιλίας, που ονομάζεται δεξιό υποχόνδριο, και επεκτείνεται και στο κεντρικό και άνω μέρος της κοιλίας, που ονομάζεται επιγάστριο. Από το συκώτι παράγεται και η χολή, ένα αλκαλικό μίγμα, που αποδομεί μικρά και περίπλοκα μόρια, κατά τη διάρκεια της πέψης (Maton, Anthea, et al. 1993).

Ανατομία

Το ήπαρ αποτελείται από τέσσερις λοβούς, διαφορετικού μεγέθους και σχήματος. Το φυσιολογικό ανθρώπινο ήπαρ έχει βάρος 1.4–1.6 kg (3.1–3.5 lb), (Cotran, Ramzi S, et al. 2005) και συνιστά το 2% του συνολικού βάρους του σώματος. Το σχήμα του μοιάζει με σφήνα. Στην κάτω επιφάνεια του διακρίνονται οι πύλες δια των οποίων εισέρχονται η πυλαία φλέβα και η ηπατική αρτηρία και εξέρχεται ο χοληδόχος πόρος. Η ηπατική αρτηρία μεταφέρει αίμα από την αορτή προς το ήπαρ, ενώ η πυλαία φλέβα μεταφέρει αίμα εμπλουτισμένο με θρεπτικά συστατικά από τον γαστρεντερικό σωλήνα το σπλήνα και το πάγκρεας. Αυτά τα αγγεία διαιρούνται σε τριχοειδή και καθένα από αυτά καταλήγει σε ένα λόβιο. Κάθε λοβός αποτελείται από εκατομμύρια ηπατοκύτταρα, που είναι τα κύρια λειτουργικά κύτταρα του ήπατος (Maton, Anthea, et al. 1993).

Φυσιολογία

Το ήπαρ θεωρείται ότι είναι το βιοχημικό εργαστήριο του ανθρώπινου σώματος. Οι κυριότερες λειτουργίες του επιτελούνται από τα ηπατοκύτταρα ενώ υπάρχουν και λειτουργίες που υποστηρίζονται από τα μη παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος που είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα Kupffer (μακροφάγα του ήπατος) και τα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος (hepatic stellate cells). Παρά τις επίμονες ερευνητικές προσπάθειες στον τομέα της βιομηχανικής, προς το παρόν δε έχει κατασκευαστεί τεχνητό όργανο ή συσκευή ικανή να υποκαταστήσει όλες τις λειτουργίες του ήπατος (Benjamin L. Shneider. 2008).

Σύνθεση

Οι βασικές λειτουργίες που επιτελούνται από το ήπαρ είναι οι ακόλουθες:

- Ένα μεγάλο μέρος της σύνθεσης των αμινοξέων
- Το ήπαρ αναλαμβάνει διάφορους ρόλους στο μεταβολισμό των υδατανθράκων:

- Γλυκονεογένεση (σύνθεση γλυκόζης από συγκεκριμένα αμινοξέα, γαλακτικό οξύ ή γλυκερόλη)
 - Γλυκογονόλυση (η αποδόμηση του γλυκογόνου σε γλυκόζη)
 - Γλυκογονογένεση (η σύνθεση γλυκογόνου από γλυκόζη)
- Είναι ο ακρογωνιαίος λίθος στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών (σύνθεση και αποδόμηση).
- Έχει ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων:
 - Σύνθεση χοληστερόλης
 - Λιπογένεση (η παραγωγή των τριγλυκεριδίων)
- Συνθέτει τους παράγοντες πήξης I (ινωδογόνο), II (προθρομβίνη), V, VII, IX, X και XI, όπως και την πρωτεΐνη C, S και αντιθρομβίνη.
- Αναλαμβάνει την κύρια θέση παραγωγής ερυθροκυττάρων κατά το πρώτο τρίμηνο της εμβρυϊκής ζωής, ενώ μετά τη διεργασία αυτή αναλαμβάνει αποκλειστικά ο μυελός των οστών.
- Παράγει και εκκρίνει χολή, που απαιτείται για την γαλακτωματοποίηση του λίπους. Ένα μέρος της χολής παροχετεύεται απευθείας στο δωδεκαδάκτυλο, ενώ το υπόλοιπο αποθηκεύεται προσωρινά στη χοληδόχο κύστη.
- Παράγει τον αυξητικό παράγοντα της ινσουλίνης 1 (IGF-1), μια πολυπεπτιδική πρωτεϊνική ορμόνη που παίζει σημαντικό ρόλο στην σωματική αύξηση στα παιδιά και συνεχίζει να έχει αναβολική δράση στους ενήλικες.
- Είναι μια σημαντική θέση παραγωγής θρομβοποιητίνης, μιας ορμόνης που ρυθμίζει την παραγωγή αιμοπεταλίων από το μυελό των οστών.
- Αποθηκεύει ένα πλήθος ουσιών, συμπεριλαμβανομένων της γλυκόζης (με μορφή γλυκογόνου), βιταμίνη A (απόθεμα για 1-2 χρόνια), βιταμίνη D (για 1-4 μήνες), βιταμίνη B12 (για 1-3 χρόνια), σίδηρο και χαλκό.
- Συνθέτει αλβουμίνη, το κύριο ωσμωτικό συστατικό του πλάσματος του αίματος.
- Συνθέτει αγγειοτενσινογόνο, μια ορμόνη υπεύθυνη για την αύξηση της αρτηριακής πίεσης, όταν ενεργοποιείται από το ένζυμο ρενίνη, ως αντίδραση στην ελαττωμένη αρτηριακή πίεση που ανιχνεύουν οι νεφροί.

- Είναι το μοναδικό εσωτερικό όργανο του σώματος που έχει την ικανότητα φυσικής αναγέννησης του ελλείποντος ιστού. Αρκεί μόνο το 25% του ηπατικού ιστού για να αναγεννηθεί ολόκληρο το ήπαρ (Dieter Häussinger, 2011). Η αναγεννητική ικανότητα του ήπατος οφείλεται στα ηπατοκύτταρα, τα οποία επανεισάγονται στον κυτταρικό κύκλο, δηλαδή μεταπίπτουν από την ανενεργή G₀ φάση του κύκλου στην G₁ φάση και υφίστανται μίτωση. (Suzuki K, et al. 2008).
- Έχει ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς το δικτυοενδοθηλιακό σύστημά του περιλαμβάνει πολλά ανοσοϊκανά κύτταρα, που λειτουργούν σαν κόσκινο για αντιγόνα, που μεταφέρονται μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας (Dieter Häussinger, 2011).
- Συμβάλλει στην αποδόμηση ινσουλίνης και άλλων ορμονών
- Στο ήπαρ γίνεται η γλυκουρονίδωση της χολερυθρίνης, διευκολύνοντας την έκκρισή της με τη χολή.
- Είναι υπεύθυνο για την αποδόμηση ή τροποποίηση τοξικών ουσιών (π.χ. μέσω μεθυλίωσης), όπως επίσης και την πλειονότητα των φαρμακευτικών προϊόντων.
- Μετατρέπει την αμμωνία σε ουρία και έτσι βοηθά την αποτοξίνωση του οργανισμού. (Benjamin L. Shneider. 2008).

Νοσήματα του ήπατος

Τα πιο συχνά νοσήματα του ήπατος είναι οι: λοιμώξεις, όπως ηπατίτιδα Α, ηπατίτιδα Β, C, E, αλκοολική νόσος, λιπώδες ήπαρ, κίρρωση, καρκίνος, φαρμακευτικές βλάβες (ειδικά από ακεταμινοφαίνη, επίσης γνωστή ως παρακεταμόλη, και αντικαρκινικά φάρμακα) (Cotran, Ramzi S, et al. 2005).

Οι περισσότερες παθήσεις του ήπατος διαγιγνώσκονται με εξετάσεις της ηπατικής λειτουργίας, όπως η μέτρηση των ενζύμων SGOT (glutamic oxaloacetic transaminase) και SGPT (glutamic oxaloacetic transaminase), η γ-GT (γ-γλουταμυλοτρανσφεράση), η LDH (γαλακτική δευδρογονάση), η άμεση κ έμμεση χολερυθρίνη του πλάσματος, καθώς και η παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης (Cotran, Ramzi S, et al. 2005).

Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα

Επιδημιολογία

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) είναι ένας από τους πιο θανατηφόρους τύπους καρκίνου και επηρεάζει ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού. Συναντάται συχνότερα (σε ποσοστό 80%) στην Ασία και στις υποσαχάριες χώρες της Αφρικής και στην ανατολική Ασία (>20 περιπτώσεις/100.000). Στη νότια Ευρώπη η συχνότητα του ΗΚΚ είναι μέτρια (Ιταλία 13,5 και 4,6/100.000, Ελλάδα 12,5 και 4,6/100.000, Ισπανία 7,5 και 2,4/100.000, για άνδρες και γυναίκες αντίστοιχα), ενώ στις ΗΠΑ, στον Καναδά και στη δυτική Ευρώπη ο ΗΚΚ είναι αρκετά σπανιότερος (<5/100.000 ανά έτος) (Robbins and Cotran. (1999).

Κλινική εικόνα

Ο ΗΚΚ συχνά διαφεύγει της κλινικής αναγνώρισης επειδή αναπτύσσεται σε έδαφος κίρρωσης και τα σημεία και συμπτώματα πιθανόν να υποδηλώνουν την πρόοδο της υποκείμενης νόσου. Συχνότερο σύμπτωμα είναι το κοιλιακό άλγος, ενώ είναι δυνατόν να υπάρχει κλινικά ήχος τριβής ή φύσημα στο δεξιό άνω τεταρτημόριο της κοιλιάς. Αιμορραγικός ασκίτης εμφανίζεται στο 20% των περιπτώσεων. Ο ίκτερος είναι σπάνιος, εκτός κι αν συνυπάρχει σοβαρή ηπατική ανεπάρκεια ή απόφραξη των χοληφόρων. Ενίοτε ο ΗΚΚ μπορεί να εκδηλωθεί με εικόνα οξείας κοιλιάς, μετά από ρήξη του όγκου και του αιμοπεριτοναίου, ενώ είναι δυνατόν να υπάρχουν και συμπτώματα από μεταστατική νόσο (οσφυαλγία, παραπληγία) (Benjamin L. Shneider. 2008).

Μικρό μέρος των ασθενών με ΗΚΚ παρουσιάζει παρανεοπλασματικό σύνδρομο (πυρετός, όψιμη δερματική πορφύρα, πολυμυοσίτιδα, υπογλυκαιμία, υπερασβεσταιμία, ερυθροκυττάρωση, καρκινοειδές σύνδρομο) (Benjamin L. Shneider. 2008).

Διάγνωση - πρώιμη διάγνωση

Η πρόγνωση σε ασθενείς με ΗΚΚ είναι κακή, με επιβίωση 5 έτη, μικρότερη από 5%, και μέση επιβίωση μερικών μηνών σε ασυμπτωματικούς ασθενείς.

Για όγκους διαμέτρου >5 εκατοστών η επιβίωση ενός έτους είναι 17% - 21%, ενώ για όγκους διαμέτρου <5 εκατοστών η επιβίωση είναι 81% - 100%. Επομένως, η προσπάθεια για αποτελεσματική παρέμβαση στη νόσο συνδέεται με τη διάγνωση πολύ μικρού όγκου <5 εκατοστά (Dieter Häussinger, 2011).

Η πρώιμη διάγνωση του ΗΚΚ γίνεται με την εφαρμογή διαγνωστικών τεχνικών σε άτομα με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΗΚΚ (screening). Για να περιοριστεί η θνησιμότητα από την ασθένεια απαραίτητο είναι το συστηματικό screening σε ομάδες υψηλού κινδύνου. Σήμερα η ποιότητα του screening αξιολογείται με βάση την αποτελεσματικότητά της να παραπέμπει ασθενείς για μεταμόσχευση, που είναι συχνά η πλέον συνιστώμενη θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου. Τα στοιχεία που υπάρχουν για την ανάπτυξη του όγκου δείχνουν ότι ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσει μια μη ανιχνεύσιμη βλάβη σε μέγεθος 2 εκατοστών είναι περίπου 4 - 12 μήνες (Dieter Häussinger, 2011).

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό οργανισμό για την μελέτη του ήπατος, προτείνεται μελέτη για την ανίχνευση όζων <3 εκατοστά κάθε έξι μήνες (EASL). Η α1 εμβρυϊκή σφαιρίνη δεν θεωρείται κατάλληλο για screening test, με ευαισθησία μόνο 54%, πρέπει όμως να γίνεται εάν στο υπερηχογράφημα βρεθεί όζος (Dieter Häussinger, 2011).

Παράγοντες κινδύνου του ΗΚΚ:

1. **Ηλικία:** Η μέγιστη επίπτωση αφορά στις ηλικίες 74 - 79 ετών σε περιοχές χαμηλού κινδύνου, ενώ στις χώρες με υψηλή επίπτωση ΗΚΚ η νόσος απαντά σε μικρότερες ηλικίες, φτάνοντας τη μεγαλύτερη συχνότητα στα 40 έτη.
2. **Φύλο:** Παγκοσμίως οι άνδρες προσβάλλονται συχνότερα από τις γυναίκες (αναλογία ανδρών/γυναικών από 2:1 έως 4:1), πιθανώς λόγω συχνότερης λοίμωξης από τους ιούς της ηπατίτιδας Β και C, της κατάχρησης αιθυλικής αλκοόλης, του καπνίσματος και της επίδρασης των ανδρογόνων.

3. **Εθνικότητα:** Ο ΗΚΚ είναι 4 φορές συχνότερος σε άτομα ασιατικής και αφρικανικής καταγωγής (Suzuki K, et al. 2008).

Αιτιολογία

Έχουν συσχετιστεί πολλές αιτίες με την ανάπτυξη του ΗΚΚ. Οι πιο επικρατείς από αυτές περιλαμβάνουν:

- **τη χρόνια ηπατίτιδα Β:** Η προαγωγή του HBV σε ηπατοκαρκινογένεση περιλαμβάνει μια σειρά διαδικασιών όπως αλληλεπίδραση ιού ξενιστή, συνεχείς κύκλοι νέκρωσης-λοίμωξης-αναγέννησης-αλληλεπίδραση με ενδοπλασματικό δίκτυο (προαγωγή του οξειδωτικού στρες), ιική ενσωμάτωση με το γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή και η ενεργοποίηση ογκογενών μονοπατιών εξαιτίας διάφορων ιικών πρωτεϊνών.
- **την ηπατίτιδα C:** Η προαγωγή του HCV σε ΗΚΚ ακολουθεί τις ίδιες διαδικασίες με τον HBV αλλά ο HCV έχει την τάση να αποφεύγει τις ανοσολογικές απαντήσεις του οργανισμού, και να προάγει την κίρρωση.
- **τη χρόνια κατανάλωση αλκοόλ:** Η προαγωγή του καρκινώματος εξαιτίας του αλκοόλ σχετίζεται με τους κύκλους νέκρωσης και αναγέννησης των ηπατοκυττάρων, με το οξειδωτικό στρες και με την κίρρωση.
- **την επίδραση της ουσίας αφλατοξίνης που περιέχεται σε κάποια τρόφιμα:** Η αφλατοξίνη B1 που προάγει τον ΗΚΚ σχετίζεται με καρκινογενείς μεταλλάξεις (Paraskevi A. et al. 2006).

Άλλοι αιτιολογικοί παράγοντες που σχετίζονται με τον ΗΚΚ

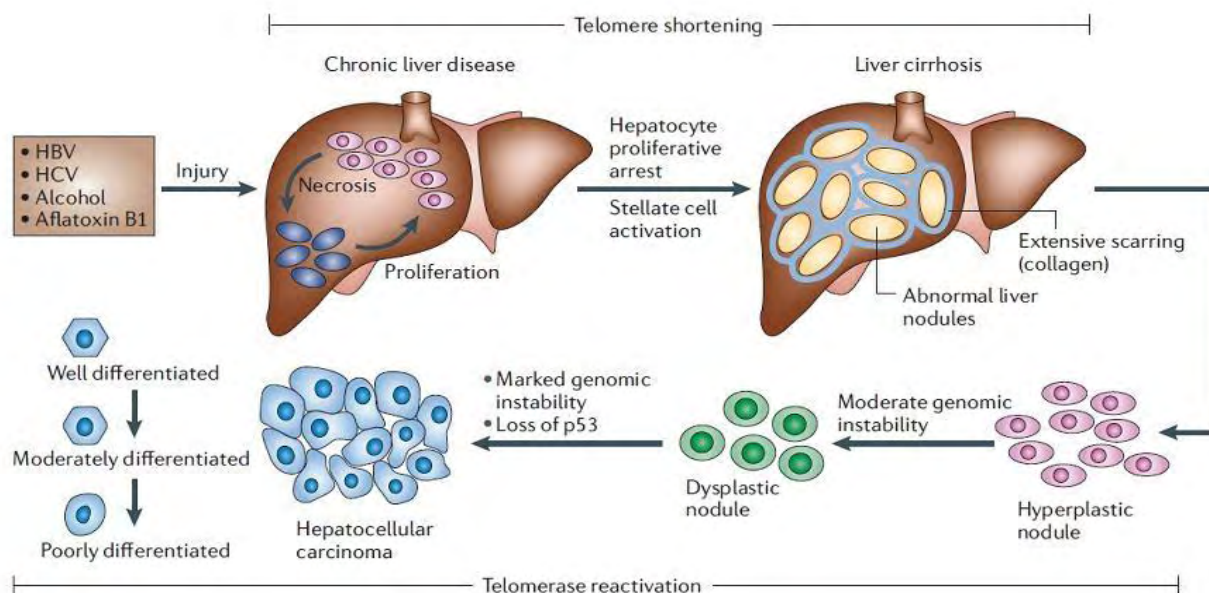
Εκτός των κύριων αιτιών που αναφέρθηκαν, έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία και κάποιες άλλες αιτίες που συμβάλουν στην ηπατοκαρκινογένεση σε λιγότερο ωστόσο ποσοστό:

- μακροχρόνια χρήση **αντισυλληπτικών** στις γυναίκες. (Thorgeirsson, S. S. and Grisham, J. W 2002).
- **μεταβολικές διαταραχές** όπως α) η κληρονομική αιμοχρωμάτωση η οποία σχετίζεται με την αύξηση απορρόφησης του σιδήρου από το ήπαρ και η ηπατοκυτταρική ζημιά (Badvie, S. 2000). β) Η όψιμος δερματική πορφυρία, η οποία σχετίζεται επίσης με την αυξανόμενη πρόσληψη σιδήρου στο ήπαρ και σε κάποιες περιπτώσεις έχει συνδεθεί με λοίμωξη νέκρωση και ίνωση του ήπατος (Badvie, S.(2000) (Sarkany, R. P 2001). γ) Ανεπάρκεια της α1- αντιτρυψίνης, η οποία εμπλέκεται στην αυξημένη εμφάνιση των πολυμερών αντιτρυψίνης στο ήπαρ τα οποία προκαλούν ηπατοκυτταρικό θάνατο και κίρρωση (Badvie, S. 2000) (Parfrey, et al. 2003). δ) Η Κληρονομική τυροσιναιμία που εμπλέκεται στον ελαττωματικό μεταβολισμό της τυροσίνης που έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη τοξικών μεταβολιτών στο ήπαρ με πιθανές μεταλλαξιогόνες ιδιότητες (Tanguay, R. M, et al. 1996).
- **διαβήτης**: Μεγάλο ποσοστό περιστατικών ΗΚΚ έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με διαβήτη χωρίς προηγούμενο ιστορικό που να αφορά κάποια ασθένεια στο ήπαρ (El-Serag, et al. 2004). Αυτή η προδιάθεση μπορεί να σχετίζεται με τη αντίσταση της ινσουλίνης και σχετίζεται με την αύξηση λιπιδίων και τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ. Αυτή η συσσώρευση των λιπιδίων μπορεί να οδηγήσει σε ηπατοκυτταρικό τραυματισμό, απόπτωση, προαγωγή των κυτοκινών, ελεύθερες ρίζες και τελικά την ανάπτυξη ίνωσης (Farrell, G. C. and Larter, C. Z. 2006).
- **μη αλκοολικές διαταραχές λιπώδους ήπατος** (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) και μη αλκοολικές στεατοηπατίτιδες συμβάλουν στην ανάπτυξη της ίνωσης και της κίρρωσης και για αυτό ίσως συμμετέχουν στο μηχανισμό ανάπτυξης του ΗΚΚ (Farrell, G. C. and Larter, C. Z. 2006) (Adams, L. A. and Angulo, P 2005).

Ιστοπαθολογική εξέλιξη και μοριακά χαρακτηριστικά του ΗΚΚ

Τραυματισμός του ήπατος που συμβαίνει εξαιτίας αιτιών, όπως οι ιοί (HBV, HCV, το αλκοόλ και η αφλατοξίνη B1) καταλήγει σε νέκρωση που ακολουθείται από ηπατοκυτταρικό πολλαπλασιασμό. Συνεχείς κύκλοι αυτής της νέκρωσης και της αναγέννησης καταλήγουν σε χρόνια ασθένεια ήπατος και τελικά σε κίρρωση. Η κίρρωση χαρακτηρίζεται από ανώμαλο σχηματισμό κυττάρων περιτριγυρισμένα από κολλαγόνο και ίνωση. Τελικά παρατηρούνται υπερπλαστικοί κομβώδεις σχηματισμοί, οι οποίοι γίνονται δυσπλαστικοί με τελική κατάληξη το ΗΚΚ, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να καταταχτεί σε πολύ διαφοροποιημένο όγκο και σε φτωχά διαφοροποιημένο όγκο. Ο δεύτερος αντιπροσωπεύει το πιο κακοήγη σχηματισμό του πρόωρου ΗΚΚ.

Εικόνα 1



Hepatocellular Carcinoma pathogenesis: from genes to environment.

Paraskevi A. Farazi and Ronald A. DePinho Hepatocellular (2006).

Σταδιοποίηση

Για τη σταδιοποίηση του ΗΚΚ έχουν προταθεί κατά καιρούς διάφορα συστήματα, όπως το MELD Score, το TNM, η ταξινόμηση Okuda και το BCLC.

Το Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) είναι το σύστημα που χρησιμοποιείται ευρέως για τη σταδιοποίηση του ΗΚΚ. Είναι το μόνο που συμπεριλαμβάνει το μέγεθος του όγκου, την ηπατική λειτουργία και τη γενική κατάσταση του ασθενούς (performance status). Τα κύρια πλεονεκτήματά του είναι ότι συνδυάζει το στάδιο της νόσου με τις διάφορες θεραπευτικές παρεμβάσεις και καθορίζει ακριβέστερα την πρόγνωση της επιβίωσης. Διακρίνει τους ασθενείς σε αυτούς με πρώιμο ΗΚΚ, οι οποίοι μπορούν να λάβουν κάποια μορφή αποτελεσματικής θεραπείας, σε εκείνους με ενδιάμεση ή προχωρημένη νόσο, που θα λάβουν παρηγορητική θεραπεία, και στους ασθενείς τελικού σταδίου με πολύ μικρό χρόνο ζωής. Οι ασθενείς πρώιμου σταδίου είναι αυτοί με καλή ηπατική λειτουργία (Child - Pugh A και B), με μονήρη ΗΚΚ ή μέχρι 3 εστίες με μέγεθος <3 εκ. έκαστη. Μπορούν να θεραπευθούν αποτελεσματικά με χειρουργική εκτομή του όγκου, με μεταμόσχευση ήπατος ή και με χημειοεμβολισμό. Σε αυτό το στάδιο η 5ετής επιβίωση είναι από 50% έως 75% (Dufour JF and Johnson F. 2009).

Μηχανισμός ηπατοκαρκινογένεσης

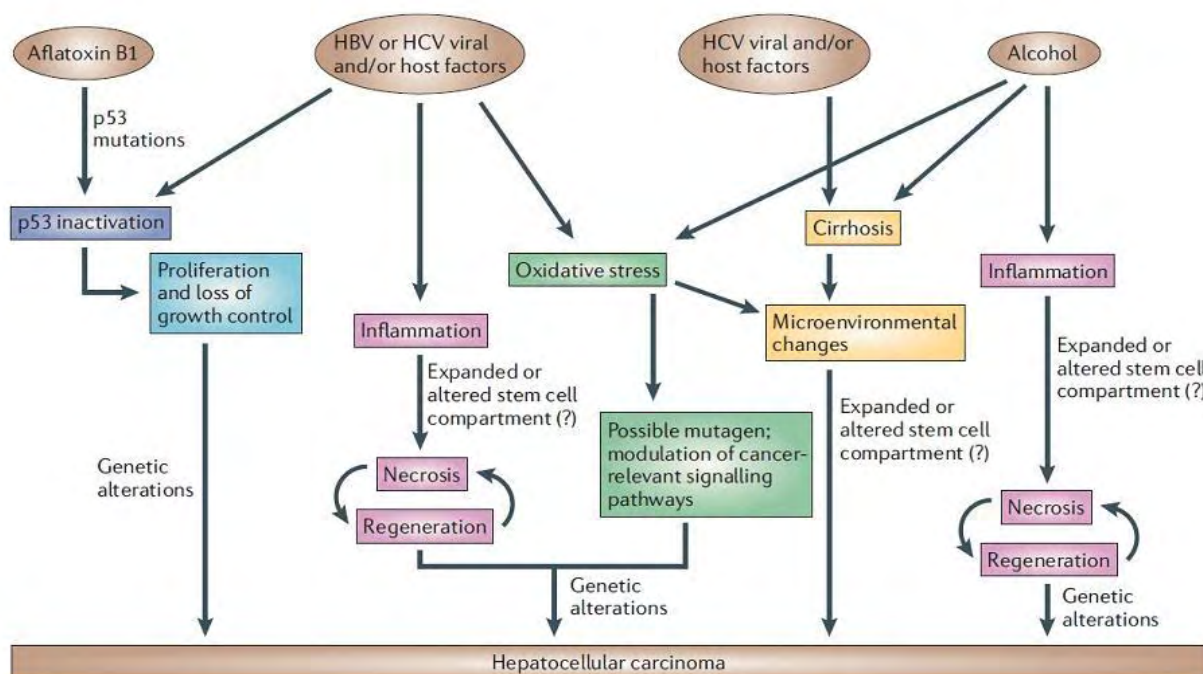
Διάφορα γενετικά γεγονότα σχετίζονται με την ανάπτυξη του ΗΚΚ, όπως η απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού p53, απώλεια ή μετάλλαξη του p53 και γενωμική αποσταθεροποίηση είναι κάποια από τα χαρακτηριστικά της ηπατοκαρκινογένεσης. Η απώλεια ή η μετάλλαξη του p53 φαίνεται ότι πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του ΗΚΚ, ωστόσο υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί επίσης και στα αρχικά στάδια της ηπατοκαρκινογένεσης (Paraskevi A. et al. 2006). Επιπλέον κάποια γονίδια σχετικά με καρκίνο έχουν στοχεύσει σε επιγενετικό επίπεδο (μεθυλίωση) στο ανθρώπινο ΗΚΚ (Paraskevi A. et al. 2006).

Η γονιδιακή αποσταθεροποίηση είναι συχνό φαινόμενο στον ανθρώπινο ΗΚΚ. Ποικίλοι μηχανισμοί θεωρούνται ότι συνηγορούν σε αυτό το γεγονός,

συμπεριλαμβανομένου του εκφύλισμού της τελομεράσης. Η μείωση του μήκους των τελομερών είναι χαρακτηριστικό των χρόνιων ηπατικών ασθενειών και της κίρρωσης. Η αντίδραση της τελομεράσης έχει συσχετιστεί με την ηπατοκαρκινογένεση, με χρωμοσωμικούς ελαττωματικούς διαχωρισμούς και με μεταλλαγές στο DNA. Υπάρχουν πολλές γενωμικές μεταλλαγές στο ΗΚΚ. Συγκρινόμενες μελέτες με την τεχνική του γονιδιακού υβριδισμού έδειξαν κάποιες συχνές χρωμοσωμικές προσθήκες στη περιοχή 1q, 6p, 8q, 11q και 17q, και ελλείψεις στο 1p, 4q, 8p, 13q και 17p. Έχουν γίνει επίσης προσπάθειες να συσχετίσουν οι εν λόγω μεταλλάξεις με διάφορα στάδια του όγκου. Η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων στους ΗΚΚ, έχει οδηγήσει στη μοριακή κατάταξη τους όσον αφορά την πρόγνωση, τις αιτίες και τον ενδοηπατικό υποτροπιασμό. Υπάρχουν πολλές προκλήσεις και ευκαιρίες σε αυτόν τον τομέα έρευνας, συμπεριλαμβανομένου της ανάγκης για περισσότερο λεπτομερή γενωμικό χαρακτηρισμό των ΗΚΚ, βαθιά κατανόηση των μηχανισμών που προκαλούν γενωμική αποσταθεροποίηση, την αλληλεπίδραση ιού-ξενιστή, διαδικασίες στο μικροπεριβάλλον (κίρρωση), η καταγωγή των κυττάρων στην ηπατοκαρκινογένεση, και οι δείκτες που υποδηλώνουν την ύπαρξη της ασθένειας σε πρόωρο στάδιο, ή δείκτες που δείχνουν τον αυξημένο κίνδυνο για μελλοντική εμφάνιση της νόσου. (Paraskevi A. et al. 2006).

Στην εικόνα 2 φαίνονται οι πιο συχνοί μηχανισμοί ηπατοκαρκινογένεσης και οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου. Οι κοινοί μηχανισμοί επισημαίνονται με τη χρήση ίδιου χρώματος. Εκτός από αυτούς τους μηχανισμούς, ο ιός της ηπατίτιδας Β και η αφλατοξίνη Β1 έχουν το κοινό γνώρισμα ότι επηρεάζουν το γονιδίωμα, αφού το γενετικό υλικό του ιού HBV ενσωματώνεται μέσα στο γονιδίωμα του ξενιστή ενώ η αφλατοξίνη Β1 είναι μεταλλαξιογόνος.

Εικόνα 2



Hepatocellular Carcinoma pathogenesis: from genes to environment.

Paraskevi A. Farazi and Ronald A. DePinho Hepatocellular (2006).

Επιρροή του ιού HBV στην ανάπτυξη του ΗΚΚ

Ο ιός HBV και η χρόνια ηπατίτιδα Β αυξάνουν τον κίνδυνο να αναπτύξει κανείς ΗΚΚ. Ο HBV είναι ένας ιός που ενσωματώνει το γενετικό του υλικό στο γονιδίωμα του ξενιστή, γι'αυτό αυξάνει την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης HBxAg, η οποία μπορεί να απορρυθμίσει πολλά μονοπάτια που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των κυττάρων και να οδηγήσει τελικά σε καρκινογένεση. (Ambreen Ayub, et al. 2013).

Η ενσωμάτωση του DNA του ιού στο γονιδίωμα του ξενιστή παρεμποδίζει την λειτουργία κάποιων γονιδίων τα οποία είναι απαραίτητα για την διαφοροποίηση και την ανάπτυξη του κυττάρου. Η πιθανότητα να πάθει

κανείς ΗΚΚ από τον ιό είναι ανάλογη με το ποσοστό της ενσωμάτωσης του DNA του ιού στο γονιδίωμα του ηπατικού κυττάρου-ξενιστή (Gao B, et al. 2004). Η ενσωμάτωση του DNA του HBV μέσα στα ηπατοκύτταρα είναι ένα βήμα που οδηγεί σε χρόνια ηπατίτιδα Β που τελικά οδηγεί σε ΗΚΚ (Egger D, et al. 2002). Καθώς το DNA ενοποιείται επανακαθορίζει τόσο τα γονίδια του ξενιστή, όσο και τα ιογενή γονίδια οδηγώντας σε παραγωγή αλλαγμένων πρωτεϊνών κάνοντας τα ηπατοκύτταρα περισσότερο ευαίσθητα (Gosert R, et al. 2003). Η εισαγωγή του ιογενούς γονιδιώματος έχει ως αποτέλεσμα την απάλειψη χρωμοσωμάτων και άλλες γενωμικές αλλαγές και οδηγεί σε μία αστάθεια του γονιδιώματος (Gosert R, et al. 2002), η οποία μπορεί να ενεργοποιήσει μονοπάτια που οδηγούν στην ανάπτυξη του ΗΚΚ (Jones D.M, et al. 2010).

Έρευνες αποκάλυψαν ότι οι πρωτεΐνες HBx και hepatitis B spliced protein (HBSP) και το γονίδιο preS2/S, βρίσκονται πιο συχνά σε μολυσμένα από τον ιό κύτταρα. Έχει αποδειχτεί ότι αυτές οι πρωτεΐνες του HBV έχουν επίδραση σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες ενώ κάποια από αυτά τα γονίδια μπορεί να προωθήσουν κακοήθεις μεταλλάξεις στα ηπατοκύτταρα. (Op De Beeck A, et al. 2001) (Ron D. et al. 2007). Έχει βρεθεί ότι επικρατεί μια αύξηση της απαλοιφής αυτού του γονιδίου pre-S σε ασθενείς με ΗΚΚ (Cox J.S, et al. 1993). Έχει επίσης προταθεί ότι υπάρχει μια ισχυρή σύνδεση μεταξύ της απαλοιφής του γονιδίου και της ανάπτυξης ΗΚΚ (Credle J.J. et al. 2005). Το κομμένο γονίδιο pre-S2/S του ιού HBV αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του οξειδωτικού στρες και την καταστροφή του DNA, οδηγώντας σε ΗΚΚ (Zhou J. et al. 2006) και (Calfon M, et al. 2002). Η πρωτεΐνη HBSP έχει βρεθεί πιο συχνά σε σχέση με άλλες πρωτεΐνες σε ασθενείς που πάσχουν από HBV και μπορεί να συσχετισθεί με την εμφάνιση ΗΚΚ (Yoshida H, et al 2006), αφού η παρουσία της σχετίζεται και με την επιμονή του ιού (Niwa M, et al. 2005).

Το γονίδιο του ιού της ηπατίτιδας Β HBx παίζει βασικό ρόλο στην ανάπτυξη ΗΚΚ (Yoshida H, et al. 2001) αφού, εκτός από την προαγωγή ενός τεράστιου αριθμού λοιμώξεων (Zhang K, et al 2005) (Shen J, et al. 2002) (Harding H.P,

et al 2005), προάγει την εισαγωγή των ηπατοκυττάρων στον κυτταρικό κύκλο (Chen X, et al. 2002). Αυτό αποδεικνύεται από μελέτες που δείχνουν κύτταρα που δεν διπλασιάζονται μπαίνουν στη διαδικασία κυτταρικού κύκλου μέσω της έκφρασης της πρωτεΐνης HBx στα επιμολυσμένα κύτταρα (Ye J, et al. 2002).

Η HBx βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα διεγείρει το μονοπάτι της κινάσης C (PKC) και άλλες πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται από το στρες, οι οποίες είναι Jun N-terminal kinase, αναστολείς Kappa B Kinase (IKK), Janus kinase/STAT, Phosphoinositide 3-kinase (PI-3-K) και η πρωτεΐνη kinase B/Akt. Η πρωτεΐνη HBx μπορεί επίσης να ανιχνευθεί στα μιτοχόνδρια των μολυσμένων κυττάρων, όπου αυξάνει την έκφραση μορίων της οικογένειας Bcl-2 (Zheng Y, et al. 2005) και αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΗΚΚ. Διαφορετικές μελέτες δείχνουν ότι η πρωτεΐνη HBx λειτουργεί σε συνεργασία με κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες (Zhao P, et al. 2012), οι οποίοι αυξάνουν το μετασχηματισμό στα ηπατικά κύτταρα προκαλώντας όγκους ή καρκίνο (von dem Bussche A, et al. 2010) (Chan S.W, et al. 2005) (Pavio N, et al. 2003) (Wakita T, et al. 2005) (Sir D, et al. 2008). Γι'αυτό οι μελέτες απέδειξαν ότι η έκφραση του HBV X γονιδίου στα ηπατοκύτταρα είναι ένας θετικός δείκτης του ΗΚΚ. Έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη bone morphogenetic protein (BMP-9) παίζει ένα σημαντικό ρόλο στους όγκους. (Ke P.Y, et al. 2011). Ενώ η BMP4 και BMP7 είναι αυξανόμενες στην κίρρωση, η BMP4 και BMP7 μαζί με το SRC είναι ακόμα πιο αυξημένες στο ΗΚΚ (Saeed M, et al. 2011). Γι αυτό η BMP σχετίζεται με το βαθμό διήθησης του ΗΚΚ. Πίνακας 1.

Καθώς η πρωτεΐνη HBx αυξάνει τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Raf, η GTP δίνει την Ras και την φωσφορυλιωμένη τυροσίνη και ενεργοποιεί την MAP κινάση που τελικά οδηγεί στον σχηματισμό του ΗΚΚ στα ηπατοκύτταρα. (Joyce M.A, et al. 2009). Η HBx μπορεί να παρακινήσει τα μονοπάτια που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και της απόπτωσης (Asselah T, et al. 2010).

Επίσης, η HBx βρέθηκε ότι σχετίζεται με πολλά άλλα στοιχεία του βασικού μεταγραφικού μηχανισμού συμπεριλαμβανομένων του μεταγραφικού

παράγοντα TFIIIB, του μεταγραφικού παράγοντα TFIIH, της πρωτεΐνης the TATA-binding protein (TBP) και του μορίου RPB5 της RNA πολυμεράσης (Deretic V, et al. 2009) (Mizushima, et al. 2008) (Kroemer G, et al. 2010). Τέλος, η HBx έχει την ικανότητα να αναστείλει το ογκοκατασταλτική λειτουργία του pRb και αυξάνει την μεταγραφική δραστηριότητα E2F που είναι ένας θετικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου (Matsunaga K, et al. 2010) ενώ ταυτόχρονα παρεμποδίζει τον κυτταρικό θάνατο που ρυθμίζεται από την p53, TNF, Fas και TGF-β (Axe E.L, et al. 2008) (Fujita N, et al. 2008).

Πίνακας 1

Γονίδια που υπερεκφράζονται κατά τον ΗΚΚ που αναπτύσσεται μετά από μόλυνση με HBV.

Table 1		
Genes upregulated during HBV-induced Hepatocellular Carcinoma		
Gene name	Genes up-regulated during HCC	
	Gene	Function
B-cell lymphoma/leukemia 2	BCL2	Apoptosis-related genes
Baculoviral IAP repeat containing 5 (survivin)	BIRC5	Cell cycle, regulation, apoptosis inhibitor
Cyclin D1	CCND1	Regulators of CDK kinases, interact with tumor suppressor gene
CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR	Apoptosis-related genes
Type II keratin Kb8	KRT8	Cytoskeletal organization, cirrhosis
Ribosomal protein S5	RPS5	Protein synthesis

HBV Induced HCC: Major Risk Factors from Genetic to Molecular Level
Ambreen Ayub, Usman Ali Ashfaq and Asma Haque (2013).

Μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον ιό του HBV

Πολλά μονοπάτια του ανοσοποιητικού συστήματος ενεργοποιούνται κατά την διάρκεια της λοίμωξης από HBV. Η απορρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών όπως MAPKs, p53, Sex steroid, Wnt/β-κατενίνη, αυξητικός παράγοντας transforming growth factor beta (TGFβ) β), PI3K/AKT, κυτοκίνες, IKK/nuclear factor kappa B (NF-κB) και Hh (Hedgehog), βρέθηκαν να σχετίζονται πολύ στενά με την ανάπτυξη ΗΚΚ. Αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια κυρίως οδηγούν στην μείωση της έκφρασης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και στη αύξηση της έκφρασης των ογκογονιδίων (Sanchez V, et al. 2008) Εικόνα 3. Έχει μελετηθεί ότι και οι δύο κυτοκίνες LT α και β και υποδοχείς τους LTβR είναι υπερεκφρασμένες στον HBV που αυξάνει τον ΗΚΚ (Izumi T, et al. 2010). Στον ΗΚΚ το γονίδιο DNA binding protein 1-like gene (CHD1L) συχνά ενισχύεται. Το εν λόγω γονίδιο σχετίζεται με την μετάσταση με το να αυξάνει την μετανάστευση των κυττάρων του όγκου. Μελέτες δείχνουν ότι η μετάβαση από το επιθήλιο στο μεσέγχυμα μέσω των μορίων CHD1L-ARHGEF9-Cdc42- epithelial-mesenchymal transition (EMT) μπορεί να είναι ένα νέο μονοπάτι το οποίο σχετίζεται με την μετάσταση και την εξέλιξη του ΗΚΚ (Munakata T, et al. 2005). Επίσης, το επίπεδο της IL6 βρέθηκε να είναι αυξημένο στα κύτταρα του ΗΚΚ που αποδεικνύει ότι ερεθιστικές κυτοκίνες παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του ΗΚΚ (Ke P.Y, et al. 2011). Το επίπεδο της IL6 μπορεί ίσως να προβλέψει την αλλαγή από ιογενή ηπατίτιδα σε καρκίνωμα στους ανθρώπους (Munakata T, et al. 2007) εξαιτίας της ενεργοποίησης του σήματος Hh, αφού έχει καταγραφεί ότι η έκφραση του HBx και του Hh συσχετίζονται στις ανθρώπινες ηπατικές καρκινικές σειρές. (McGivern D.R, et al. 2009) Πίνακας 2.

Πίνακας 2

Γονίδια που υπο-εκφράζονται κατά τον ΗΚΚ που αναπτύσσεται μετά από μόλυνση με HBV

Table 2			
Genes down regulated during HBV induced hepatocellular carcinoma			
Genes Down regulated during HCC:			
Gene	Gene name	Activated by	Function
BID	BH3 interacting domain	HBx protein	Cell death regulation
P53	Protein 53	HBx	Tumor suppressor
p21WAF1	Protein 21	HBx	Stress response, acts with p53
IGFBP3	Insulin-like growth factor-binding protein 3	HBx	
CASP8	Caspase 8	HBV	Apoptosis-related cysteine peptidase
CDKN1A/p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	HBV	Inhibits the activity of cyclin-CDK2
DLC1	Deleted in liver cancer 1	HBV	Tumor suppressor, cell growth, and p

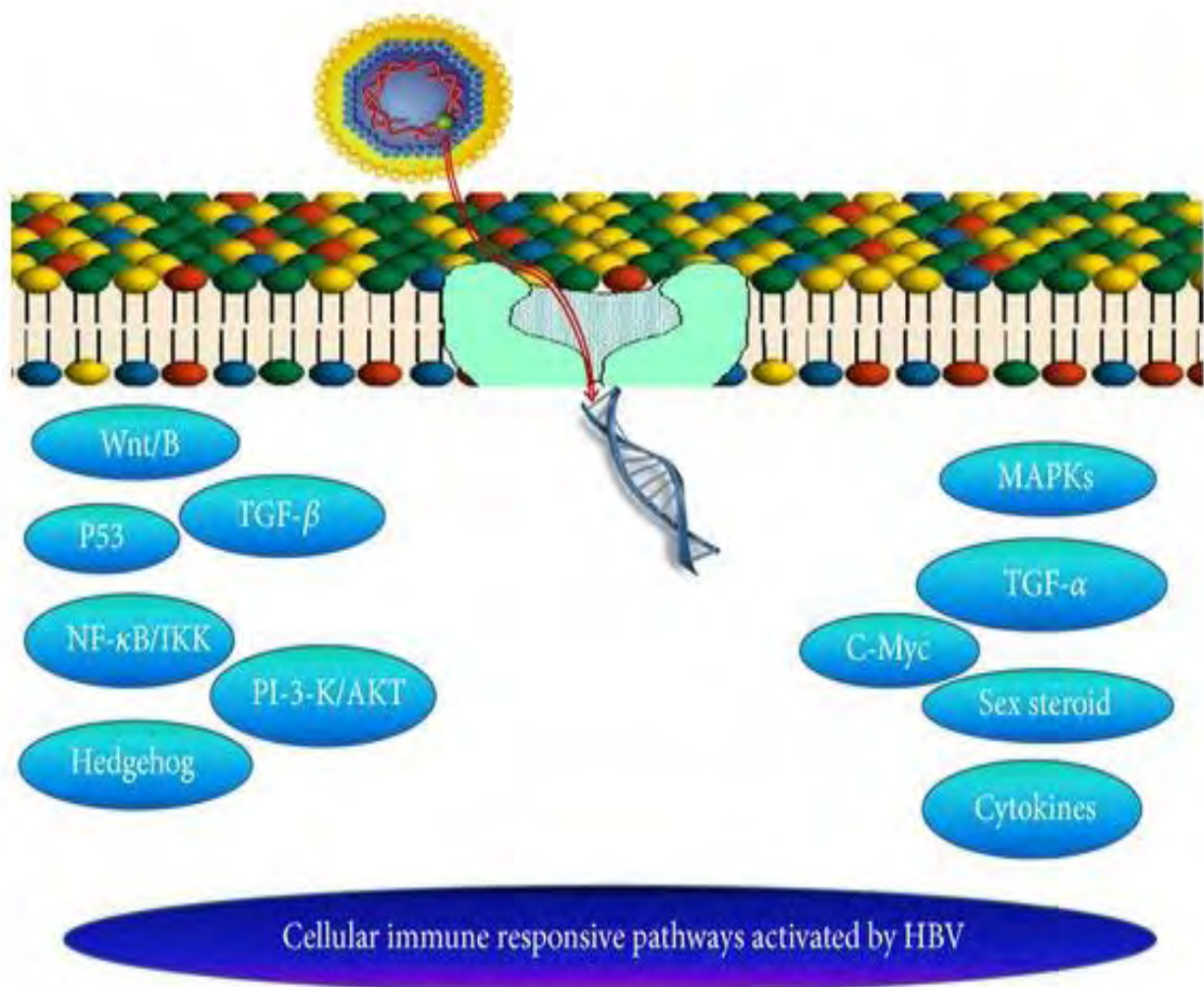
HBV Induced HCC: Major Risk Factors from Genetic to Molecular Level
Ambreen Ayub, Usman Ali Ashfaq and Asma Haque (2013).

Είναι επίσης ενδιαφέρον να τονιστεί ότι ο παράγοντας TGF- β μελετήθηκε σε ασθενείς με ΗΚΚ προκαλούμενο από μόλυνση με HBV και φαίνεται να εμπλέκεται ενεργά στην εμφάνιση κίρρωσης του ήπατος. Μια μελέτη έδειξε ότι το LSF είναι μεσολαβητής του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch (Lai C.K, et al. 2008). Επίσης βρέθηκε ότι μεταγραφική απενεργοποίηση του p15 και p16 γονιδίων συμμετέχει στην ηπατοκαρκινογένεση. Η απενεργοποίηση των γονιδίων p15 and p16 μπορεί να προκαλείται από 5' CpG στο αρχικό ηπατικό καρκίνωμα (Ariumi Y, et al 2008). Τα επίπεδα έκφρασης vimentin και IQGAP1 αυξάνονται σημαντικά σε όλη την ηπατοκαρκινογένεση παρέχοντας ακόμα ένα στόχο για θεραπεία του καρκινώματος (Dhillon A.S, et al. 2007). Επομένως η στόχευση των μορίων- κλειδιών στα ογκογονιδιακά

σηματοδοτικά μονοπάτια μπορεί να αποτελέσει μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία του ΗΚΚ (Ambreen Ayub, et al. 2013).

Εικόνα 3

Η κυτταρική ανοσοαπάνταξη των μονοπατιών που ενεργοποιούνται από τον HBV



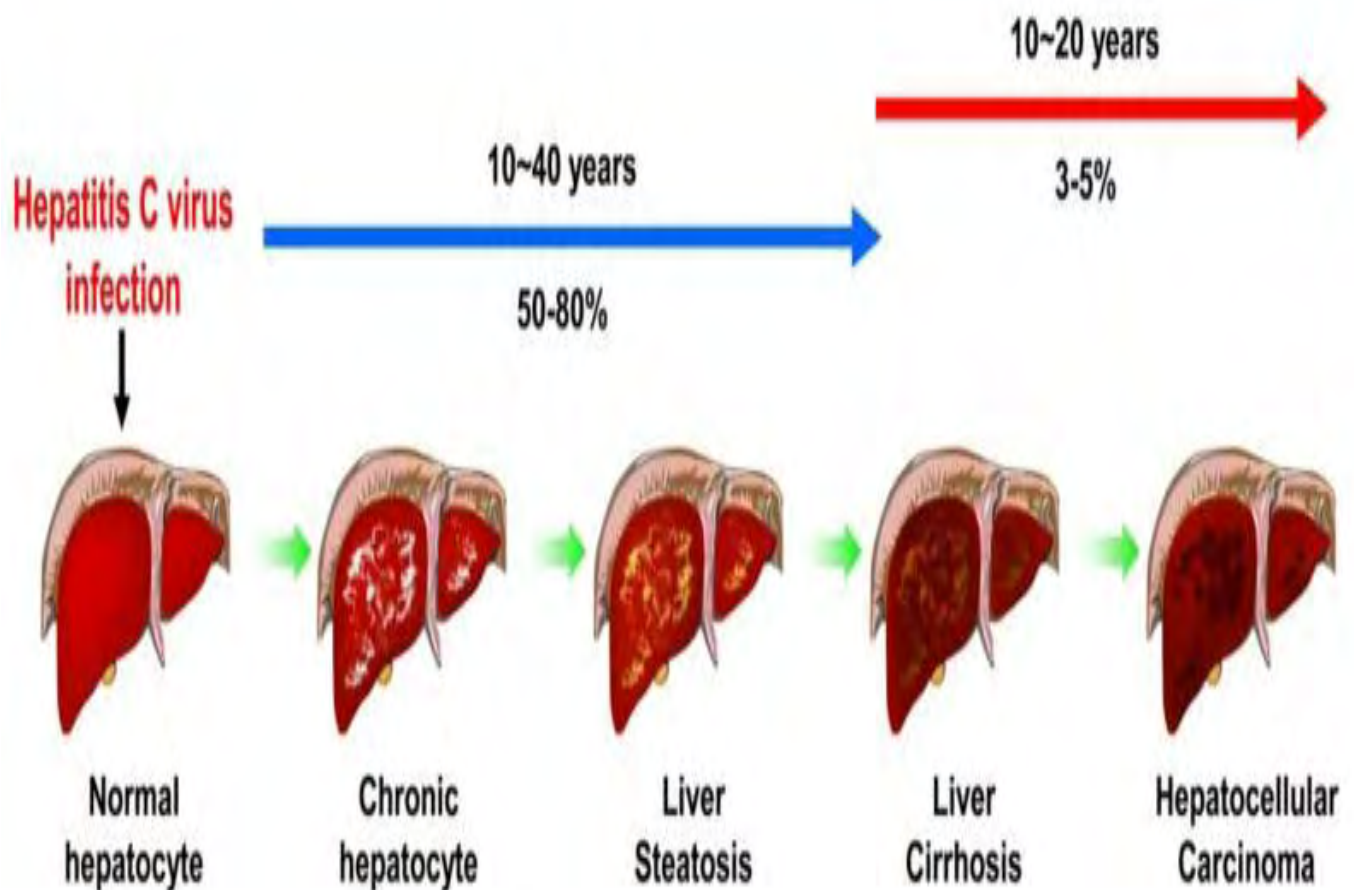
HBV Induced HCC: Major Risk Factors from Genetic to Molecular Level
Ambreen Ayub, Usman Ali Ashfaq and Asma Haque (2013).

Πως ο HCV επηρεάζει την ανάπτυξη του ΗΚΚ

Ο HCV είναι μια πρόκληση της δημόσιας υγείας, με περίπου 3% παγκοσμίως μολυσμένους από τον ιό. Η πλειοψηφία (50-80%) γίνονται χρόνιοι ασθενείς της ηπατίτιδας και αναπτύσσουν προοδευτικά στεατοηπατίτιδα, ίνωση του ήπατος και τελικά 3-5% από τους ασθενείς καταλήγει σε ΗΚΚ (Zoulim F, et al. 2002). Εικόνα 4.

Εικόνα 4

Πως ο ιός της ηπατίτιδας C, καταλήγει σε ΗΚΚ



Hepatitis C Virus and Cellular Stress Response: Implications to Molecular Pathogenesis of Liver Diseases. Po-Yuan Ke and Steve S.-L. Chen (2012).

Διαφορές του HCV από τον HBV σε σχέση με την ανάπτυξη ΗΚΚ

Υπάρχουν 3 διαφορές του ιού HCV από τον HBV που σχετίζονται με την ηπατοκαρκινογένεση.

1. ο ιός HCV έχει την τάση να σχηματίζει και να διατηρεί τις χρόνιες λοιμώξεις, 60-80% έναντι 10% του HBV (Rehermann, B. and Nascimbeni M 2005). Αυτό σχετίζεται με την ικανότητα του HCV να αποφεύγει τις ανοσολογικές απαντήσεις του οργανισμού εξαιτίας των πολλών λαθών (Weiner, A, et al. 1995) που συμβαίνουν κατά τον διπλασιασμό του ιού και τη δημιουργία νέων τύπων του ιού.
2. ο ιός HCV έχει την τάση να προκαλεί πιο συχνά κίρρωση και ως εκ τούτου να οδηγεί σε ΗΚΚ (Paraskevi A. et al. 2006).
3. εφόσον ο HCV είναι ένας RNA ιός, χωρίς μετατροπή του RNA σε DNA δεν μπορεί να ενσωματωθεί μέσα στο γονιδίωμα του ξενιστή (Rehermann, B. και Nascimbeni M. 2005).

Τόσο οι ιικοί όσο και οι παράγοντες του ξενιστή φαίνεται ότι συμβάλουν στην ανάπτυξη του ΗΚΚ (Block, T. M, et al 2003) όπως ανάλογα συμβαίνει και στη περίπτωση HBV (Paraskevi A. et al. 2006).

Μία θεωρία έχει προτείνει ότι ο ΗΚΚ εξαιτίας του HCV σχετίζεται με τους συνεχείς κύκλους ηπατικών κυττάρων εξαιτίας της ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού στα μολυσμένα κύτταρα και της αναγέννησης που έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση και διάδοση μεταλλάξεων (Paraskevi A. et al. 2006).

Η πυρηνική πρωτεΐνη και η μη δομική NS5A ενοχοποιούνται για την αποφυγή του ιού από το ανοσοποιητικό σύστημα και από άλλους παράγοντες που σχετίζονται με αυτή τη διαδικασία όπως οι tumor necrosis factor- α (TNF α υποδοχέας), ιντερφερόνη α (IFN α) κλπ (Park, K.J, et al. 2003) (Melen, K, et al 2004). Επιπλέον οι πρωτεΐνες NS3 και NS4A του ιού HCV χρησιμοποιούν τη πρωτεάση για να κόβουν διάφορα μόρια τα οποία ως ακέραια αποτελούν σήμα για ανοσολογική απάντηση (Foy, E, et al. 2005) (Li, K, et al. 2005).

Ο HCV χρησιμοποιεί το ενδοπλασματικό δίκτυο ως μέρος της διαδικασίας του διπλασιασμού του και μπορεί να προκαλέσει ενδοπλασματικό στρές. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι οι πυρηνικές πρωτεΐνες του ιού αλληλεπιδρούν με στοιχεία του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK (όπως ERK, MEK και Raf) και για αυτό τροποποιούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. (Hino, O, et al. 2002) (Macdonald, A. et al. 2003).

Η πρωτεΐνη NS5A επηρεάζει τα μονοπάτια που ρυθμίζουν την p53 που ελέγχει τη εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική επιβίωση, ανταπόκριση στα υποξικά και γενοτυπικά στρές και στην αγγειογένεση του όγκου (Majumder, M, et al. 2001). Η καρκινογενής προοπτική των πυρηνικών πρωτεϊνών του ιού της ηπατίτιδας C υποδεικνύεται από την ανάπτυξη ηπατικής στεάτωσης, της προαγωγής των reactive oxygen species (ROS) και της ανάπτυξης του ΗΚΚ (Paraskevi A. et al. 2006).

Η αφλατοξίνη B1 προάγει την ηπατοκαρκινογένεση

Οι αφλατοξίνες, οι οποίες είναι μεταβολίτες των μυκήτων *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*, είναι συχνά συστατικά σε πολλά βασικά είδη διατροφής και ειδικά στο καλαμπόκι και σε ξηρούς καρπούς. Η μόλυνση των τροφών συμβαίνει κατά την διάρκεια της ανάπτυξης και είναι αποτέλεσμα της αποθήκευσης των τροφών σε ανεπαρκείς ή ακατάλληλες εγκαταστάσεις. Αυτές οι τοξίνες αποτελούν σοβαρό δημόσιο κίνδυνο, συμπεριλαμβανομένου της πρόκλησης ΗΚΚ από την αφλατοξίνη B1. Το αβλαβές αρχικό μόριο του μύκητα μετατρέπεται από πρωτεΐνες p450 σε μεταλλαξιογενή και καρκινογενή μεσολαβητή (Kew MC. 2013).

Η αφλατοξίνη-B1 μετατρέπεται σε αφλατοξίνη B1-8,9 η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται στο παράγωγο 8,9-διυδροξύ-8-(N7) γουανίλ-9-διυδροξύ αφλατοξίνη B1. Αυτό το παράγωγο μεταβολίζεται σε αφλατοξίνη B1 φορμαμινοπυριμιδίνη, που είναι μεταλλαξιογενής και καρκινογενής. Επιπλέον η μετάλλαξη αργινίνης σε σερίνη στο κωδικόνιο 249 του p53 ογκοκατασταλτικού γονιδίου που προκαλείται, αναστέλλει τη λειτουργία του ογκοκατασταλτικού γονιδίου και έτσι συμβάλει στην ηπατοκαρκινογένεση. Η

αφλατοξίνη Β1 δρα συνεργατικά με την ηπατίτιδα Β στην πρόκληση ΗΚΚ. Ένας αριθμός αλληλεπιδράσεων των καρκινογενών μπορεί να είναι υπεύθυνος για αυτή την κατάληξη, συμπεριλαμβανομένου της ενσωμάτωσης του γονιδίου Χ της ηπατίτιδας Β και των συνεπειών του, παρεμβολή στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς DNA, ενεργοποίηση του p21waf1/cip1, γένεση DNA μεταλλάξεων, και μεταλλαγμένες μεθυλιώσεις των γονιδίων (Kew MC. 2013).

Προαγωγή ηπατοκαρκινογένεσης από το αλκοόλ

Το αλκοόλ είναι ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας ανάπτυξης ΗΚΚ. Τα προηγούμενα χρόνια αυξημένα περιστατικά ΗΚΚ επιβεβαίωσαν ότι το αλκοόλ επιφέρει πολλές επιγενετικές αλλαγές που έχουν αντίκτυπο στο γαστροοισοφαγικό και στο ηπατικό σύστημα. Τα κύρια γεγονότα είναι η μεθυλίωση του DNA, κάποιες συγκεκριμένες τροποποιήσεις σε διαφορετικές περιοχές των ιστονών, και στα microRNAs. Σε αυτές τις ανταποκρίσεις ενοχοποιούνται ο μεταβολισμός της αιθανόλης, σηματοδοτικές ενζυμικές αντιδράσεις και το οξειδωτικό στρες. Επιπλέον η αιθανόλη προάγει την στεατοηπατίτιδα και την εξέλιξη της σε ΗΚΚ (Shivendra D. Shukla and Robert W. Lim. 2013).

Χρόνια κατανάλωση αλκοόλ έχει ενοχοποιηθεί για την παραγωγή φλεγμονωδών κιτοκινών μέσω της μονοκυτταρικής ενεργοποίησης (McClain, et al. 2002), οδηγώντας σε αυξημένη συγκέντρωση ενδοτοξινών, ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer τα οποία απελευθερώνουν πολλές χημειοκίνες και κιτοκίνες (συμπεριλαμβανομένου της TNFα, την ιντερλευκίνη-1β IL1β, IL6, και προσταγλανδίνη E2) με δυσμενείς αποτελέσματα για την επιβίωση των ηπατοκυττάρων. Σε χρόνια έκθεση σε αιθανόλη τα ηπατοκύτταρα δείχνουν αυξημένη ευαισθησία στη κιτοτοξική επίδραση του TNFα (Hoek, J. B. and Pastorino, J. G. 2002), το οποίο στήνει το σκηνικό για μία ακολουθία γεγονότων όπως ηπατοκυτταρική καταστροφή-αναγέννηση, ενεργοποίηση των αστεροειδών ηπατικών κυττάρων, κίρρωση και τέλος ΗΚΚ (Paraskevi A. et al. 2006).

Το αλκοόλ επίσης προκαλεί βλάβες στο ήπαρ μέσω του μηχανισμού του οξειδωτικού στρες. Στην αλκοολική ηπατίτιδα υπάρχει αυξημένη ισοπροστανίνη που είναι ένας δείκτης της περοξείδωσης των λιπιδίων (McClain, et al. 2002).

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να συμβάλει στην ηπατοκαρκινογένεση με διάφορους τρόπους:

1. προάγοντας την ανάπτυξη της ίνωσης και κίρρωσης. Καθώς τα αστεροειδή ηπατικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για τη συσσώρευση κολλαγόνου στο τραυματισμένο ήπαρ, είναι αξιοσημείωτο ότι προαγωγή του οξειδωτικού στρες μπορεί να προκαλέσει αύξηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού και σύνθεση κολλαγόνου, τα οποία είναι χαρακτηριστικά γνωρίσματα της ίνωσης (Comporti, M, et al. 2005).
2. επηρεάζοντας σηματοδοτικά μονοπάτια σχετικά με τον HKK όπως η μείωση της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) και ενεργοποίησή της μεταγραφής 1) στο να μειώσει την απευθείας ενεργοποίηση του IFN γ σήματος και της απώλειας της προστατευτικής δράσης του IFN γ με επακόλουθη ηπατοκυτταρική ζημιά. (Osna,N.A, et al. 2005).
3. συσσωρεύοντας ογκογενείς μεταλλάξεις. Αυξημένο οξειδωτικό στρες σχετίζεται με αυξημένο φορτίο σιδήρου, το οποίο σχετίζεται με μεταλλάξεις του p53 καταλήγοντας σε HKK (Marrogi, A.J. et al. 2001).
4. συρρικνώνοντας το μήκος των τελομερών, τα οποία με τη σειρά τους τροφοδοτούν την ανάπτυξη της κίρρωσης της χρωμοσωμικής αποσταθεροποίησης και τελικά της κατάληξης σε HKK (Paraskevi A. et al. 2006).

Επίσης, η τροποποίηση των ιστόνων, η μεθυλίωση του DNA και η έκφραση των miRNA μπορούν να συμβάλουν συνδυαστικά μαζί με την αιθανόλη στην προαγωγή αυτών των καταστάσεων. Για παράδειγμα , η αιθανόλη μπορεί να επηρεάσει την δραστηριότητα των ενζύμων που ονομάζονται ακετυλομεταφοράσες ιστονών histone acetyl transferases (HATs) που

μεσολαβούν στην ακετυλίωση των ιστόνων. Ένα από αυτά τα HATs το οποίο ονομάζεται GCN5 (Choudhury et al. 2011), μετριάζει την έκφραση της πρωτεΐνης η οποία ονομάζεται PGC1β, που σχετίζεται στον μεταβολισμό του λίπους στο ήπαρ (Kelly et al. 2009). Επιπλέον, σε μία ενδογαστρική διατροφή αιθανόλης σε αρουραίους οδήγησε σε αύξηση επιπέδων ενός ακόμα HAT, το οποίο οδήγησε σε αυξημένη ακετυλίωση του H3-lys-9 (Bardag-Gorce et al. 2007).

Ακόμη ένας τύπος ενζύμων που τροποποιούν τις ιστόνες είναι οι αποακετυλάσες ιστονών (HDACs). Χρόνια διατροφή με υγρή αιθανόλη σε ποντικούς οδήγησε σε χαμηλή ρύθμιση του HDAC SIRT-1 και αύξησε την έκφραση του lipin-1, ο οποίος είναι ένας βασικός ρυθμιστής των λιπιδίων στο συκώτι (Yin et al. 2012). Εν αντιθέσει άλλες μελέτες έδειξαν ότι τα μεταγραφικά επίπεδα των SIRT-1 και PGC1β, τα οποία είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων αυξάνονται σε χρόνια ενδογαστρική διατροφή αιθανόλης σε ποντικούς (Oliva et al. 2008). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι σε συγκεκριμένα knockout γονίδια τα οποία κωδικοποιούν την HDAC3 σε ποντίκια, οδήγησε σε σοβαρή ηπατική στεάτωση και αυξημένη έκφραση των λιπογενών γονιδίων (Sun et al. 2011). Ως εκ τούτου υπάρχουν πολλά στοιχεία τα οποία, υποδεικνύουν ότι τόσο τα HATs όσο και τα HDACs παίζουν ρόλο σε έναν τραυματισμό ήπατος που προκαλείται από αιθανόλη (Kirpich et al. 2012) (Park et al. 2005) (Pochareddy et al. 2012) (Shepard et al. 2008) (Yin et al. 2012).

Εκτός από τις αλλαγές στο μεταβολισμό των λιπιδίων δύο μόρια τα οποία εμπλέκονται στις φλεγμονές (ιντερλευκίνη [IL] 8 and PAI-1) επίσης επηρεάζονται από την τροποποίηση των ιστονών που προκαλούνται από την αιθανόλη. Τελικά η υπομεθυλίωση του DNA που προάγεται από την αιθανόλη έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη της στεάτωσης (Kutay et al. 2012), καθώς επίσης και του HKK (Lambert et al. 2011).

Τα miRNAs επίσης μετριάζουν κάποιες από τις επιδράσεις της αιθανόλης που προκαλούν ηπατικές διαταραχές. Για παράδειγμα, η χαμηλή έκφραση του SIRT-1 στα ποντίκια κατά την διατροφή τους με αιθανόλη φαίνεται να μετριάζεται από το miR217 (Yin et al. 2012). Σε μια απεικόνιση 327

ανθρωπίνων miRNAs αναγνωρίστηκαν 11 τα οποία όταν εκφράζονται σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα οδηγούν είτε σε αυξημένα είτε σε μειωμένα ενδοκυτταρικά λιπιδικά σταγονίδια με το miR-181d να αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό αναστολέα των σχηματισμών αυτών των λιπιδικών σταγονιδίων (Whittaker et al. 2010). Η ανοσολογική ανταπόκριση των μακροφάγων του ήπατος θεωρούνται ότι εμπλέκονται με το miR-155 (Bala et al. 2012). Επιπλέον, αρκετά miRNAs είναι υποψήφια ότι παίζουν ρόλο σε βλάβες των εντέρων εξαιτίας της αιθανόλης, τα οποία μπορούν εμμέσως να ερεθίσουν και να προκαλέσουν βλάβες στο συκώτι (Tang et al. 2008).

Ανάπτυξη του ΗΚΚ και σηματοδοτικά μονοπάτια

Για την ανάπτυξη καρκίνου είναι απαραίτητη η απορρύθμιση συγκεκριμένων μοριακών μονοπατιών. Η απορρύθμιση αυτή προκύπτει μετά από την ενεργοποίηση ενός ογκογονιδίου μέσα από σημειακές μεταλλάξεις, αντιγραφή κάποιου αριθμού μεταλλαγών, επιγενετικές αλλαγές ή από την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων η οποία προήλθε από απώλεια της ετεροζυγωτίας, σημειακές μεταλλάξεις, επιγενετική αποσιώπηση, μεταγραφικές αποκλίσεις από επικρατείς αρνητικές πρωτεΐνες (Josep M. et al. 2008).

Τα βασικά «ορόσημα» για την ανάπτυξη του καρκίνου είναι: επάρκεια σημάτων ανάπτυξης, αναισθητοποίηση στα σήματα που αποτρέπουν την ανάπτυξη, αποφυγή απόπτωσης, απεριόριστος αναδιπλασιασμός, αγγειογένεση, εισβολή του όγκου και μεταστάσεις (Josep M. et al. 2008).

Αν και δεν υπάρχει επικρατές μονοπάτι υπεύθυνο για τη δημιουργία του ΗΚΚ, ο πιο σημαντικός μηχανισμός θεωρείται ότι είναι ο κυτταρικός διπλασιασμός. Μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια υπό διαφορετικές συνθήκες, και αλλαγές σε καταλήγουν στην ανάπτυξη του ΗΚΚ (Chiang D, et al. 2008) (Lee JS, et al. 2006) (Boyault S, et al. 2007) (Breuhahn K, et al. 2004).

Οι κυριότερες γενετικές αλλαγές που οδηγούν στην ανάπτυξη ΗΚΚ περιγράφονται παρακάτω:

Δομικές μεταλλάξεις στον ΗΚΚ

Γενωμικές μεταλλάξεις:

Αρκετά γονίδια έχουν βρεθεί ως υποψήφια στη δημιουργία καρκινογένεσης: c-myc (8q), Cyclin A2(4q), Cyclin D1 (11q), Rb1(13q), AXIN1(16p), P53(17p), IGFR-II/M6PR (6q), p16(9p), E-Cadherin (16q), SOCS(16p), και το PTEN(10q). Χρωμοσωμική διεύρυνση ή διαγραφή έχει αναγνωριστεί σε σχεδόν όλους τους όγκους. Η πιο διαδεδομένη διεύρυνση είναι του 1q (58%-78%), 6p, 8q, 17q, και 20q και διαγραφές στο 4q, 8p, 13q, 16q και 17p. Υψηλά επίπεδα διεύρυνσης έχουν εντοπιστεί στο 11q13 και στο 6p21 (Chiang D, et al. 2008).

Μεταλλάξεις

Κάποιες σωματικές μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με ΗΚΚ, ένα πεδίο που αναμένεται να εξελιχθεί στο εγγύς μέλλον με την εισαγωγή της τεχνολογίας throughput sequencing (Villanueva A, et al. 2007). Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53, το οποίο εμπλέκεται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην επιδιόρθωση του DNA στην απόπτωση και στην διαφοροποίηση, είναι μεταλλαγμένο στο 27% των περιπτώσεων. Μεταλλάξεις της β-κατενίνης στο εξώνιο 3 είναι παρούσες στο 17% των περιπτώσεων ΗΚΚ και σε 60% των περιπτώσεων σε ηπατοβλάστωμα. Λιγότερο συχνές μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί στα AXIN1, phosphoinositol 3-kinase A (PI3KA) και στο K-Ras. Αντιθέτως, επικρατείς μεταλλάξεις σε γονίδια άλλων τύπου καρκίνου όπως του epidermal growth factor receptor (EGFR). Her2/nu, phosphatase and tensin homolog (PTEN), ή H-Ras, στον ΗΚΚ είναι οριακές (Josep M. et al. 2008).

Γενωμική αποσταθεροποίηση

Έχει περιγραφεί σε συσχέτιση με τη σμίκρυνση των τελομερών, παρέκκλιση της μεθυλίωσης. Η δραστηριότητα της τελομεράσης αυξάνεται κοντά στο 90% στο ανθρώπινο ΗΚΚ, ενώ μπορεί επίσης να συμβεί ενίσχυση του γονιδίου telomerase RNA component (TERC) ή απώλεια του 10p χρωμοσώματος που είναι μια περιοχή που κωδικοποιεί ένα καταστολέα τελομεράσης (Farazi PA, et al. 2003).

Επιγενετικές αλλαγές

Επιγενετική αποσιώπηση γονιδίων μπορεί να συμβεί από ανώμαλη μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν συγκεκριμένες περιοχές όπου πραγματοποιείται έντονη υπερμεθυλίωση. Η υπερμεθυλίωση επηρεάζει τις CPG νησίδες που εντοπίζονται στη περιοχή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως p16, E-Cadherin, NORE1A, RASSF1, IGFR-II/MP6, BRCA1. Παράγοντες που συμβάλουν στην απομεθυλίωση, επιτρέπουν την επανέκφραση αυτών των γονιδίων και την αποκατάσταση όλων των αντινεοπλασματικών λειτουργιών (Josep M. et al. 2008).

Τα σπουδαιότερα σηματοδοτικά μονοπάτια που απορρυθμίζονται στον ΗΚΚ και σχετίζονται άμεσα με την παθογένεια της νόσου μπορούν να διακριθούν στις ακόλουθες κατηγορίες:

A. Μοριακά σηματοδοτικά μονοπάτια επιβίωσης

A1. Μονοπάτι MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK)

Το μονοπάτι Raf/mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular-signal-regulated kinase (ERK) κυρίως εμπλέκεται στην κυτταρική ανάπτυξη, στην επιβίωση και ρυθμίζει την διαφοροποίηση του κυττάρου. Αυτό το μονοπάτι επάγει κάποιους εξωκυτταρικούς υποδοχείς όπως ο EGFR, ο παράγοντας insulin-like growth factor receptor (IGFR αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας). Η δέσμευση του αυξητικού παράγοντα καταλήγει στην φωσφορυλίωση του υποδοχέα, ένα σχηματισμένο μοριακό σύμπλοκο γνωστό ως GRB2/SHC/SOS. Αυτή η αλληλουχία με τη σειρά της ενεργοποιεί τα μονοπάτια mitogen/extracellular protein kinase (MEK) /ERK/RAF, τα οποία πυροδοτούν μια σειρά ενζυμικών φωσφορυλιωτικών γεγονότων (Avila MA, et al. 2006). Μέσα σε αυτό το μονοπάτι, η GTPάση RAS και η κινάση Raf με δραστικότητα σερίνης-θρεονίνης είναι σηματοδοτικοί ρυθμιστές-κλειδιά (Kolch W, et al. 2000) . Το ενδιαμέσο σήμα ρυθμίζεται από την MEK1 και την MEK2, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση των τελικών καταρροϊκών σηματοδοτικών μορίων ERK

1 και ERK2 (Roberts LR and Gores GJ. 2005). Το ERK1/2 ρυθμίζουν την κυτταρική δραστηριότητα δρώντας σε πάνω από εκατό υποστρώματα στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Επίσης η RAS ρυθμίζει τα μονοπάτια phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), AKT, mTOR, φωσφολιπάση C και την πρωτεΐνη κινάση C (Harden TK and Sondek J. 2006) (MD, et al. 2005). Η αυξημένη ενεργοποίηση των μονοπατιών Raf/MAPK/ERK έχει καταγραφεί στους ΗΚΚ και συσχετίζεται με προχωρημένα στάδια (Huynh H, et al. 2003) (Ito Y, Sasaki Y, et al. 1988). Μηχανισμοί για την αυξημένη δραστηριότητα των σηματοδοτικών μονοπατιών Raf/MAPK/ERK στον ΗΚΚ συμπεριλαμβανομένου και της χαμηλής έκφρασης της πρωτεΐνης που αναστέλλει (ένας καταστολέας των μονοπατιών Raf/MAPK/ERK) προάγεται από τις ιικές πρωτεΐνες της ηπατίτιδας (όπως την X πρωτεΐνη της ηπατίτιδας B και της πυρηνικής πρωτεΐνης της ηπατίτιδας C (Chung TW, et al. 2004) (Erhardt A, et al. 2002) (Lee HC, et al. 2006).

Η στόχευση της Raf κινάσης είναι μία από τις πιο υποσχόμενες προσεγγίσεις στην θεραπεία του ΗΚΚ.

A2. PI3K/AKT/MTOR PATHWAY

Το μονοπάτι PI3K/Akt/Mtor παίζει επίσης ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του κυττάρου, την επιβίωση, την ρύθμιση, και τον μεταβολισμό. (Zhou Q, et al. 2011). Ο δεσμός των αυξητικών παραγόντων (όπως ο IGF και EGF) με τους υποδοχείς τους, ενεργοποιούν το PI3K (Avila MA, et al. 2006). Ακολούθως το P13K παράγει ένα δεύτερο λιπιδικό μεταφορέα τον PIP3b (phospho-inositol trisphosphate) το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί τη σερίνη-θρεονίνη κινάση AKT. Η ενεργοποίηση του AKT φωσφορυλιώνει κάποιες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες όπως mTOR και BLC-2 (Avila MA, et al. 2006).

Η ενεργοποίηση του mTOR αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και η απενεργοποίηση του BAD μειώνει την απόπτωση και αυξάνει τη κυτταρική επιβίωση (Kolch W. 2000). Σε υγιή ιστό, αυτό το μονοπάτι ρυθμίζεται αρνητικά από την ογκοκατασταλτική φωσφατάση που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10 (PTEN) το οποίο στοχεύει στη παραγωγή λιπιδίων του P13K για αποφωσφορυλίωση (Kolch W. 2000).

Η έκφραση τόσο του IGF όσο και των IGF υποδοχέων είναι υψηλή στον ΗΚΚ και στην κίρρωση, καταλήγοντας στην ενίσχυση του μονοπατιού P13K/AKT/mTOR επιπλέον της ενεργοποίησης του μονοπατιού RAF/MEK/ERK και του μονοπατιού Wnt/β κατενίνης (Alexia C, et al. 2004) (Desbois-Mouthon C, et al. 2001). Ανωμαλίες στο PTEN μπορούν να οδηγήσουν σε υπερβολική δραστηριότητα του P13K/AKT/mTOR μονοπατιού στο ΗΚΚ. Η έκφραση του PTEN μειώνεται σχεδόν στις μισές περιπτώσεις του ΗΚΚ (Hu TH, et al. 2003). Επίσης η έκφραση του PTEN σχετίζεται με το βαθμό αύξησης των όγκων, με την πρόοδο της ασθένειας και με το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών με ΗΚΚ (Hu TH, et al. 2003). Σε μια ανάλυση δειγμάτων με μεταλλάξεις ΗΚΚ βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση του IGF μονοπατιού, η αυξημένη ρύθμιση του EGF, η κακή λειτουργία του PTEN, και το αποκλεισμένο mTOR μονοπάτι, εμφανίζονταν στα μισά δείγματα (Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung 2013).

A3. WNT-BETA-CATENIN PATHWAY

Η ανώμαλη ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα β-κατενίνης, ένα στοιχείο κλειδί στο σηματοδοτικό μονοπάτι WNT, φαίνεται ότι διαδραματίζει ένα κύριο ρόλο στην ανάπτυξη του ΗΚΚ. Κατά την κανονική κυτταρική ομοιόσταση οι WNT πρωτεΐνες απουσιάζουν. Η έναρξη του σηματοδοτικού Wnt οδηγεί στην απώλεια φωσφορυλίωσης της β-κατενίνης, το οποίο αποτρέπει τη μείωση της, τότε συσσωρεύεται μέσα στο κυτταρόπλασμα και επανατοποθετείται μέσα στο πυρήνα. Τα ηπατοκύτταρα στα οποία βρίσκεται μέσα στο πυρήνα η β-κατενίνη, παρουσιάζουν ανώμαλο πολλαπλασιασμό και εκφράζουν μια μεμβρανική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στο ΗΚΚ, στην μεταστατική συμπεριφορά και στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Herencia C, et al. 2012). Έχουν παρατηρηθεί υψηλά ποσοστά μετάλλαξης της β-κατενίνης (40%) σε ασθενείς με ΗΚΚ που έπασχαν από ιό ηπατίτιδας C. Περιστατικά ΗΚΚ που συμβαίνουν σε ασθενείς με HBV δείχνουν μία ενεργοποίηση της β-κατενίνης, η οποία προάγεται από μεταλλάξεις εξαιτίας της έκφρασης της πρωτεΐνης HBx (Zhang Y, et al. 2012) (Srisuttee R, et al. 2012). Παράγοντες που στοχεύουν την β-κατενίνη βρίσκονται υπό ανάπτυξη και κάποιες προκαταρκτικές μελέτες έδειξαν ότι υπάρχει προοπτική για πολλά

υποσχόμενες θεραπείες εναντίον του Wnt- β -catenin μονοπατιού (Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung 2013).

B. Σηματοδοτικά μονοπάτια αυξητικών παραγόντων

B1. VEGF/VEGFR, PDGFR ΚΑΙ FGFR

Η υγιής αγγειογένεση συντηρείται από την ισορροπία μεταξύ προαγγειογενών και αντιαγγειογενών παραγόντων (Semela D, Dufour JF. 2004). Αυτή η ισορροπία διαταράσσεται στον ΗΚΚ. Η αγγειογένεση είναι σημαντική για την ανάπτυξη και την μετάσταση του ΗΚΚ και συμβαίνει ως αποτέλεσμα πολύπλοκων μεταλλαγών που περιλαμβάνουν προαγωγικούς παράγοντες (όπως VEGF, αγγειοποιητίνη και ο αυξητικός παράγοντας fibroblast growth factor (FGF), παράγοντες αναστολής συμπεριλαμβανομένου της θρομβοσπονδίνης TSP και αγγειοστατίνες). Ένας αριθμός από αγγειογενείς αυξητικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του VEGF-A, αγγειοποιητίνη-2, και PDGF, έχει δειχθεί ότι η έκφρασή τους είναι υψηλά ρυθμιζόμενη σε γονιδιακό και σε πρωτεϊνικό-πλασματικό επίπεδο σε ηπατοκυτταρικούς όγκους εν συγκρίσει με τους ασθενούς που πάσχουν από κίρρωση (Mas VR, et al. 2007). Οι βασικοί αγγειογενείς παράγοντες που εμπλέκονται είναι οι VEGFs, PDGFs, TGF- α και β , οι βασικοί FGF, EGF ηπατοκυτταρικοί αυξητικοί παράγοντες, οι αγγειοποιητίνες και η ιντερλευκίνη-4 και 8 (Semela D, Dufour JF. 2004) (Folkman J, et al. 2003). Αυτοί οι αυξητικοί παράγοντες και οι κιτοκίνες προάγουν την αγγειογένεση μέσω ποικίλων μηχανισμών όπως την ενεργοποίηση μονοπατιών RAF/MEK/ERK, P13K/AKT/ mTOR και JAK (Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung 2013).

Αυξημένη έκφραση του VEGF έχει αναφερθεί σε κίρρωτικό και δυσπλαστικό ηπατικό ιστό, υποδεικνύοντας κάποιο ρόλο του VEGF στην μεσολάβηση της αγγειογένεσης σε ηπατοκαρκινογένεση (El-Assal ON, et al. 1988). Ο παράγοντας VEGF παίζει ένα σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στον ΗΚΚ. Υψηλά επίπεδα έκφρασης του παράγοντα αυτού έχουν συνδεθεί με την κλιμάκωση του ηπατοκυτταρικού όγκου. Η έκφραση του FGF-2 είναι επίσης ανεβασμένη σε ασθενείς με HCC και σχετίζεται με την μικροαγγειακή πυκνότητα του όγκου

και με το ποσοστό μετεγχειρητικών υποτροπιασμών (Uematsu S , et al. 2005) (El-Assal ON, et al. 2001) (Poon RT, et al. 2001). Η αγγειογενής έκφραση του όγκου σχετίζεται με την μικροαγγειακή πυκνότητα και υψηλά ποσοστά αυτού σχετίζονται με το μειωμένο ποσοστό επιβίωσης των ασθενών στα 5 έτη (Hisai H, et al. 2003).

B2. EGFR, IGF

Ο EGFR, που ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, περιέχει μια ενδοκυτταρική περιοχή τυροσίνης κινάσης η οποία μπορεί να πυροδοτήσει σηματοδοτική μεταγωγή μέσω του MAPK και του P13K/Akt/mTOR μονοπατιού. Ως εκ τούτου αυτοί οι υποδοχείς συμβάλουν στην κυτταρική ανάπτυξη στη διαφοροποίηση και επιβίωση (Ciardiello F and Tortora G. 2008). Υπερέκφραση του EGFR έχει αναφερθεί σε ΗΚΚ. Μία ανοσοιστοχημική ανάλυση αποκάλυψε μία υπερέκφραση σε ποσοστό 66% ανάμεσα σε 76 περιπτώσεις ΗΚΚ. Επίσης μια δοκιμή FISH έδειξε αντιγραφή γονιδίων EGFR σε ποσοστό 45% σε 38 περιπτώσεις ΗΚΚ (Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung 2013).

B3.Σήμα IGF

Ο παράγοντας ανάπτυξης της οικογένειας insulin-like έχει κύριο ρόλο στην αρχική ανάπτυξη, στον πολλαπλασιασμό, στην διαφοροποίηση, στην κυτταρική ανάπτυξη και στην απόπτωση και έχει ενοχοποιηθεί για πολλές κακοήθειες καταστάσεις (Pollak MN, et al. 2004). IGF-I έχει συσχετισθεί ως παράγοντας υψηλού κινδύνου για νεοπλασματική ανάπτυξη αλλά όχι όμως στον ΗΚΚ. Στην πραγματικότητα πειραματικές μελέτες δείχνουν τον πιθανό ρόλο του στην ενίσχυση της κίρρωσης. IGF-II είναι υπερεκφραζόμενος σε περίπου 30% ΗΚΚ και οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες tumor suppressors IGF bindin protein-1 (IGFBP-1), IGFBP-3, και IGFBP-4 είναι χαμηλά ρυθμιζόμενες (Breuhahn K, et al. 2006). Ακόμη πιο σημαντικός είναι ο IGFR-II, του οποίου η δράση συμμετέχει στην δέσμευση και στην μείωση του IGF-II και είναι χαμηλά ρυθμισμένος σε ένα γκρουπ ΗΚΚ, ως αποτέλεσμα κάποιας χρωμοσωμικής διαγραφής στην περιοχή IGFR-II(6q) ή σε σημειακές μεταλλάξεις. Κάποια μόρια και μονοκλωνικά αντισώματα μπλοκάρουν το IGF-1R αλλά βρίσκονται σε αρχικό στάδιο κλινικής έρευνας (A12, XL228) (Tovar

V. et al). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των σημάτων IGF και EGF μπορεί να λειτουργήσει ως ένας μηχανισμός αντίστασης για κάποιους όγκους.

B4.Σήμα HGF/c-MET

Ο αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων [hepatocyte growth factor receptor (HGF)] είναι ένα σημαντικό μόριο για την ηπατική αναγέννηση , μετά από έναν τραυματισμό. (Fausto N, et al. 2006). Ο υποδοχέας του, γνωστός ως c-MET, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο και έχει βρεθεί ότι η έκφραση του αλλάζει σε ανθρώπινους καρκίνους. Αλλαγές στην έκφραση του c-MET είναι συχνές στον ΗΚΚ (Factor VM. 2007) (Villanueva A, et al. 2007). Ωστόσο ο ακριβής ρόλος στην παθογένεια αυτού του μονοπατιού δεν έχει διευκρινιστεί. Πολλά συστατικά που στοχεύουν το μονοπάτι MET συμπεριλαμβανομένων αντισωμάτων κατά του HGF ή υποδοχέων MET ή επιλεγμένοι μικρού μεγέθους αναστολείς MET χρησιμοποιούνται ως πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις (Comoglio P, et al. 2008).

Γ. Μοριακά μονοπάτια μεταγραφικών παραγόντων

Γ1. JAK/STAT PATHWAY

Το μονοπάτι Jak/Stat ενεργοποιείται από πάνω από 40 κιτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες και εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες όπως η διαφοροποίηση ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση (Kisseleva T, et al. 2002). Σε αυτό το μονοπάτι, οι κιτοκίνες προάγουν τη φωσφορυλίωση της Janus τυροσίνης κινάσης (Jak 1, 2, 3 και Tyk2), η οποία ακολουθείται από το Stat1-6 (Bromberg JF, et al. 2001). Η φωσφορυλίωση του Jak1, Jak2 και Tyk2 δεν ανιχνεύεται σε υγιή συκώτια αλλά αυξάνει σημαντικά μεταξύ του υγιούς μη νεοπλασματικού συκωτιού και του ηπατικού όγκου (Calvisi DF, et al. 2006). Η ενεργοποίηση του Stat 1 Stat 3 και Stat5 αυξήθηκε σημαντικά στους όγκους από ότι στους παρακείμενους υγιείς ιστούς του συκωτιού. Τα επίπεδα των Jak/Stat στόχων συμπεριλαμβανομένου του Bcl-xl, Mcl-1, κυκλίνες D1, και c-Myc, είναι ανεβασμένα στην πλειονότητα των περιπτώσεων ΗΚΚ (Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung 2013).

Γ2. Σήμα HEDGEHOG

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog είναι θεμέλιος λίθος της διαφοροποίησης, της αναγέννησης, και της βιολογίας του βλαστικού κυττάρου. Υπερέκφραση του Hedgehog έχει πρόσφατα περιγραφεί σε 60% από 155 ανθρώπους με HKK και η αναστολή του οδηγεί στην χαμηλή ρύθμιση των στόχων-γονιδίων Gli (Osipov C and Miele L. 2006). Επιπλέον, η ενεργοποίηση του ογκογενετικού μηχανισμού Smo μπορεί να μεσολαβήσει στην υπερέκφραση του c-myc, το οποίο παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ηπατοκαρκινογένεση (Josep M. et al. 2008).

Γ3. MYC, το κύριο ογκογονίδιο σε ένα καρκίνο

Το πρωτοογκογονίδιο MYC είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ελέγχει την έκφραση πολλών γονιδίων, και ενοχοποιείται για πολλές παθολογίες σε πληθώρα τύπων καρκίνου. Το MYC είναι ένα ισχυρό γονίδιο που προάγει τη καρκινογένεση αλλά παραδόξως εμφανίζει και ογκοκατασταλτική δραστηριότητα με το να προάγει την απόπτωση (Drazen B. et al. 2012).

Ανώμαλη έκφραση του MYC γονιδίου είναι ένα σύνηθες φαινόμενο σε καρκίνους και η ενεργοποίηση του μεσολαβείται από ενδογενείς μεταλλάξεις, σε αλλαγή θέσης χρωμοσωμάτων (Meyer N, et al. 2008). Η εισαγωγή μιας νέας αλληλουχίας μέσα σε ένα υγιές γονίδιο συνήθως συμβαίνει κατά τη διαδικασία της ενσωμάτωσης των ρετροϊών προ-ιών μέσα στο γονιδίωμα του ξενιστή έχοντας ως αποτέλεσμα τη μίξη των αλληλουχιών του ιού και του γονιδιώματος του ξενιστή. Οι ρετροϊοί θεωρούνται υποχρεωτικώς ως μεταλλαξιογενείς, επειδή ο κύκλος ζωής τους απαιτεί την υποχρεωτική ενσωμάτωση του γενετικού τους υλικού με το χρωμοσωμικό DNA, γεγονός το οποίο εκτός των δομικών μεταλλαγών που επιφέρει στην περιοχή που πλήττεται, μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει ογκογονίδια παρακείμενων κυττάρων (Varmus H, et al. 1988) (Peters G. 1990). Η ενεργοποίηση του MYC από ρετροϊκή είσοδο αποτελεί ένα τέτοιο φαινόμενο (Payne GS, et al. 1982). Εκτός των ρετροϊών, μελέτες απέδειξαν ότι και οι DNA ιοί ενσωματώνουν το γονιδίωμα τους σε χρωμοσωμικό DNA του ξενιστή και

παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου, πράγμα το οποίο πιο παλιά το θεωρούσαν ως μια εξαίρεση στο κανόνα (Drazen B. et al. 2012).

Η ενσωμάτωση του ιικού DNA με το γένωμα του ξενιστή δεν είναι ένα απλό τυχαίο γεγονός επειδή οι ιοί στοχεύουν συγκεκριμένη περιοχή FSs, η οποία περικλείει αρκετά γονίδια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και προφανώς ο ιός θα θέλει να τα εκμεταλλευτεί για την δική του ανάπτυξη (Popescu NC, et al. 1990). Καταγράφηκαν και συσχετίστηκαν κάποιες περιπτώσεις καρκίνων με αντίστοιχους ιούς. Ο human papilloma virus (HPV) συσχετίστηκε στους περισσότερους επιθετικούς και διεισδυτικούς καρκίνους των γεννητικών οργάνων. Ο Epstein-Barr Virus (EBV) σε μολυσμένα λεμφοβλαστικά κύτταρα ή λέμφωμα Burkitts. Το πιο πρόσφατο στοιχείο από συγκεκριμένη ιική ενσωμάτωση στα FS ήταν ο εντοπισμός του simian virus 40 (SV40) στα SV40-αθάνατα κύτταρα στην περιοχή 1q21.1 που ανταποκρίνεται με τη τοποθεσία ενός κοινού FS. Η είσοδος του SV40 στο γονιδίωμα του κυττάρου προκάλεσε απορύθμιση των γειτονικών γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στη γήρανση και στην απόπτωση των κυττάρων και ως εκ τούτου έπαιξαν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην κυτταρική αθανασία (Liu J, et al. 2009).

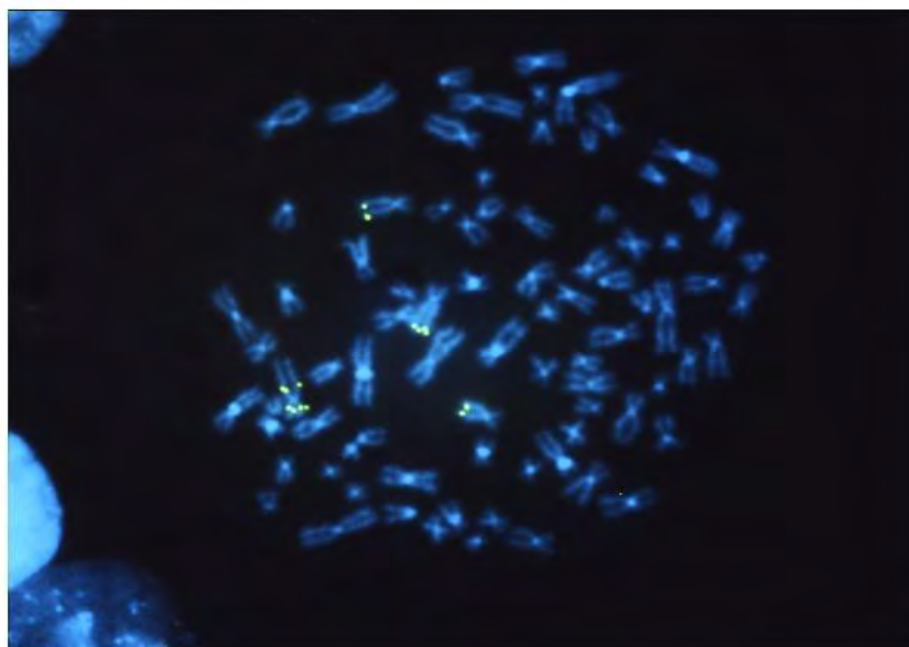
Η εισαγωγή του ιικού γενετικού υλικού μέσα στο γονιδίωμα του ξενιστή μπορεί να συμβάλει στην προαγωγή της μεταμόρφωσης των κυττάρων, τη συντήρηση αυτού του μετασχηματισμένου φαινοτύπου, και της εξέλιξης του όγκου (Popescu NC και Zimonjic DB. 2002). Μεταθέσεις, Ισοχρωμικές μεταθέσεις, double minute chromosomes (DM), homogeneously stained regions (HSRs), ευθύνονται επίσης για την απορύθμιση του MYC σε πολλούς τύπους καρκίνου (Croce CM and Nowell PC. 1985) (Zimonjic DB, et al. 2001). Ενώ οι ανώμαλες ισοχρωμικές μεταθέσεις, προκαλούν μία μέτρια αύξηση αριθμού του MYC ογκογονιδίου, τα DM και οι HSR περιοχές, το ενισχύουν σε μεγάλο βαθμό (Alitalo KM, et al. 1986). Οι HSR μπορεί να περιέχουν δύο ή περισσότερα ενισχυμένα γονίδια, συνήθως ογκογονίδια. Για παράδειγμα, στα κύτταρα ενός καρκίνου μαστού ανιχνεύτηκαν υψηλά επίπεδα όχι μόνο του MYC αλλά και του ERBB2 επίσης (Zimonjic DB, et al. 2000). Μη τυχαίες χρωμοσωμικές μεταλλαγές που είχαν ως αποτέλεσμα την ενίσχυση του MYC είχαν επίσης εξακριβωθεί σε υγιή μαστικά κύτταρα τα οποία μεταμορφωνόταν σε νεοπλαστικά εξαιτίας την ελεγχόμενης εισαγωγής των SV40LT, hTERN, και

H-RAS γονιδίων και για αυτό το λόγο ενοχοποιείται το ογκογονίδιο MYC στα αρχικά στάδια της νεοπλασματικής ανάπτυξης (Elenbaas B, et al. 2001).

Ο Woodchuck hepatitis virus (WHV) είναι γνωστό ότι ενσωματώνεται κοντά στην τοποθεσία του MYC και προκαλεί αύξηση της έκφρασης του ογκογονιδίου (Popescu NC, Zimonjic DB. 2002). Ο HBV έχει γενωμική δομή παρόμοια με αυτή του WHV. Είναι πιθανό ότι ο HBV ενσωματώνεται κοντά στην περιοχή FRA8C και ενεργοποιεί το ογκογονίδιο MYC (Wei Y, et al.1992). Ωστόσο, εξαιτίας της ιδιότητας του HBV να προκαλεί δευτερογενή γενωμική ανακατανομή και ιικό επανεντοπισμό του, ο εντοπισμός των περιοχών ενσωμάτωσης του ιού στο ΗΚΚ μπορεί να μην αντιπροσωπεύει την αρχική περιοχή ενοποίησης (Popescu NC, Zimonjic DB. 2002).

Εικόνα 5.

Στάδιο μετάφασης κυτταρικής σειράς 7703Κ ενός ΗΚΚ. Πολλαπλά φθορίζοντα σήματα του MYC γονιδίου, ενδεικτικά της ενίσχυσής του, τα οποία εντοπίζονται τόσο στο υγιές όσο και στο ανώμαλο χρωμόσωμα 8.



Role of DLC-1 and MYC oncogene. Drazen B. Zimonjic and Popescu (2012).

Δ. Μονοπάτια ογκοκατασταλτικών γονιδίων

DLC-1.

Το DLC-1 (Deleted in Liver Cancer 1) απομονώθηκε από ένα χρωμοσωμικό κομμάτι το οποίο είχε διαγραφεί σε ανθρώπινο ΗΚΚ και θεωρήθηκε ότι ήταν ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο (Yuan BZ, et al. 1998). Από την απομόνωση του και μετά έχει τραβήξει όλο το ενδιαφέρον παγκοσμίως.

Δύο συγγενικά γονίδια, το DLC-2 και το DLC-3 έχουν επίσης απομονωθεί και έχουν ογκοκατασταλτικές ιδιότητες στο ΗΚΚ (Ching YP, et al. 2003) (Durkin EM, et al. 2007). Μέχρι τώρα απομονώθηκαν 3 ισομορφές παραλλαγές του DLC-1 η 1, 2, και η 3. Πρόσφατα αναγνωρίστηκε και απομονώθηκε ακόμα μια παραλλαγή η DLC1-i4 και έδειξε και αυτή ογκοκατασταλτικές ιδιότητες (Durkin ME, et al. 2007).

Το DLC-1 έχει θεωρηθεί ως το κύριο ογκοκατασταλτικό γονίδιο και υποψήφιο για καταστολή μεταστατικού όγκου στον ΗΚΚ και σε άλλες μορφές καρκίνου (Liao YC and Lo SH. 2008) (Xue W, et al. 2008). Το DLC-1 συμβάλει και σε άλλες ζωτικές λειτουργίες πέραν της ιδιότητάς του ως κατασταλτικού όγκου. Μετάλλαξη που αχρηστεύει τη λειτουργία του γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα στη θανάτωση του εμβρύου (σε ποντίκια). Επίσης εμπλέκεται στη σηματοδότηση της ινσουλίνης και στη παθογένεση της στεφανιαίας σπαστικής στηθάγχης και σε άλλες βασικές λειτουργίες (Durkin ME, et al. 2005) (Hers I, et al. 2006).

Το DLC-1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8p22. Η πρωτεΐνη του DLC-1 σε κάποια κύτταρα βρίσκεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα ενώ σε κάποια άλλα κύτταρα μπορεί να βρεθεί στα άκρα των ινιδίων ακτίνης και στις εστιακές προσκολλήσεις, το οποίο είναι πολύ σημαντικό στην κυτταρική αποδέσμευση (Qian X, et al. 2007) (Zhou X, et al. 2004). Χαμηλή έκφραση ή απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου έχει ως συνέπεια την ανάπτυξη και την εξέλιξη καρκίνου, καθώς το DLC-1 είναι ένα από τα πιο συχνά γονίδια που βρίσκεται απορρυθμισμένο στον καρκίνο. Η χαμηλή έκφραση ή απενεργοποίηση του γονιδίου σε πολλές μορφές καρκίνου συχνά μεσολαβείται σε γονιδιακό επίπεδο από ομόζυγη και ετερόζυγη διαγραφή και

σε μεταγραφικό επίπεδο από παρεκκρινόμενο προωθητή της μεθυλίωσης ή αποακετυλίωση των ιστόνων (Durkin ME, et al. 2005).

Αρχικά ανιχνεύτηκε έλλειψη της έκφρασης του DLC-1 σε πάνω από 40% των περιπτώσεων αρχικού σταδίου ανθρώπινου ΗΚΚ και σε 90% στις ΗΚΚ κυτταρικές σειρές (Yuan BZ, et al. 1998). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν ανεξαρτήτως, καθώς στο 40% των δειγμάτων ΗΚΚ δεν ανιχνεύτηκε καθόλου το DLC-1 (Ng IO, et al. 2000). Πιο πρόσφατα, χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων, βρέθηκαν ετερόζυγες διαγραφές του DLC-1 σε 59 από τους 86 ΗΚΚ αρχικού σταδίου. Επιπλέον η διαγραφή του DLC-1 σε άλλους τύπους καρκίνου είναι πιο συχνή από διαγραφές άλλων γνωστών ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Xue W, et al. 2008). Σε αντίθεση με κάποιες αρχικές παρατηρήσεις ότι οι μεταλλάξεις στην κωδική περιοχή του DLC-1 είναι σπάνιες στο ΗΚΚ, πρόσφατες αναλύσεις μας έδειξαν ότι γίνονται κάποιες μεταλλάξεις (Park SW, et al. 2003) (Liao YC, et al. 2008).

Σε κάποιες αρχικές μελέτες αναγνωρίστηκε ένας αριθμός από νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς στην αλληλουχία του DNA του γονιδίου DLC-1, που μπορεί να σχετίζεται με τον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΗΚΚ (Park SW, et al. 2003). Μόλις πρόσφατα μια εις βάθος γενοτυπική ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού περιστατικών σε κινέζικο πληθυσμό έδωσε επαρκή και πειστικά στοιχεία για το συσχέτισμό αυτών των πολυμορφισμών και της ευαισθησίας του ΗΚΚ (Dong X, et al. 2009).

Ο προωθητής της υπερμεθυλίωσης φαίνεται ότι σχετίζεται με τον ανθρώπινο καρκίνο τουλάχιστον τόσο συχνά όσο η διαστρέβλωση των TSGs από μεταλλάξεις ή διαγραφές. Τα TSGs τα οποία είναι χαμηλά ρυθμισμένα ή αποσιωπημένα από προωθητές της υπερμεθυλίωσης, συχνά βρίσκονται στις γενωμικές περιοχές που διαγράφονται τις περισσότερες φορές, σε περιπτώσεις καρκίνου (Popescu NC.β 2003) (Teodoridis JM, et al. 2008). Παρά του μεγάλου ποσοστού διαγραφών, το DLC-1 ρυθμίζεται χαμηλά ή αποσιωπάται κυρίως από επιγενετικούς μηχανισμούς, συχνά από προωθητές (υποκινητές) της μεθυλίωσης (Yuan BZ, et al. 2003) (Wong CM, et al. 2003).

Το προφίλ έκφρασης των παραλλαγών του DLC-1, 1,2,3, σε υγιείς και κακοήθεις ηπατικούς ιστούς, δείχνει ότι μόνο η παραλλαγή 1 και η παραλλαγή

4 (DLC1-i4) αποσιωπούνται από υποκινητές της μεθυλίωσης. Έχει δειχθεί ότι το DLC1-i4 εκφράζεται σε υγιείς ιστούς αλλά μειώνεται σημαντικά η ρύθμισή του σε ένα μεγάλο αριθμό από ρινοφαρυγγικούς, ισοφαγικούς, του μαστού, πνευμόνων καρκίνους, καθώς επίσης και σε αρχική ανάπτυξη όγκων. Μεθυλίωση του DLC1-i4 ανιχνεύτηκε σε 38% των περιπτώσεων αρχικών σταδίων HKKs (Low JS, et al. 2011).

Επιπλέον της διαγραφής, της μετάλλαξης και της μεθυλίωσης, το DLC-1 μπορεί να ρυθμιστεί χαμηλά ή να αποσιωπηθεί και από άλλους μηχανισμούς. Το DLC-1 δεν ξεφεύγει της δράσης κάποιων miRNAs τα οποία στοχεύουν την έκφραση κάποιων ογκοκασταλτικών γονιδίων (Croce MC, et al. 2009). Μία νέα έρευνα έδειξε ότι ο αποτελεσματικός διπλασιασμός του HCV απαιτεί το miR-141 το οποίο μεσολαβεί στη καταστολή του DLC1 (Drazen B. et al. 2012). Το DLC-1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη τη RhoGAP, η οποία καταλύει την μετατροπή του ενεργού GTP-bound σε ανενεργό GDP-bound. Όλες οι ανασταλτικές και οι αντικαρκινικές ιδιότητες του DLC-1 οφείλονται κυρίως στην ιδιότητα της πρωτεΐνης RhoGAP η οποία απενεργοποιεί τις Rho πρωτεΐνες (RhoA, RhoB, RhoC) και ως ένα βαθμό τη Cdc42 (Wong CM, et al. 2005) (Healy KD, et al. 2005) (Kim TY, et al. 2007). Η δραστηριότητα της Rho συχνά είναι απορυθμισμένη σε ανθρώπινους καρκίνους και πειραματικά στοιχεία την ενοχοποιούν για την σηματοδότηση και προαγωγή της ανάπτυξης του όγκου, καθώς και για την διεισδυτικότητα μέσω μορφολογικών και λειτουργικών κυτταρικών μεταλλαγών (Sahai E, et al. 2002) (Gómez del Pulgar T, et al. 2005).

Επειδή η δραστηριότητα της Rho είναι αυξημένη σε πολλούς τύπους καρκίνου, η ικανότητα της RhoGAP να μειώνει την έκφραση της Rho, μπορεί να πετύχει την εξασθένηση ή την αναστολή της ογκογένεσης ή και της μεταστατικής εξέλιξης (Jaffe AB, Hall A. 2002) (Ridley AJ. 2004). Σε μία έρευνα σε 76 ασθενείς με HBV όπου θέλανε να διαπιστώσουν το βαθμό επιβίωσης με την έκφραση κάποιων γονιδίων, βρέθηκε ότι στους ασθενείς με πολύ κακά αποτελέσματα το DLC1 και άλλα 5 γονίδια της περιοχής 8p είχαν διαγραφεί. 3 από αυτά τα γονίδια, το SORBS3, το SHRBS3, και το PROSC λειτουργούν ως ογκοκασταλτικά και καταστέλλουν το HKK in vitro και in vivo (Roessler S, et al. 2011) (Pihur V, et al. 2008).

Αποδείξεις ότι το DLC1 δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο σε ΗΚΚ έρχονται από πειράματα στα οποία το DLC1 cDNA είχε εκφραστεί σε κύτταρα με απενεργοποιημένο ενδογενές γονίδιο. Σε αρκετές ανεξάρτητες έρευνες, η αποκατάσταση της έκφρασης του DLC-1 κατά κανόνα είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τον σχηματισμό αποικιών, και την κυτταρική αποδόμηση, *in vitro* (Ng IO, et al. 2000) (Wong CM, et al. 2005). Δύο χαρακτηριστικές κυτταρικές σειρές οι οποίες προήλθαν από ασθενείς με επιθετική μορφή ΗΚΚ και στους οποίους απουσίαζε η δράση του ενδογενούς DLC-1, χρησιμοποιήθηκαν για να τεστάρουν την επίδραση της εκτοπικής έκφρασης του DLC1. Η αποκατάσταση της έκφρασης του DLC-1 είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού *in vitro*, και *in vivo* την αναστολή της ογκογένεσης, καθώς επίσης και την προαγωγή της απόπτωσης, η οποία σχετιζόταν με μειωμένα επίπεδα του αντι-αποπτωτικού παράγοντα Bcl-2 (Zhou X, et al. 2004). Μετέπειτα έρευνες σε καρκίνο του προστάτη έδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα απέκτησαν ευαισθησία στην αποπτωτική δράση του DLC-1, μετά από χορήγηση του HA14-1, ο οποίος είναι ένας αναστολέας του Bcl-2 (γνωστός για τις αντι-αποπτωτικές ιδιότητες) (Guan M, et al. 2008). Έχει αποδειχτεί ότι όταν η DLC πρωτεΐνη βρεθεί σε διαφορετικό μέρος του κυττάρου, επιτελεί διαφορετικό ρόλο. Για παράδειγμα η εμφάνισή της στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου συνδέεται με την ανασταλτική δράση του DLC1 έναντι της ανάπτυξης των κυττάρων του όγκου και της μετανάστευσής τους, ενώ η εμφάνισή της στο πυρήνα του κυττάρου συνδέεται με τον αποπτωτικό ρόλο του DLC-1 (Yuan BZ, et al. 2007).

Η απορύθμιση του DLC1 και του MYC στο ΗΚΚ.

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η χαμηλή έκφραση του DLC1 γονιδίου ή η ενίσχυση του MYC γονιδίου είναι καθοριστικοί παράγοντες στη παθογένεση του ΗΚΚ και συνήθως στους περισσότερους ΗΚΚ αυτή η ισορροπία στις εκφράσεις των γονιδίων αποσταθεροποιείται και ο συγχρονισμός αυτός μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την καρκινογένεση (Drazen B. et al. 2012).

Το γεγονός ότι πολλοί τύποι καρκίνων προκύπτουν από πολλές συσσωρευμένες γενετικές μεταλλάξεις έχει ως αποτέλεσμα να θεωρείται

σχεδόν απίθανη η θεραπεία του με το να στοχεύσουν σε ένα και μόνο γονίδιο που υπέστη βλάβη. Ωστόσο ένας αριθμός πειραμάτων έδειξε ότι η αποσιώπηση ενός ογκογονιδίου ή η ενεργοποίηση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου είναι αρκετό για να ακυρώσουν την ογκογένεση (Roth JA and Grammer SF.(2003). Παρά την συσσώρευση πολλών γενετικών μεταλλαγών, τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να εξαρτώνται μόνο από ένα ογκογενές μονοπάτι που να τους παρέχει την επιβίωση και τον απεριόριστο πολλαπλασιασμό τους. Αυτό το φαινόμενο γνωστό και ως ‘oncogene addiction’ (ογκογενής εξάρτηση) έχει περιγραφεί εδώ και μια δεκαετία (Weinstein IB. 2002). Καταστολή ενός σημαντικού ογκογενούς μονοπατιού μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο των καρκινικών κυττάρων χωρίς καμία επίπτωση στα υγιή κύτταρα. Παρομοίως η επανεισαγωγή φυσικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων, οι οποίοι συχνά είναι απενεργοποιημένοι στα καρκινικά κύτταρα, αποτρέπουν την ανάπτυξη του όγκου με το να προάγουν τον κυτταρικό θάνατο ή να σταματούν τον κυτταρικό κύκλο και σε πολλές περιπτώσεις δεν επιφέρουν καμία τοξικότητα ή δυσλειτουργία σε υγιή κύτταρα (Drazen B. et al. 2012).

Ε.Αποπτωτικά μονοπάτια

Η απόπτωση είναι ένας μηχανισμός που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο, όταν τα κύτταρα έχουν υποστεί ζημιά στο DNA ή στον κυτταροσκελετό τους (Ashkenazi A and Herbst R. 2008). Αναστολή αυτού του μηχανισμού αποτελεί ένα από τα ορόσημα του καρκίνου. (Hanahan D, et al. 2000). Η απόπτωση μπορεί να ξεκινήσει από εξωτερικά σηματοδοτικά μονοπάτια (που βρίσκονται έξω από το κύτταρο) ή από εσωτερικά (που βρίσκονται μέσα στο κύτταρο) (Tait S.W., Green D.R. 2010). Στα εξωτερικά μονοπάτια, ο δεσμός μεταξύ ενός εξωκυτταρικού συνδέσμου όπως ο Fas με το αντίστοιχο υποδοχέα που βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου, μεταδίδει ένα σήμα που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας σειράς ενδοκυτταρικών αλυσιδωτών γεγονότων τα οποία ενεργοποιούν την πρώιμη προκασπάση-8 η οποία μετασχηματίζεται στη τελική κασπάση-8.

Οι cysteine-aspartate proteases (caspases) είναι πολύ σημαντικές στην απόπτωση (Riedl S.J., Shi Y. 2004). Υπάρχουν οι εναρκτήριες κασπάσες όπως η 2, 8, 9, και 10 οι οποίες ενεργοποιούν πρόδρομες μορφές κάποιων άλλων κασπασών, και οι εκτελεστικές όπως η κασπάση 3, 6 και η 7. Η caspase-8 είναι η εναρκτήρια η οποία ενεργοποιείται στο εξωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης και η οποία μετά από μια σειρά γεγονότων ενεργοποιεί την εκτελεστική κασπάση-3 (Riedl S.J., Shi Y. 2004). Το εσωτερικό μονοπάτι ξεκινάει από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια μαζί με κάποιους άλλους αποπτωτικούς παράγοντες όπως ο second mitochondria-derived (Smac) και ο direct IAP binding protein with low pI (DIABLO) (Tait S.W., Green D.R. 2010). Το κυτόχρωμα c σχηματίζει ένα αποπτωτικό σύμπλοκο με την προκασπάση-9 και με άλλες αποπτωτικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Η προκασπάση-9 μετασχηματίζεται στη κασπάση-9 και αυτή με τη σειρά της μέσα από κάποιους μηχανισμούς ενεργοποιεί την caspase-3 η οποία διασπά διάφορα υποστρώματα όπως η Poly-ribose polymerase (PARP), που τελικά προκαλεί τις μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές που τυπικά παρατηρούνται στα αποπτωτικά κύτταρα (Elmore S. 2007). Αναλόγως με τους μηχανισμούς της απόπτωσης, τα κύτταρα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως κύτταρα τύπου I τα οποία απαιτούν την μεσολάβηση μόνο της κασπάσης-8 για την ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών και κύτταρα τύπου II που απαιτούν την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 καθώς επίσης και τη διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (MOMP) μέσα από την οποία απελευθερώνονται μιτοχονδριακές τοπικές πρωτεΐνες, οι οποίες ενεργοποιούν τα αποπτωτικά μονοπάτια (Tait S.W., Green D.R. 2010). Η κασπάση-8 μεσολαβεί για την ενεργοποίηση του BCL-2 homology 3 (BH3)- interacting domain death agonist (BID) (Luo X. et al. 2010) (Li H. et al. 1998). Το BID με τη σειρά του προκαλεί το MOMP το οποίο ξεκινά το εσωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης.

Τα ηπατοκύτταρα είναι τύπου II κύτταρα και απαιτούν την ενεργοποίηση του BID συνοδευόμενο από MOMP για την πλήρη ενεργοποίηση της απόπτωσης (Tait S.W., Green D.R. 2010). Αυτό αποδεικνύεται από ένα πείραμα που έγινε σε ποντίκια στα οποία μετά από ένεση με αντισωμάτων anti-Fas ligand,

προκλήθηκε ηπατοκυτταρική απόπτωση. Όμως αυτά τα ποντίκια που είχαν έλλειψη του BID ήταν προστατευμένα και δεν ενεργοποιήθηκαν οι κασπάσες 3 ή 7 παρόλο που η εναρκτήρια κασπάση-8 ήταν ενεργοποιημένη (Yin X.M., et al. 1999).

Z. Μονοπάτια μεταβολισμού της γλυκόζης

Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι ο πολλαπλασιασμός στον ΗΚΚ σχετίζεται με τον αυξημένο μεταβολισμό της γλυκόζης. Το γλυκολυτικό ένζυμο Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH), μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη, η οποία αναγνωρίζεται για τον ρόλο της στον μεταβολισμό της γλυκόζης, έχει δείξει ότι επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Στον ΗΚΚ η αυξημένη έκφραση της GAPDH κατά κανόνα σχετίζεται με την αυξημένη γλυκολυτική ικανότητα, η οποία διευκολύνει τη πρόοδο του όγκου. Αναδύονται αποδεικτικά στοιχεία ότι η αυξημένη ρύθμιση της GAPDH προάγει την επιβίωση κάποιων μηχανισμών των καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης και την χημειοαντίσταση (Shanmugasundaram Ganapathy-Kanniappan. et al. 2012).

Η GAPDH έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τα νουκλειικά οξέα της ηπατίτιδας Β (Zang WQ, et al. 1998) (Li Y, et al. 2009) και της ηπατίτιδας C (Petrik J, et al. 1988), οι οποίοι θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες στη συμβολή της καρκινογένεσης. Επίσης έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά και με νουκλειικά οξέα άλλων ιών όπως influenza ιός και ο Γιαπωνέζικος ιός εγκεφαλίτιδας, ωστόσο δεν σχετίζονται με την παθογένεση του ΗΚΚ ή κάποιου άλλου τύπου καρκίνου (De BP, et al. 1996) (Yang SH, et al. 2009).

Όπως έχει προαναφερθεί τα δεδομένα που συλλέγονται δείχνουν μία συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης ρύθμισης της GAPDH και της πιθανής ογκογένεσης από μετασχηματισμένα κύτταρα. Για παράδειγμα ο παράγοντας Colony- Stimulating factor1 (CSF-1), ο οποίος έχει κεντρικό ρόλο σε αρκετές κακοήθειες και του οποίου η αύξηση έχει ταυτοποιηθεί σε πολλές περιπτώσεις ΗΚΚ. Με το mRNA αυτού του παράγοντα συνδέεται η GAPDH αυξάνοντας τη

σταθερότητα και ως εκ τούτου συμβάλει σε μία ογκογενής φαινοτυπική κακοήθεια (Zhou Y, et al. 2008). Επιπλέον μία ανάλυση σε δείγματα ασθενών ΗΚΚ, αποκάλυψε αυξημένη ρύθμιση της GAPDH, η οποία συσχετίζεται με το c-jun, ένα πρωτοογκογονίδιο το οποίο είναι γνωστό ότι σχετίζεται με το καρκίνο του ήπατος (Eferl R, et al. 2003). Παραμένει υπό έρευνα για το αν σχετίζεται η GAPDH και με κάποιο άλλο ογκογονίδιο το οποίο να συμβάλει στην εξέλιξη του ΗΚΚ (Shanmugasundaram Ganapathy-Kanniappan. et al. 2012).

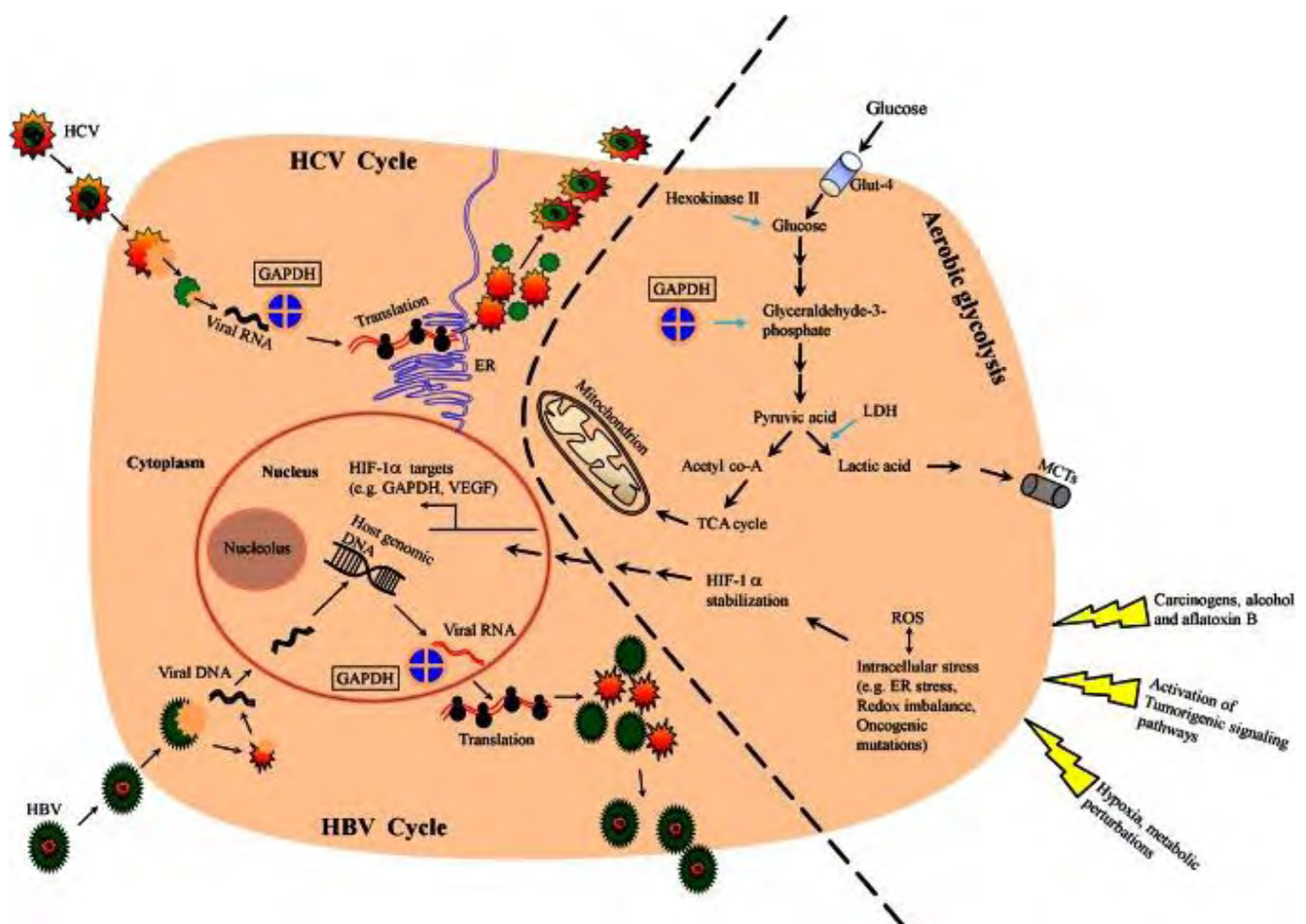
Πρόσφατα έχει καταγραφεί ο ρόλος της GAPDH στη ρύθμιση του mTOR-C1 σηματοδοτικού μονοπατιού (Lee MN, et al. 2009). Το mTOR είναι ένας αυξητικός σηματοδοτικός μηχανισμός που είναι ενεργοποιημένος σε περιπτώσεις ηπατοκαρκινογένεσης (Villanueva A, 2008) (Ho C, et al. 2012). Ως εκ τούτου παρέχει την ευκαιρία για μια στοχευμένη θεραπεία (Piguat AC, et al. 2008) (Tam KH, et al. 2008). Βρέθηκε ότι η GAPDH ρυθμίζει το μονοπάτι mTOR σύμφωνα με τη διαθεσιμότητα της γλυκόζης. Η αλληλεπίδραση της GAPDH με τον rheb (ενεργοποιητής του mTOR) μετριάζει το mTOR-C1 σηματοδοτικό μονοπάτι και ως εκ τούτου σταματούν οι αυξητικοί μηχανισμοί. Το παραπάνω συμβαίνει σε συνθήκες έλλειψης ενέργειας ή ανεπαρκούς γλυκόλυσης (Shanmugasundaram Ganapathy-Kanniappan. et al. 2012).

Η GAPDH επιπλέον του ρόλου της στη γλυκόλυση και στην παραγωγή ενέργειας, ρυθμίζει κάποια μονοπάτια και αυτό το γεγονός την καθιστά ως ένα από τα ελάχιστα μεταβολικά ένζυμα που ασκούν ποικιλότροπες δράσεις. Επίσης η GAPDH εμφανίζει το μοναδικό χαρακτηριστικό του να είναι ενεργή και στα 3 διαμερίσματα του κυττάρου, τον πυρήνα το κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη. Ως εκ τούτου η αλληλεπίδρασή της τόσο με πρωτεΐνες όσο και με νουκλεικά οξέα έχει ως αποτέλεσμα την ποικιλομορφία της λειτουργικότητάς της. Κάποιες αλληλεπιδράσεις που καταλήγουν σε διάφορα αποτελέσματα όπως α) η αλληλεπίδρασή της με το VDAC-1 που ξεκινά την προαποπτωτική μεμβρανική διαπερατότητα των μιτοχονδρίων β) δένεται με τουμπουλίνες οι οποίες επιδρούν στη δομή του κυτταροσκελετού και στη μεμβρανική κυκλοφορία γ) η παρουσία της μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο

όπου επηρεάζει εκκριτικά μονοπάτια (Shanmugasundaram Ganapathy-Kanniappan. et al. 2012).

Εικόνα 6

Σχηματική αναπαράσταση της εμπλοκής της GAPDH στους ηπατοκαρκινογενείς μηχανισμούς.

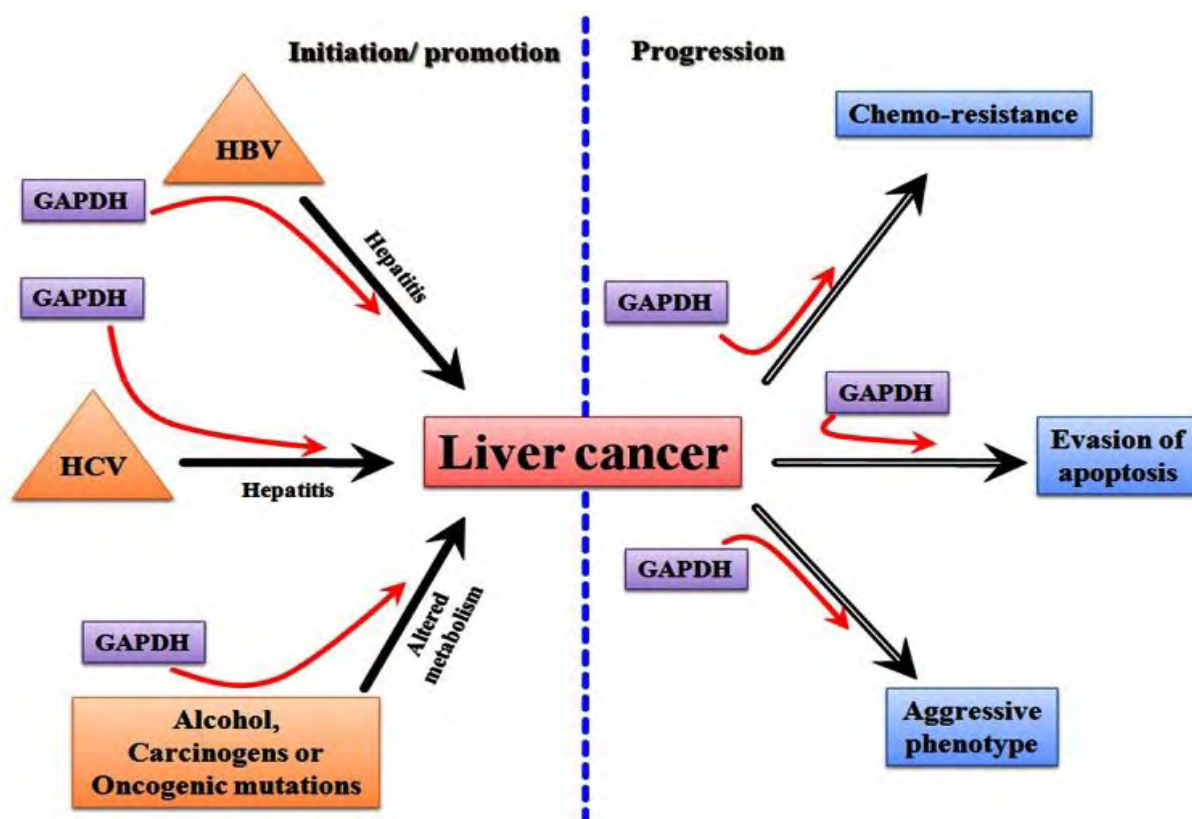


Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase: Shanmugasundaram Ganapathy-Kanniappan, Rani Kunjithapatham, and Jean-Francois Geschwind (2012).

Το να αναγνωρίσει κανείς ένα συγκεκριμένο αναστολέα μπορεί να είναι τόσο δύσκολο όσο το να αναγνωρίσει κανείς έναν μοριακό στόχο. Όπως έχει αναφερθεί η GAPDH έχει πολλές λειτουργίες. Έχει αποδειχτεί ότι είτε αναστέλλοντας το γλυκολυτικό της ρόλο είτε τις μη γλυκολυτικές της δράσεις είναι αρκετό για να μπλοκαριστεί η GAPDH. Παρομοίως αρκετά μοτίβα στην πεπτιδική αλληλουχία έχουν προβλεφτεί, τα οποία παίζουν ρόλο σε αυτές τις πολυλειτουργίες που εμφανίζει η GAPDH (εικόνα 8).

Εικόνα 7.

Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει την εμπλοκή της GAPDH στις διαδικασίες που σχετίζονται με την έναρξη την προαγωγή και την εξέλιξη της ηπατοκαρκινογένεσης.



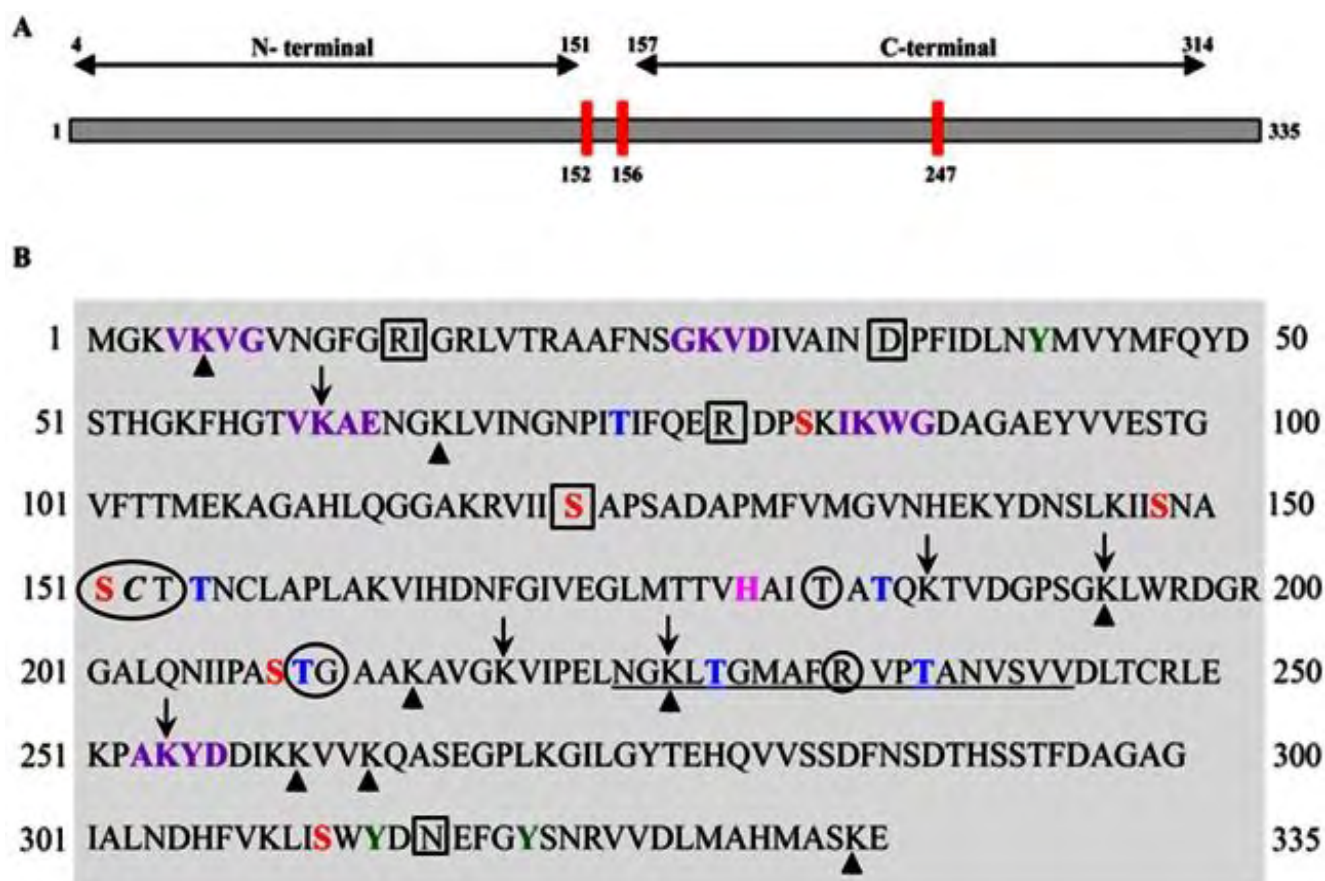
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase: Shanmugasundaram Ganapathy-Kanniappan, Rani Kunjithapatham, and Jean-Francois Geschwind (2012).

Αυτός ο πολυλειτουργικός ρόλος της GAPDH οφείλεται σε κάποιους μεταμεταφραστικούς τροποποιητές post-translational modifiers (PTMs) οι οποίοι υποκρύπτονται του ρόλου της. Ειδικότερα, ρυθμίζουν την πλειοψηφία των μη-γλυκολυτικών λειτουργιών της GAPDH. Για παράδειγμα είναι γνωστό ότι η φωσφορυλίωση του Thr237, μειώνει την επανεμφάνιση της GAPDH μέσα στο πυρήνα και μπλοκάρει τον αποπτωτικό της ρόλο (Huang Q, et al. 2011). Πιθανώς η ανάπτυξη αναστολέων που θα ανέστειλαν τη φωσφορυλίωση του Thr237 θα μπορούσε να αποκαταστήσει τον αποπτωτικό ρόλο της GAPDH. Παρομοίως η Akt2 κινάση έχει καταγραφεί ότι μετριάζει την φωσφορυλίωση του Thr237. Ως εκ τούτου θα μπορούσαν να αναπτυχθούν αναστολείς αυτής της κινάσης που θα βοηθούσαν στον αποπτωτικό ρόλο της GAPDH (Shanmugasundaram Ganapathy-Kanniappan. et al. 2012).

Ένας άλλος τροποποιητής PTM, O-GlcNAcylation της GAPDH στο Thr (227) έδειξε ότι επιτρέπει την εμφάνιση στο πυρήνα και διευκολύνει τις μη-γλυκολυτικές της λειτουργίες (Park J, et al. 2009) καθιστώντας το O-GlcNAcylation ως ένα πιθανό στόχο. Όπως έχει προαναφερθεί η GAPDH συμβάλει στην ανάπτυξη του όγκου με ποικίλους τρόπους. Το μπλοκάρισμά της θα απέτρεπε πολλά ογκογενή μονοπάτια και θα ανάγκαζε τα καρκινικά κύτταρα να γίνουν πιο ευαίσθητα και εν τέλει να προκαλούσε το κυτταρικό τους θάνατο (Shanmugasundaram Ganapathy-Kanniappan. et al. 2012).

Εικόνα 8.

Διάφορα μοτίβα της GAPDH στο ανθρώπινο συκώτι



Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase: Shanmugasundaram Ganapathy-Kanniappan, Rani Kunjithapatham, and Jean-Francois Geschwind (2012).

Θεραπευτική αντιμετώπιση του ΗΚΚ

A. Χειρουργική αντιμετώπιση

Η δυνητικά θεραπευτική μερική ηπατεκτομή είναι η ιδανική αντιμετώπιση του ΗΚΚ. Οι ασθενείς που μπορούν να χειρουργηθούν είναι αυτοί με μονήρη εστία περιορισμένη στο ήπαρ, χωρίς απεικονιστικές ενδείξεις διήθησης της

αγγείωσης του ήπατος ή σημεία πυλαίας υπέρτασης και με καλή ηπατική λειτουργία. Η μακροπρόθεσμη ελεύθερη νόσου επιβίωση ξεπερνά το 40%, ενώ η πενταετής επιβίωση αγγίζει το 90% σε σειρές με καλά επιλεγμένους ασθενείς (El-Serag HB, et al. 2008).

B. Επεμβατική ακτινολογία

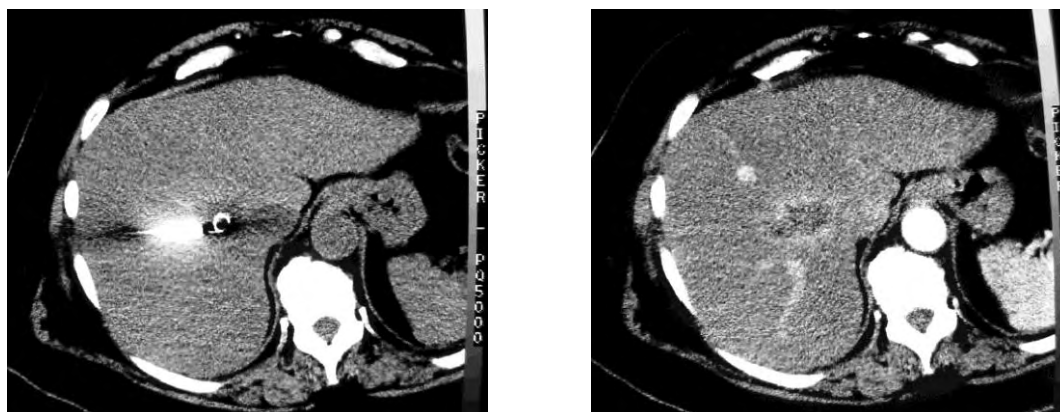
Μόνο το 20% - 30% των ασθενών με ΗΚΚ είναι υποψήφιο για θεραπευτικές μεθόδους (ηπατεκτομή, μεταμόσχευση). Το υπόλοιπο ποσοστό θα πρέπει να αντιμετωπιστεί με τοπικές θεραπευτικές μεθόδους. Οι κυριότερες από αυτές είναι ο ενδαρτηριακός εμβολισμός (TAE), ο χημειοεμβολισμός (TACE) και η θερμική νέκρωση (thermal tumor ablation).

Ο χημειοεμβολισμός συνιστάται ως επέμβαση πρώτης γραμμής σε ανεγχείρητες περιπτώσεις σε μεγάλους ή πολυεστιακούς όγκους, χωρίς διήθηση μεγάλων αγγείων ή απομακρυσμένες μεταστάσεις (Saida A, et al. 2007).

Η θερμική νέκρωση (RF ablation) συνίσταται στη νέκρωση του όγκου (coagulation necrosis) με την εισαγωγή ειδικής βελόνας εντός του όγκου και τη διοχέτευση είτε ραδιοκυμάτων (RF) είτε μικροκυμάτων (microwave ablation). Τα κύματα αυτά προκαλούν παλμικές κινήσεις των μορίων του ύδατος και θερμότητα τριβής. Αν και η κυτταρική νέκρωση συντελείται στους 60ο C, και οι δύο μέθοδοι επιτυγχάνουν θερμοκρασίες 90 - 95ο C. Η ένδειξη της μεθόδου είναι κυρίως όγκοι 1 - 5 τον αριθμό και διαμέτρου 2 - 4 cm. Μελέτες έχουν καταδείξει ότι για μονήρεις εστίες 2 - 3 cm η συνολική αλλά και η ελεύθερη όγκου επιβίωση έπειτα από θερμική νέκρωση είναι παρόμοιες με εκείνη της ηπατεκτομής. Για το λόγο αυτόν ήδη από το 2000 (Barcelona EASL conference) η θερμική νέκρωση περιλαμβάνεται στις θεραπευτικές μεθόδους, στην ίδια κατηγορία με την ηπατεκτομή και τη μεταμόσχευση ήπατος. Εικόνα 10 (Poon RTP, et al. 2007).

Εικόνα 9.

Διαδερμική θερμική νέκρωση. α. Το άγκιστρο της βελόνας διακρίνεται εντός της υπόπυκνης εστίας. β. Αμέσως μετά τη θερμική νέκρωση, η λήψη με σκιαγραφικό αναδεικνύει περιεστιακή άλω, η οποία οφείλεται στο οίδημα μετά τη θερμοπηξία.



http://www.hygeia.gr/page.aspx?p_id=614

Γ. Μεταμόσχευση ήπατος

Στον ΗΚΚ η μέση πενταετής επιβίωση για ασθενείς με μεταμόσχευση όταν αφορά σε μικρούς όγκους είναι μεγαλύτερη από 80%. Χαρακτηριστικά που συνδέονται με τέτοια επιβίωση περιλαμβάνουν μονήρη όγκο με διάμετρο μικρότερη των 5 εκ. ή μέχρι 3 εστίες, εκ των οποίων καμία δεν είναι μεγαλύτερη των 3 εκ. και με έλλειψη απεικονιστικών ενδείξεων αγγειακής διήθησης(κριτήρια Μιλάνου). Μερικά κέντρα πραγματοποιούν μεταμοσχεύσεις σε ασθενείς και όταν ξεπερνούν αυτά τα κριτήρια (μονήρης όγκος >6,5 εκ., 2 - 3 εστίες με τη μεγαλύτερη <4,5 εκ. και συνολική διάμετρο όγκου 8 εκ. - κριτήρια του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνιας - San Francisco) η επιβίωση για ένα έτος μετά τη μεταμόσχευση αντιστοιχεί στο 50% (Zhang T, et al. 2010).

Φαρμακευτική αντιμετώπιση

Στατίνες

Σχεδόν σε έναν στους πέντε Αμερικανούς συνταγογραφούνται οι στατίνες για διάφορες καρδιαγγειακές παθήσεις καθιστώντας τες ως το δεύτερο πιο διαδεδομένο φάρμακο στις Ηνωμένες Πολιτείες. Προ κλινικές και επιδημιολογικές έρευνες έδειξαν ότι εκτός της μείωσης της χοληστερόλης οι στατίνες μπορεί να έχουν προστατευτική δράση εναντίον των φλεγμονών που οδηγούν σε καρκίνο (Singh S, et al.2013) (Singh PP and Singh S, et al. 2013) (Samadder NJ, et al. 2011). Οι στατίνες έχουν δράση κατά του πολλαπλασιασμού, της αγγειογένεσης και είναι ρυθμιστές του ανοσοποιητικού (Demierre MF, et al. 2005). Οι στατίνες αναστέλλουν προϊόντα του μεβαλονικού μονοπατιού, αποτρέποντας την μεταμεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών του Ras/Rho. Η ενεργοποίηση του Myc είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα στην ηπατοκαρκινογένεση και η απενεργοποίηση του χρησιμοποιώντας ατορβαστατίνες έδειξε ότι μειώνει τον υποτροπιασμό του ΗΚΚ (Cao Z, et al. 2011). Εκτός της απευθείας επίδρασης που έχουν οι στατίνες σε ΗΚΚ, έχει δειχθεί ότι έχουν και αντιική δράση εναντίον του ιού της ηπατίτιδας C (Delang L, et al. 2009). Υπάρχουν όλο ένα και περισσότερες αποδείξεις που συσχετίζουν τη προστατευτική δράση των στατίνων με πιθανότητα εμφάνισης ΗΚΚ (El-Serag HB, et al. 2009) (Tsan YT, et al. 2012).

Διεξήχθη μια πολύ μεγάλη μελέτη σε πληθυσμό στην Ταιβάν που είχε σκοπό να εξετάσει τον συσχετισμό των στατινών με τη πιθανότητα ανάπτυξης ΗΚΚ σε ασθενείς που έπασχαν από ΗCV. Παρακολουθούσαν 260.864 ασθενείς που έπασχαν από ΗCV (σε 13,4% του δείγματος χορηγούσαν στατίνες) χρονική διάρκεια 10,7 χρόνια και παρατήρησαν 27.883 περιπτώσεις ΗΚΚ. Αυτό που παρατήρησαν ήταν ότι τα ποσοστά των περιστατικών (100.000 ανθρώπους ανα έτος) ΗΚΚ σε ασθενείς που έπαιρναν στατίνες ήταν περίπου 340,5 και 1110,2 ήταν τα περιστατικά ασθενών που δεν τους χορηγούσαν στατίνες. Το συμπέρασμα της μελέτης ήταν ότι οι στατίνες μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΗΚΚ κατά 47% σε σχέση με αυτούς που δεν κάνανε χρήση στατινών. Επίσης συσχέτισαν και την ποσότητα δόσης στατινών με την ανταπόκριση των ασθενών: σε ασθενείς που μοιράστηκε συσσωρευμένη

υψηλότερη ημερήσια παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση ποσοστού κινδύνου (Tsan YT, et al. 2013).

Έχουν διεξαχθεί αρκετές ακόμα επιδημιολογικές μελέτες οι οποίες παρουσιάζουν θετικά στοιχεία όσον αφορά στην αντικαρκινική δράση των στατινών και την πιθανότητα εμφάνισης (37% λιγότερο) του ΗΚΚ. Υπάρχουν ακόμα βέβαια πολλοί αστάθμητοι παράγοντες που επηρεάζουν το αποτέλεσμα όπως η φυσική κατάσταση των ασθενών εάν καπνίζουν εάν πάσχουν από κίρρωση ή διαβήτη κλπ. Επίσης πρέπει να γίνουν περαιτέρω μελέτες για να καθοριστεί η πιο αποτελεσματική ποσότητα χορηγούμενης δόσης, η διάρκεια χορήγησης και η συχνότητα καθώς επίσης και χρόνος έναρξης της χορήγησης (Tsan YT, et al. 2013).

Στόχευση του μονοπατιού VEGF/VEGFR, PDGFR και FGFR

Η **σοραφενίβη** (sorafenib) είναι ένας διαθέσιμος αναστολέας multi κινασών που αρχικά σχεδιάστηκε για να στοχεύσει τα VEGFR-1, -2,-3, PDGFR και c-Kit. Σε μία μελέτη ασθενών στη φάση II μη εγχειρήσιμου ΗΚΚ, η σοραφενίβη επέφερε ένα PR σε 2% των ασθενών. Ο χρόνος υποτροπιασμού από την στιγμή της διάγνωσης median time to progression (TTP) ήταν 4.2 mo και το ποσοστό επιβίωσης median overall survival (OS) ήταν 9.2 mo (Abou-Alfa GK, et al. 2006). Στη φάση 3 στις δοκιμές SHARP (Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol), η σοραφενίβη (400 mg δυο φορές τη μέρα) παρέτεινε το OS εν συγκρίσει με άλλους ασθενείς που χρησιμοποιούσαν placebo.(10.7 mo για το γκρουπ ασθενών με σοραφενίβη έναντι 7.9 mo για το γκρουπ ασθενών με placebo) (Llovet JM, et al. 2008).

Η σοραφενίβη είναι η μόνη στοχευμένη θεραπεία που έχει εγκριθεί από πολλές χώρες συμπεριλαμβανομένου της Αμερικής και της Ευρώπης. Ωστόσο έχουν αναφερθεί υψηλά ποσοστά δερματολογικών παρενεργειών (Lee JH, et al. 2013). Ενώ παρατηρήθηκε επίσης παρά της αρχικής αποτελεσματικής ανταπόκρισης στη σοραβενίβη, μετά από ένα χρονικό διάστημα οι ασθενείς χάνουν αυτή τη θετική ανταπόκριση.

Η **Βριβανίβη** (Brivanib) είναι ένας διπλός αναστολέας των αυξητικών παραγόντων VEGFR και FGF. Επειδή το FGF μπορεί να συμβάλει στην απόκτηση «αντοχής» σε μία αντι-VEGFR θεραπεία, η ταυτόχρονη αναστολή των δύο αυτών μονοπατιών από τη βριβανίβη μπορεί να καθυστερήσει την αρχική εξέλιξη σε μία αντιαγγειογενετική θεραπεία και να θεραπεύσει όγκους σε συνδυασμό με μία αντι-VEGFR θεραπεία (ως μια δεύτερης γραμμής θεραπεία) (Bergers G, Hanahan D. 2008) (Tille JC, et al. 2001). Η βριβανίβη πέτυχε ένα έλεγχο της ασθένειας σε ποσοστό 51% και ένα OS 10mo σαν μια πρώτης γραμμής θεραπεία σε ασθενείς με ΗΚΚ. Σε μία άλλη δοκιμή φάσης II, ασθενών με ΗΚΚ στους οποίους χρησιμοποιήθηκε η σοραφενίβη, η βριβανίβη προκάλεσε μείωση όγκου κατά 4.3% και έλεγχο της ασθένειας σε ποσοστό 45.7% (Finn RS, et al. 2012).

Μια μεγάλη έρευνα με δοκιμές στη φάση 3 είχε διεξαχθεί για να αξιολογήσει το ρόλο της βριβανίβης σε προχωρημένους ΗΚΚ. Πιο συγκεκριμένα η δοκιμή BRISK-PS αξιολογούν τη βριβανίβη εναντίον των placebo σε ασθενείς που απέτυχε η θεραπεία με σοραφενίβη. Αυτή η μελέτη δεν κατάφερε να πιάσει το στόχο να βελτιώσει το OS, αλλά η αγωγή με βριβανίβη κατάφερε να βελτιώσει το ποσοστό ανταπόκρισης (Llovet JM, et al. 2013). Η δοκιμή BRISK-FL συγκρίνει τα κλινικά αποτελέσματα της βριβανίβης εναντίον της σοραφενίβης σε ασθενείς με ΗΚΚ που δεν λάβαν αρχικά συστηματική θεραπεία. Το OS 9.5 της βριβανίβης συγκριτικά με το OS 9.9 της σοραφενίβης δεν θεωρείται μια σημαντική διαφορά. Επίσης καμία σημαντική διαφορά δεν εμφανίστηκε στα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών δείχνοντας με αυτό τον τρόπο την αξία της βριβανίβης σε σχέση με το πιο διαδεδομένο φάρμακο και το πιο αποτελεσματικό, την σοραφενίβη (Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung 2013).

Η **σουνιτινίβη** (sunitinib) εκτός της σοραφενίβης, είναι ο πιο μελετημένος αναστολέας multi κινασών που στοχεύει το VEGFR-1 και VEGFR-2. Η σουνιτινίβη δείχνει επίσης και ανασταλτική δραστηριότητα και σε άλλους υποδοχείς τυροσίνης κινάσης, συμπεριλαμβανομένου του PDGFR-a/b, c-KIT, FLT3, και των RET κινασών (Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung 2013). Η σουνιτινίβη ενδείκνυται για τη θεραπεία νεφρικού καρκινώματος και για γαστροοισοφαγικούς όγκους (Abrams TJ, et al. 2003) (Abrams TJ, et al. 2003)

(Murray LJ, et al. 2003). Έχουν πραγματοποιηθεί 2 έρευνες ασθενών στη φάση II με προχωρημένο στάδιο ΗΚΚ χρησιμοποιώντας σουνιτινίβη. Στην πρώτη το ποσοστό PR ήταν 2.9% και 50% σταθεροποίησαν την ασθένεια (Zhu AX, et al. 2009). Στη δεύτερη έρευνα το ποσοστό PR ήταν 2.7% και 35% των ασθενών σταθεροποίησαν την ασθένεια. Μια σύγκριση της σοραφενίβης με την σουνιτινίβη σε μία μελέτη στη φάση 3, σταμάτησε επειδή η σουνιτινίβη δεν κατάφερε να δείξει στοιχεία ανωτερότητας ή έστω ισότητας με την σοραφενίβη όσον αφορά την επέκταση του χρόνου επιβίωσης σε ασθενείς με προχωρημένο ΗΚΚ (Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung 2013).

Το μονοπάτι VEGF μπορεί να στοχευθεί με δύο τρόπους: Αντί-VEGF μονοκλωνικά αντισώματα των αναστολέων των υποδοχέων τυροσίνης κινάσης που σχετίζονται με το VEGFR. Το αντί-VEGF μονοκλωνικό αντίσωμα bevacizumab ήταν το πρώτο αγγειογενές ανασταλτικό που είχε εγκριθεί ως ένας αντινεοπλαστικός παράγοντας. Το bevacizumab έχει δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ασθενείς με προχωρημένο ΗΚΚ (Presta LG, et al. 1977) (Siegel AB, et al. 2008). Ο συνδυασμός του bevacizumab με άλλους κυτοτοξικούς παράγοντες (gemcitabine, oxaliplatin, capecitabine) ή με erlotinib έχει επίσης δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε τέσσερις δοκιμές φάσης II ασθενών με προχωρημένο ΗΚΚ (Hsu CH, et al. 2010) (Sun W, et al. 2011) (Thomas MB, et al. 2009) (Zhu AX. 2006).

Η **βαταλανίβη** είναι ένας αναστολέας τυροσίνης κινάσης που προσδένεται απευθείας στους VEGF υποδοχείς. Η βαταλανίβη αναστέλλει τους Flt-1, Flk-1/KDR και κάποιους άλλους υποδοχείς τυροσίνης κινάσης κλάσης 3 όπως οι PDGFR-β, Flt-4, c-Kit, c-Fms (Wood JM, et al. 2000). Σε μία μελέτη ασθενών με προχωρημένο ΗΚΚ φάσης I/II, ο συνδυασμός βαταλανίβης και doxorubicin είχε ως αποτέλεσμα μία ανταπόκριση σε ποσοστό 26% με όλους τους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν να πετυχαίνουν PR. Ένα 20% των ασθενών πέτυχαν SD τουλάχιστον για 12 wk (Yau T, et al. 2010).

Η **Linifanib** (ABT-869) είναι ένας νέος αναστολέας τυροσίνης κινάσης με πιθανή δράση εναντίον των οικογενειών VEGFR και PDGFR (Albert DH, et al.

2006) Σε μία έρευνα όπως οι προαναφερθήσες, βαθμός ανταπόκρισης ήταν στο 9.1% το TTP ήταν 3.7 mo και το OS ήταν 9.7 mo (Toh HC, et al. 2013).

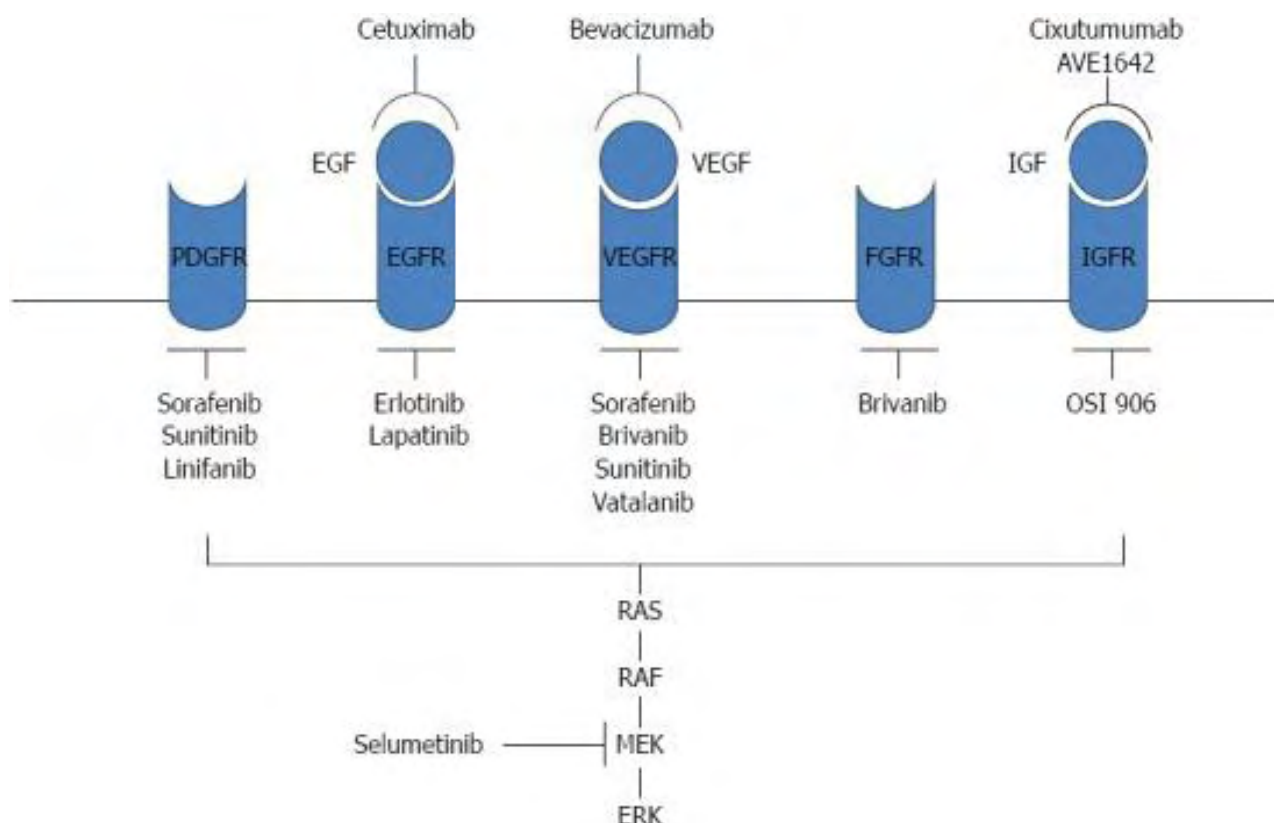
TSU- 68 είναι αναστολέας τυροσίνης κινάσης των οικογενειών FGFRs, VEGFRs, και PDGFR και έχει δείξει κάποια κλινικά αποτελέσματα στη φάση I/II δοκιμών σε ασθενείς με προχωρημένο ΗΚΚ που δεν έχουν υποστεί κάποια αγωγή. Η αγωγή με το TSU-68 σε ασθενείς με ανεγχείρητο και μεταστατικό καρκίνο σχετιζόταν με τη σταθεροποίηση της ασθένειας ή τη βελτίωση σε ποσοστό 51% των ασθενών (Kanai F, et al. 2011).

Η **σεντιρανίβη** (seditranib) είναι ένας ακόμα επιλεκτικός αναστολέας των VEGFR-1, -2, -3. Η σεντιρανίβη δείχνει επίσης δραστηριότητα εναντίον των c-Kit, PDGFR-β, και FLT4 σε νανομοριακές συγκεντρώσεις. Σε κλινικές δοκιμές φάσης II προχωρημένων περιπτώσεων ΗΚΚ το OS ήταν 5.8 mo. Κανένας ασθενής δεν βίωσε επιβιβεωμένη αναταπόκριση. Το TTP ήταν 2.8 mo (Alberts SR, et al. 2012).

Τα Σηματοδοτικά μονοπάτια Ras/Raf/MEK/ERK και στοχευμένοι μοριακοί παράγοντες οι οποίοι είναι αυτή την στιγμή διαθέσιμοι ή είναι προς ανάπτυξη για ΗΚΚ. EGF: επιδερμικός αυξητικός παράγων. EGFR, EGF, ERK (εξωκυτταρικό σήμα ρύθμισης της κινάσης), FGFR (Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung 2013) Εικόνα 10.

Εικόνα 10

Σηματοδοτικά μονοπάτια RAS/RAF/MEK/ERK και μοριακοί στοχευμένοι παράγοντες, οι οποίοι είναι τώρα διαθέσιμοι ή βρίσκονται υπό ανάπτυξη για τον ΗΚΚ.



Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: Current and future.
Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung (2013).

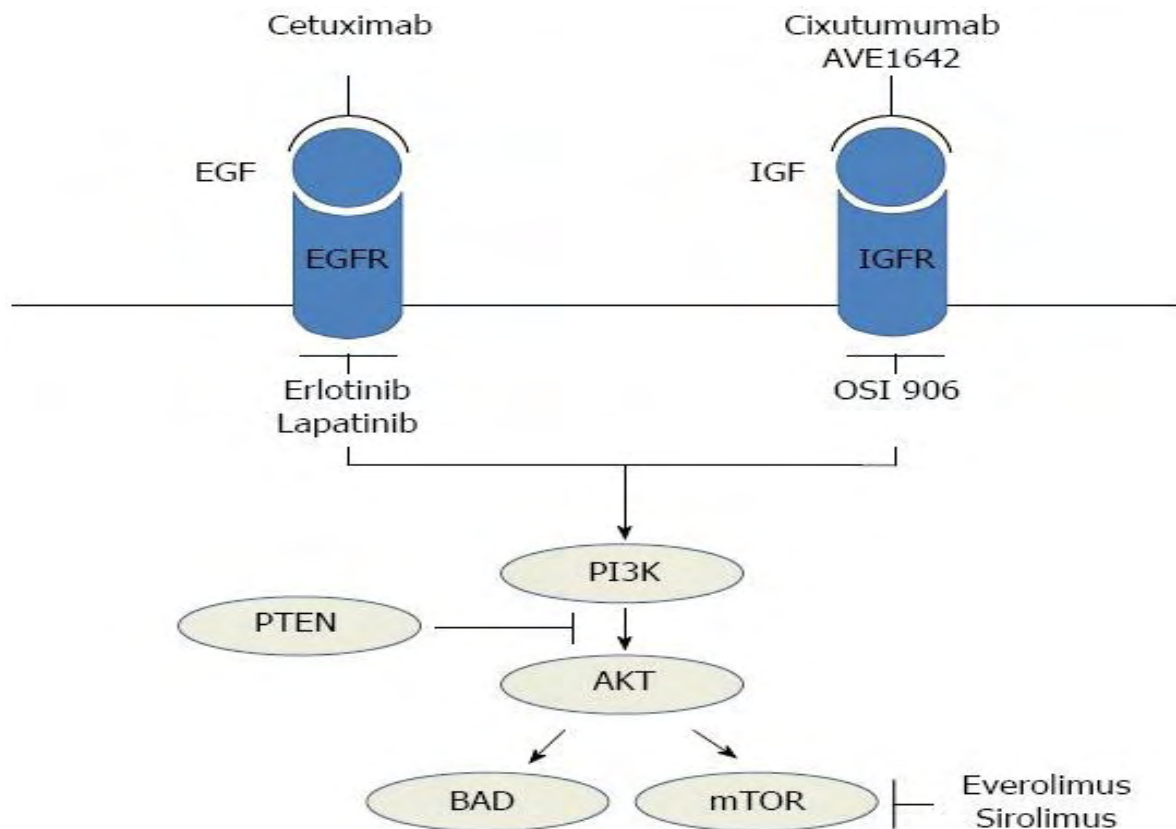
Στόχευση του μονοπατιού MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK)

Η **σελουμετινίβη** (Selumetinib) (AZD6244) είναι ένας αναστολέας της πρωτεΐνης κινάσης MEK1/2. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η Selumetinib και η ραπαμικίνη ασκούν αντικαρκινική και αντιαγγειογενετική δράση σε προκλινικά μοντέλα ΗΚΚ (Huynh H. 2010). Στην φάση I/II η μελέτη της selumetinib σε συνδυασμό με την sorafenib σε προχωρημένο ΗΚΚ, ήταν 3

μερικές ανταποκρίσεις , 6 σταθεροποιημένες ασθένειες και 2 εξελισσόμενες σε 11 ασθενείς, και οι κοινές παρενέργειες όπως κόπωση, διάρροια, εξανθήματα και υπέρταση (Choo S, et al. 2012). Κάποια άλλη μελέτη της φάσης I/II έχει αξιολογήσει τον συνδυασμό του αναστολέα του MEK RDEA119 και της sorafenib σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο (Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung 2013).

Εικόνα 11

Το P13K/AKT/mTOR μονοπάτι και οι μοριακοί παράγοντες που στοχεύουν αυτό το μονοπάτι



Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: Current and future. Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung (2013).

Στόχευση του μονοπατιού P13K/AKT/MTOR

Η αναστολή της δραστηριότητας του mTOR με ραπαμικίνη (everolimus) είχε ευεργετικά αποτελέσματα και αύξανε τα ποσοστά επιβίωσης καθώς κατέστειλε την επανεμφάνιση (Villanueva A, et al. 2008). Αυτά τα αποτελέσματα συνιστούν ότι το mTOR μονοπάτι παίζει ένα πάρα πολύ σημαντικό ρόλο στη παθογένεση του ΗΚΚ.

Ο **RG7321** αναστολέας του P13K και η **περιφοσίνη** που είναι αναστολέας του Akt στοχεύουν το P13K/AKT/mTOR και βρίσκονται σε αρχικό κλινικό στάδιο ανάπτυξης. Οι αναστολείς του mTOR **everolimus** (RAD001), **sirolimus** (Rapamune) και **temsirolimus** (CC-779) έχουν μελετηθεί και για την επάρκεια και για την ασφάλεια χρήσης τους σε ασθενείς με ΗΚΚ. Το Everolimus πέτυχε μια μέση επιβίωση άνευ εξέλιξης/εκδήλωσης/ 3.8 έως 8,4 μήνες στη φάση I/II σε ασθενείς με προχωρημένο ΗΚΚ (Zhu AX, et al. 2011). Στη φάση II μια μελέτη του sirolimus σε ασθενείς με προχωρημένο ΗΚΚ, έδειξε ότι έχει κάποια αντικαρκινική δράση (Decaens T, et al. 2012). Ωστόσο πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες για να καθοριστεί η αξία αυτού του παράγοντα. Για το temsirolimus, έναν αναστολέα του mTOR, έχει εγκριθεί για θεραπεία σε προχωρημένο καρκίνο του νεφρού και πρόσφατα είναι υπό έρευνα για την αποτελεσματικότητα και για την χρησιμότητα σε ΗΚΚ (Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung 2013).

Στόχευση των σημάτων EGFR, IGF, HGF/c-MET

Πράγματι το μπλοκάρισμα του IGF-1R κάνει τον καρκίνο πιο ευαίσθητο στο φάρμακο trastuzumab (Josep M. et al. 2008). Υπάρχουν κάποια φάρμακα που στοχεύουν το EGFR όπως τα αντι-EGFR αντισώματα (cetuximab, panitumumab) και αναστολείς της τυροσίνης κινάσης του EGFR (erlotinib, lapatinib, gefitinib), τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως σε θεραπευτικές αγωγές του ΗΚΚ (Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung 2013).

Το **cetuximab** είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει την εξωκυτταρική περιοχή του EGFR. Σε κλινικές δοκιμές φάσης II σε ασθενείς με

προχωρημένο HKK το OS ήταν 9.6 mo και το PFS ήταν 1.4 mo. (Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung 2013).

Το **Erlotinib** είναι ένας αναστολέας της τυροσίνης κινάσης του EGFR. Σε μελέτες in vitro κατέστειλε την αύξηση EGFR έκφρασης στις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Έχειδειχθεί ότι καταστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι RAF/MEK/ERK και μπλοκάρει τον σηματοδοτικό μεταγωγέα και ενεργοποιητή του μεσολαβητικού σήματος της μεταγραφής (Huether A, et al. 2006). Σε μία δοκιμή SEARCH φάσης 3 (Sorafenib and Erlotinib, a Randomized Trial Protocol) προχωρημένου HKK, 362 ασθενείς λαμβάναν συνδυασμό σοραφενίβης με erlotinib και 358 ασθενείς λαμβάναν συνδυασμό σοραφενίβης με placebo. Δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη διαφορά του OS ή TTP μεταξύ των δύο ομάδων. Η προσθήκη του erlotinib στη σοραφενίβη δεν κατάφερε να παρατείνει το προσδόκιμο επιβίωσης (Zhu AX, et al. 2012).

Το **lapatinib** είναι ένας διπλός αναστολέας του EGFR και του HER-2/NEU που δρα μπαίνοντας μέσα στην περιοχή δεσμού ATP των δύο υποδοχέων (Burris HA, et al. 2005). Σε κλινικές δοκιμές φάσης II το lapatinib έδειξε στοιχεία αντικαρκινικής δραστηριότητας (Ramanathan RK, et al. 2009). Σε 40 ασθενείς με HKK το ποσοστό που ανταποκρίθηκε ήταν 5% το PFS ήταν 2.3 mo και το OS ήταν 6.2 mo. (Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung 2013).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι IGF/IGFR ρυθμίζει αρκετές κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού, κίνησης, αναστολής και απόπτωσης (Golan T and Javle M, et al. 2011). Ο συνδετικός δεσμός με το IGF-1R πυροδοτεί την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα, ο οποίος με τη σειρά του ξεκινά μια διαδικασία με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του P13K, της πρωτεϊνικής κινάσης B και του μονοπατιού RAF/MEK/ERK (Pollak MN, et al. 2004). Στους HKK η απορύθμιση του IGF συμβαίνει κυρίως στο επίπεδο του IGF-2. Το IGF-2 υπερεκφράζεται σε ποσοστό 16-40% των ανθρώπινων HKK και το IGF-2R (ένας εναλλακτικός υποδοχέας για το IGF-2) υποεκφράζεται σε περίπου 80% των περιπτώσεων HKK (Cariani E, et al. 1988) (De Souza AT, et al. 1995). Έχει αναφερθεί μια συσχέτιση μεταξύ της προόδου της ασθένειας, της μετάστασης, και της επιβίωσης με τη λειτουργία του IGF και IGFR στους HKK (Chen YW, et al. 2009) (Scharf JG and Braulte

T. 2003). Πολλές στρατηγικές που στοχεύουν αυτό το σύστημα, συμπεριλαμβανομένου μονοκλωνικών αντισωμάτων εναντίον του IGF-1 υποδοχέα καθώς επίσης και μικρών ανασταλτικών μορίων εναντίον της λειτουργίας της τυροσίνης κινάσης του IGF-1R βρίσκονται υπό έρευνα. Προ κλινικές δοκιμές σε ΗΚΚ έδειξαν ότι το IMC-A12 (cituxumumab) ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, μπλοκάρει το IGF-1R (Abou-Alfa GK, et al. 2011). Σε μία έρευνα φάσης 1 υπήρξε μερική ανταπόκριση στο IMC-A12. Ωστόσο σε μελέτη φάσης II με προχωρημένο ΗΚΚ φάνηκε ότι το IMC-A12 είναι ανενεργό ως μονοθεραπεία (Abou-Alfa GK, et al. 2011). 46% των ασθενών ανέπτυξε υπεργλυκαιμία βαθμό 3-4 (Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung 2013).

Το **BIIB022** είναι ένα αντι-IGF-1R μονοκλωνικό αντίσωμα που μπλοκάρει το δεσμό τόσο του IGF-1 όσο και του IGF-2 με το IGF-1R. Αυτό το μονοκλωνικό αντίσωμα φαίνεται ότι δεν προκαλεί υπεργλυκαιμία στους ασθενείς.

Το **AVE1642** είναι ένα ακόμα μονοκλωνικό αντίσωμα που μπλοκάρει κυρίως το IGF-1R. Αυτό το αντίσωμα αξιολογήθηκε σε συνδυασμό με τη σοραφενίβη σε ασθενείς με προχωρημένο ΗΚΚ φάσης 1 και παρατηρήθηκε σταθεροποίηση της ασθένειας στους περισσότερους ασθενείς (Faivre S, et al. 2011).

Το **HGF/Met** μονοπάτι εμπλέκεται στην ανάπτυξη του όγκου, στη διεισδυτικότητα και στην αγγειογένεση σε διάφορους τύπους καρκίνου (You WK and McDonald DM. 2008). Ο c-Met είναι ένας υποδοχέας τυροσίνης

κινάσης για τον σύνδεσμο του HGF. Το HGF προάγει την ενεργοποίηση του c-Met, το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση κάποιων επιδραστικών μορίων όπως η φωσφολιπάση C, P13K και ERK (Yap TA, de Bono JS, et al. 2010). Παρατηρήθηκε υπερέκφραση του c-Met σε ποσοστό 20%-48% σε ασθενείς με ΗΚΚ και αυτή η υπερέκφραση συνδέεται με τα μειωμένα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών (Boix L, et al. 1994) (Tavian D, et al. 2000) (Ueki T, et al. 1997).

Το **tivantinib** (ARQ 197) είναι ένας επιλεκτικός καταστολέας του MET υποδοχέα τυροσίνης κινάσης με ευρύ φάσμα αντικαρκινικής δραστηριότητας, ως μοναδικός θεραπευτικός παράγοντας. Η υπερέκφραση του MET έχειδειχθεί ότι αποτελεί ένα αρνητικό προγνωστικό παράγοντα σε ασθενείς με

ΗΚΚ μετά από μία αποτυχημένη θεραπεία με σοραφενίβη. Το tivantinib εμφάνισε τα διπλά ποσοστά PFS και OS εν συγκρίσει με τα placebo ως δεύτερης γραμμής θεραπεία ασθενών με προχωρημένο ΗΚΚ (Santoro A, et al. 2013). Επίσης πολλά υποσχόμενος θεωρείται ο συνδυασμός του tivantinib με τη σοραφενίβη. Αναφέρθηκαν κάποιες παρενέργειες όπως αιματολογική τοξικότητα. Τα μεγάλα ποσοστά ουδετεροπενίας ασθενών οδήγησαν στη μείωση της χορηγούμενης δόσης από 360 mg bit σε 240mg bit. (Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung 2013).

Πίνακας 1

Μοριακοί στόχοι και θεραπευτικοί παράγοντες

Table 1	
Molecular targets and therapeutic agents	
Molecular targets	Therapeutic agents
VEGF/VEGFR	Sorafenib
	Bevacizumab
	Vatalanib (PTK787)
	Cediranib (AZD2171)
	Brivanib
	Sunitinib
	Linifanib (ABT869)
EGF/EGFR	Cetuximab
	Erlotinib
	Lapatinib
	OSI-906

Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: Current and future. Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung (2013).

Πίνακας 2

Επιτυχή αποτελέσματα από στοχευμένες θεραπείες σε ΗΚΚ

Table 2 Efficacy results of targeted therapies for advanced hepatocellular carcinoma			
Molecular targets/agents	Phase	Efficacy	Ref.
VEGF/VEGFR			
Sorafenib	Phase III SHARP	Median OS: 10.7 months	[58]
	Sorafenib vs placebo	7.9 mo	
Sunitinib	Phase III (Asian)	Median OS: 6.5 months	[59]
	Phase II	Median PFS: 3.9 mo	[65]
		Median OS: 9.8 mo	
	Phase III	Median OS: 7.9 months	[68]
	Sunitinib vs sorafenib	10.2 mo	
Brivanib	Phase II, first-line	Median PFS: 2.8 mo	[68]
		Median OS: 10 mo	
	Phase II, second-line	Median PFS: 2.7 mo	[69]

Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: Current and future.
Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung (2013).

Στόχευση μονοπατιών μεταβολισμού γλυκόζης (GAPDH)

Saframycin (Saf A)

Έχειδειχθεί ότι η saf A έχει αντι-πολλαπλασιαστική δράση και μετριάξει τη δράση της GAPDH. Ωστόσο χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για κατά πόσο η Saf A αποτελεί συγκεκριμένο αναστολέα της GAPDH (Shanmugasundaram Ganapathy-Kanniappan. et al. 2012).

Koningic acid (KA)

Ο μεταβολίτης Koningic acid έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την γλυκόλυση μέσω της αναστολής της GAPDH (Endo A, et al. 1985) (Kato M, et al. 1992). Η αντιγλυκολυτική δράση του έχει καταγραφεί σε πολλά *in vitro* μοντέλα. Η αποτελεσματικότητα του KA φαίνεται ότι είναι ανάλογη της γλυκολυτικής εξάρτησης των κυττάρων, ως εκ τούτου τα κύτταρα που επιδεικνύουν αυξημένη γλυκόλυση να καθίστανται περισσότερο ευαίσθητα (Kumagai S, et al. 2008).

3-Bromopyruvate (3-BrPA)

Ο μεταβολικός αναστολέας 3-BrPA, που είναι ένα ανάλογο του πυρουβικού οξέος, έχει κερδίσει το ενδιαφέρον εξαιτίας της αξιόλογης αντικαρκινικής δράσης που δείχνει. Σε *in vitro* τεστ που διεξήχθησαν εναντίον ανθρώπινων HKK είχε καταγραφεί ότι το 3-BrPA ανέστειλλε την γλυκόλυση και μπλοκάριζε την παραγωγή ATP και προκαλούσε απόπτωση κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση (Ganapathy-Kanniappan S, et al. 2009). Το 3-BrPA είναι ένας από τους πολύ λίγους παράγοντες που επέδειξαν ουσιώδη στοιχεία ότι αποτελεί εκλεκτικό αναστολέα της GAPDH. Εν αντιθέσει με άλλους αλκυλιωτικούς παράγοντες, το 3-BrPA έδειξε τρομερή εκλεκτικότητα σε μοριακούς στόχους, ενισχύοντας την αντι-ογκογενή δράση του με το να προάγει το άδειασμα ενέργειας, να αποδιοργανώνει την οξειδοαναγωγή ισορροπία και να προάγει το ενδοκυτταρικό στρες (Shanmugasundaram Ganapathy-Kanniappan. et al. 2012).

Iodoacetate (IA)

Κάποιοι Επιστήμονες έδειξαν μέσα από δοκιμές τον ανασταλτικό ρόλο του IA σε μικρές συγκεντρώσεις. Σε αυτές τις μικρές συγκεντρώσεις (3 micromoles), τα καρκινικά κύτταρα άλλαξαν από γλυκόλυση σε οξειδωτική φωσφορυλίωση χωρίς σημάδια κυτοτοξικότητας. Ωστόσο πρόσφατη χρήση του IA ως μεταβολικός αναστολέας σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (περίπου 100 micromoles), συνέβησε σημαντική κυτοτοξικότητα (Sanchez-Arago M and Cuezva JM. 2011).

Methylglyoxal (MG)

Το Methylglyoxal είναι ένας μεταβολίτης του μεταβολισμού της γλυκόζης και σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της γλυκόλυσης από την αποσφωρυλίωση του glyceraldehyde-3-phosphate ή από dihydroxyacetone (Lee HJ, et al. 2005). Έχει αναφερθεί ότι το MG αναστέλλει την ογκογένεση παρεμβαίνοντας στην ανάπτυξη των κακοηθών κυττάρων (Ray M, et al. 1977). Έχει αναφερθεί στο παρελθόν ότι το MG στοχεύει το ένζυμο GAPDH και η αναστολή αυτή είναι βασικός μηχανισμός στην αντικαρκινική δράση (Halder J, et al. 1933). Το MG μετριάζει την γλυκόλυση και αυτός είναι ο λόγος που απενεργοποιείται η GAPDH (Shanmugasundaram Ganapathy-Kanniappan. et al. 2012).

Μέσα από πειράματα έχειδειχθεί η εκλεκτικότητα που δείχνει το MG (δείχνοντας ότι η GAPDH είναι ο μοναδικός ή τουλάχιστον ο βασικός του στόχος).

RNAi

Η θεραπευτική προοπτική του RNAi (interference) για τη θεραπεία του ΗΚΚ όλο και περισσότερο τυγχάνει αναγνώρισης (Xu C, et al. 2011). Ωστόσο το μόνο θεραπευτικό RNAi εναντίον του ΗΚΚ που πέρασε σε δοκιμές φάσης 1 είναι το ALN-VSP02 το οποίο στοχεύει την kinesin-spindle πρωτεΐνη και τους αγγειακούς ενδοθήλιους αυξητικούς παράγοντες (Clinical Trial. Gov, identifier #NCT00882180). Ως εκ τούτου υπάρχει ακόμα πολύ πεδίο ανεξερεύνητο και πρέπει να γίνουν επιπλέον έρευνες στο τομέα των RNAi (Shanmugasundaram Ganapathy-Kanniappan. et al. 2012).

Θεραπείες που στοχεύουν τοπικά

Οι θεραπείες καθοδήγησης με εικόνα ειδικά οι ενδο-αρτηριακές θεραπείες, παίζουν ένα βασικό ρόλο στην αγωγή των ασθενών με ΗΚΚ (Liapi E and Geschwind JF. 2007) (Hong K, et al. 2006). Το πλεονέκτημά τους είναι ότι όχι μόνο δίνουν πρόσβαση στο πυρήνα αλλά και στα περιφερικά τμήματα του όγκου. Επιπλέον, πετυχαίνεται μεγαλύτερη συγκέντρωση του φαρμάκου στο

κέντρο του όγκου αποτρέποντας παράλληλα την έκθεση των υγείων ιστών στη τοξικότητα του φαρμάκου. Για παράδειγμα, η χορήγηση του 3-BrPA ενδοαρτηριακά σε μοντέλα ΗΚΚ ζώων έδειξε μεγάλη αντκαρκινική δράση (Ko YH, et al. 2001) (Geschwind JF, et al. 2002) και στις περισσότερες επιπτώσεις αύξησε σημαντικά το προσδόκιμο επιβίωσης (Ganapathy-Kanniappan S, et al. 2012) (Ko YH, et al. 2004).

Στόχευση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου DLC1

Οι θεραπείες που βασίζονται στην δραστηριότητα του DLC1 απαιτούν μια πλήρη κατανόηση των μονοπατιών που επηρεάζονται από την απώλεια αυτού του γονιδίου (Lahoz A and Hall A. 2008). Η αναστολή του μονοπατιού RhoA και της **Rho κινάσης** (ROCK) (ένας παράγοντας που επηρεάζει καταρροϊκά το Rho) είναι μια από τις καλύτερες θεραπευτικές επιλογές (Xue W, et al 2008) (Grise F, et al. 2009).

Πρόσφατα καταβάλλονται μεγάλες προσπάθειες για την ανάπτυξη μικρών μορίων-αναστολέων της Rho κινάσης, για θεραπεία διαφόρων ασθενειών συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Ένας αποτελεσματικός θεραπευτικός παράγοντας, ο Y-27632 έδειξε διακριτή αντιμεταστατική δράση στο ΗΚΚ (Takamura M, et al. 2001) (Ogawa T, et al. 2007). Ο Wf-536, ένας παράγοντας που προήλθε από τον Y-27632, ανέστειλε τη μετάσταση του μελανώματος in vivo, ωστόσο δεν έχει ακόμα τεσταριστεί ΗΚΚ (Nakajima M, et al. 2003) (McHenry PR and Vargo-Gogola T. 2010). Κάποια στοιχεία της δράσης ενός αναστολέα, ο οποίος είναι ανώτερος του αναστολέα Y και στοχεύει επιλεκτικά τη ROCK πρόκειται σύντομα να δημοσιοποιηθούν (Drazen B. et al. 2012).

Ένας αριθμός συστατικών τα οποία αποκαθιστούν την έκφραση του DLC1, παρατείνουν την ζωή των πρωτεϊνών του ή μιμούνται τη λειτουργία του, μπορούν επίσης να είναι αποτελεσματικά στη θεραπεία κατά του ΗΚΚ. Η ικανότητα της **φλαβόνης** (flavone) να αποκαθιστά την έκφραση του DLC1 και ως επακόλουθο να καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού, δεν είναι ένα απλό μεμονωμένο

παράδειγμα (Ullmannova V and Popescu NC.2007). Άλλοι παράγοντες όπως τα all-trans ρετινοϊκό οξύ και οι peroxisome proliferator-activated υποδοχείς γ (PPARγ) αυξάνουν σημαντικά την έκφραση του DLC1 στα καρκινικά κύτταρα (Durkin ME, et al. 2007).

Ακόμα ένας παράγοντας, η **μορελοφαλβόλη** (morellofalcone) αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου και την αγγειογένεση με το να στοχεύει τη RhoA και τη Rac1 GTPάση (Pang X, et al. 2009). Ένας νέος συνθετικός παράγοντας προερχόμενος από τη φλαβόνη προάγει την απόπτωση μέσω των υποδοχέων του κυτταρικού θανάτου (Liu H, et al. 2010).

Η **θειαζολιδινεδιονίνη** (thiazolidinedione), ένας συνθετικός ενεργοποιητής του PPARγ, αναστέλλει την ανάπτυξη του PPARγ, το οποίο εκφράζεται σε ανθρώπινους καρκίνους του παχέος εντέρου με το να προάγει τη τερματική διαφοροποίηση και την αύξηση της p21 (Yoshizumi T, et al. 2004). Επειδή οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι η κύρια αιτία της χαμηλής έκφρασης ή απενεργοποίησης του DLC1, οι θεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν ως βάση την ικανότητα των αναστολέων DNA –μεθυλ-τρανσφεράση και αποκετυλίωση ιστονών (HDAC) να αποκαθιστούν την έκφραση του DLC1 στα καρκινικά κύτταρα (Lahoz A and Hall A. 2008). Στα HKK κύτταρα, ήδη χρησιμοποιούνται σε κλινικές δοκιμές μια συνδυαζόμενη θεραπεία που περιλαμβάνει ένα πολύ ισχυρό ανασταλτικό παράγοντα, το superoylanilide hydroxamic acid. (Zhou X, et al. 2010).

Άλλος παράγοντας με ευεργετικές ιδιότητες είναι το ursodeoxycholic acid (UDCA), το οποίο αναστέλλει in vitro τον HKK κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της αύξησης του χρόνου παρουσίας των πρωτεϊνών του DLC1 και της μείωσης της δραστηριότητας της RhoA (Chung GE, et al. 2011).

Στόχευση του ογκογονιδίου MYC

Παρά της προσπάθειας που γίνεται όλα αυτά τα χρόνια και παρά της προόδου που έγινε όσον αφορά την κατανόηση της ρύθμισης και λειτουργίας του γονιδίου MYC, η ανάπτυξη θεραπειών που να στοχεύουν αποκλειστικά το MYC γονίδιο, παραμένουν ακαθόριστες (Meyer N and Penn LZ. 2008). Οι

μελλοντικές φαρμακευτικές παρεμβάσεις πρέπει να λαμβάνουν υπόψη το διαφοροποιητικό ρόλο που παίζει το MYC στο κομμάτι της καταστολής ή της ανάπτυξης του όγκου, το οποίο εξαρτάται από τα επίπεδα έκφρασης αυτού του γονιδίου και να λαμβάνουν επίσης υπόψη την τροποποίηση αυτών των δύο αντίθετων λειτουργιών των ογκοπρωτεϊνών MYC (Murphy DJ, et al. 2008) (Larsson LG and Henriksson MA. 2010).

Κάποια μικρά μόρια-αναστολείς του MYC έδειξαν αντι-πολλαπλασιαστική δράση στα κύτταρα του HKK *in vitro* και επιπλέον κατέστησαν τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στη χημειοθεραπεία. Ωστόσο οι εν λόγω παράγοντες δεν ήταν το ίδιο αποτελεσματικοί *in vivo* (Lin CP, et al. 2010). Η **κουαρφλοξίνη** (ciprofloxacin) CX-3453 η οποία στοχεύει την έκφραση του ογκογονιδίου MYC, έφτασε σε επίπεδο κλινικών δοκιμών για νευροενδοκρινές καρκίνωμα (Brooks TA and Hurley LH. 2010). Στο HKK μπορεί να έχει ευεργετικές ιδιότητες μέσω της καταστολής των αγγειακών ενδοθηλιακών παραγόντων ανάπτυξης ή συνδυαστικά με τη σοραφενίβη, να τη βοηθήσει ώστε να αυξήσει ακόμα περισσότερο την αντικαρκινική της δράση (Lin CP, et al. 2010).

Διάφορες έρευνες επιδεικνύουν την ευεργετική δράση των στατίνων ενάντια στο MYC ογκογονίδιο. Μία πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η αναστολή του συνενζύμου HMG A από την **ατορβαστατίνη** έχει ως αποτέλεσμα το μπλοκάρισμα της φωσφορυλίωσης του ογκογονιδίου MYC και της ενεργοποίησής του, οδηγώντας τελικά σε καταστολή των HKK ανθρώπινων κυττάρων και κυττάρων ποντικού *in vivo* και *in vitro*. Η αναστολή της μεθυλίωσης του MYC, το πιο πιθανό είναι να προήλθε μέσω της αναστολής των GTPάσων στο Rac μονοπάτι *in vitro* (Cao Z, et al. 2011). Σε κάποια κλινικά τεστ που χορηγήθηκαν **πραβαστατίνες** (Pravastatin), βελτιώθηκε η επιβίωση των ασθενών με HKK (Kawata S, et al. 2001). Όσον αφορά τις επιδράσεις των στατινών, υπάρχει μια σημαντική συσχέτισή τους με το γονίδιο DLC1, στου οποίου στις COOH-τελικές περιοχές βρίσκεται μια START περιοχή και η οποία θεωρείται ότι είναι σημαντική στο δεσμό της χοληστερόλης (Homma Y and Emori Y. 1995) (Ponting CP, Aravind L. 1999). Ένας μεταφορέας χοληστερόλης αλληλεπιδρά με μια DLC1 START περιοχή και συμβάλει στην ογκοκατασταλτική δραστηριότητα του DLC1 (Du X,

et al. 2011). Είναι πιθανό ότι οι στατίνες μπορεί να επηρεάζουν την κανονική START λειτουργία (Drazen B. et al. 2012).

Non-Coding RNAs ως θεραπεία για ΗΚΚ

Κατά την τελευταία δεκαετία υπάρχουν όλο και περισσότερα στοιχεία που ενισχύουν την ύπαρξη και το βασικό λειτουργικό ρόλο των μη κωδικών RNA (Non-coding RNAs) στον ανθρώπινο καρκίνο (Huarte M and Rinn JL. 2010). Τα ncRNAs μπορούν να καταταχθούν σε δύο κατηγορίες: Τα μικρά RNA, με λιγότερο από 200 νουκλεοτίδια, και τα μεγάλα RNA τα οποία έχουν περισσότερο από 200 νουκλεοτίδια. Και οι δύο ομάδες περιλαμβάνουν λειτουργικώς ετερογενείς τύπους RNA (Chiara Braconi and Tushar Patel. 2012).

Αρκετά ncRNA έχουν ταυτοποιηθεί και έχει διευκρινιστεί η εμπλοκή τους στην κυτταρική φυσιολογία και στην βιολογία του καρκίνου. Ωστόσο αρκετά nc RNA δεν έχουν χαρακτηριστεί όπως επίσης και ο ρόλος τους στη βιολογία του καρκίνου. Μεταξύ των μικρών RNA τα πιο εκτενώς μελετημένα είναι τα microRNAs. Τα miRNAs είναι μικρά ncRNA που έχουν μήκος περίπου 22 νουκλεοτίδια, τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων με μηχανισμούς όπως την μεταμεταγραφική αποικοδόμηση του mRNA. Έχει δειχθεί ότι τα miRNA έχουν υποστεί μεταλλαγές στην έκφραση του ΗΚΚ, αλλά και σε άλλους τύπους καρκίνου. Φαίνεται ότι παίζουν έναν κύριο ρόλο στη καρκινογένεση μέσω της ρύθμισης της έκφρασης κάποιων σημαντικών γονιδίων που κωδικοποιούν είτε ογκοκαταστολείς είτε ογκογονίδια. Για αυτό η απορύθμιση της έκφρασης των miRNAs μπορεί να συμβάλει στη δημιουργία και την εξέλιξη του όγκου (Chiara Braconi and Tushar Patel. 2012).

Αρκετές μελέτες έχουν ταυτοποιήσει μεταλλαγές στα miRNAs στον ΗΚΚ, με συγκεκριμένα miRNAs να αναγνωρίζονται συνεχώς είτε ως αυξανόμενα είτε ως μειωμένα στους ΗΚΚ ιστούς και στις κυτταρικές σειρές (πίνακας 1) Αυξημένη έκφραση κάποιων επιλεγμένων miRNAs έχει συσχετιστεί με μεταλλαγές σε σημαντικές βιολογικές διαδικασίες. Για παράδειγμα το miR-221/222 εμφανίζεται συχνά στους ΗΚΚ και μεσολαβεί σε συγκεκριμένες

ογκογενείς επιδράσεις μέσω μηχανισμών όπως η καταστολή του ογκοκασταλτικού γονιδίου phosphatase και tensin homolog (PTEN) (Garofalo M, et al. 2009) (Wong QW, et al. 2009), που μπλοκάρει τον πολλαπλασιασμό με τη καταστολή των πρωτεϊνών p27 και p57 του κυτταρικού κύκλου (Fornari F, et al. 2008) (Pineau P, et al. 2010), ενεργοποιεί τον στόχο του μονοπατιού ραπαμικίνης μέσω της καταστολής του DDIT4 και προάγει την απόπτωση μέσω της διαμόρφωσης του B κυτταρικού λεμφώματος Bcl-2. Παρομοίως το miR-21, το οποίο απορυθμίζεται σε πολλούς καρκίνους και το οποίο είναι αυξημένο στον ΗΚΚ, μπορεί να μεσολαβεί σε συγκεκριμένες επιδράσεις μέσω της αναστολής του PTEN και του AKT μονοπατιού (Meng F, et al. 2007). Οι συνδυαστικές επιδράσεις ενός μόνο miRNA σε πολλαπλά γονίδια, ή κάποια miRNA σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο, καθιστούν αυτά τα παρεκκλινόμενα miRNA (εφόσον οι παρεκκλίσεις τους έχουν ως αποτέλεσμα την ογκογένεση) ως θεραπευτικό στόχο. Άλλα miRNAs που αυξάνονται στο ΗΚΚ είναι τα miR-181, miR-106, miR-224 etc (Pineau P, et al. 2010).

Πίνακας 1

Παραδείγματα από ncRNAs που εκφράζονται παρεκκλινόμενα στο ΗΚΚ.

Table 1		
Examples of non-coding RNAs that are aberrantly expressed in HCC.		
	UP Regulated	DOWN Regulated
microRNAs		
	miR-221/222	miR-199a
	miR-21	miR-26
	miR-106	miR-29
	miR-181	miR-122
	miR-18	Let7
	miR-182	miR-101
	miR-224	miR-148
	miR-34a	miR-125
	miR-20	miR-214

Non-Coding RNAs as therapeutic targets in hepatocellular cancer. Chiara Braconi and Tushar Patel (2012).

Η μείωση κάποιων miRNA έχει επίσης αναφερθεί στον ΗΚΚ. Απώλεια του miR-26 έχει ως αποτέλεσμα κυτταρικές πολλαπλές επιδράσεις (Ji J, et al. 2009) (Kota J, et al. 2009). Η υπερέκφραση κάποιων miRNAs σε συνδυασμό με την απώλεια κάποιων άλλων miRNAs έχει ως αποτέλεσμα την προαγωγή του ΗΚΚ. Η μείωση του miR-199a-3p στον ΗΚΚ έχει ως αποτέλεσμα την υπερενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού MET και της κινάσης εξωκυτταρικής σηματοδότησης (Fornari F, et al. 2010) (Henry JC, et al. 2010) (Kim S, et al. 2008). Το miR-122 συνήθως χάνεται στους ΗΚΚ και προάγει την ηπατοκαρκινογένεση μέσω του παρεκκρινόμενου πολλαπλασιασμού (Bai S, et al. 2009) (Coulouarn C, et al. 2009) (Gramantieri L, et al. 2007).

Η έλλειψη του miR-29 προάγει την απόπτωση μέσω μιτοχονδριακών μηχανισμών εμπλέκοντας το Bcl-2 και το Mcl-1 (Xiong Y, et al. 2010), αλλά μπορεί να έχει και πιο γενικές επιδράσεις με το να δρα στο μηχανισμό μεθυλίωσης και να καταστέλλει ογκοκατασταλτικά γονίδια (Fabbri M, et al. 2007).

Πρόσφατα στοιχεία υποστηρίζουν την ανάμειξη των miRNAs στα πρώτα στάδια της ηπατοκαρκινογένεσης. Το προφίλ της έκφρασης των miRNAs σε συκώτια χωρίς όγκο ήταν διαφορετικό από αυτό σε αρχικούς ΗΚΚ αν και δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ ενός αρχικού ΗΚΚ και ενός με φλεβικές μεταστάσεις (Wong CM, et al. 2011). Παρεκκρινόμενη έκφραση των miRNAs είχε επιβεβαιωθεί από άλλες μελέτες οι οποίες αποκάλυπτan την παρέκκλιση επιλεγμένων miRNAs όπως το miR-216a και το miR-100 σε προνεοπλαστικές κακώσεις (Chen PJ, et al. 2012) (Petrelli A, et al. 2012). Αν και η συμμετοχή των μακρών ncRNAs (μέγεθος μεγαλύτερο από 200 νουκλεοτίδια) είναι περιορισμένη, έχειδειχθεί ότι εμφανίζεται παρεκκλιμένη έκφραση σε επιλεγμένα μακρά ncRNA σε ανθρώπινους ΗΚΚ. Η βιβλιογραφία όσον αφορά τον λειτουργικό ρόλο των μακρών ncRNA είναι περιορισμένη και ο μηχανισμός που δρουν ακόμα δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητός. Έχει θεωρηθεί ότι δρουν ενισχυτικά στη μεταγραφή των πρωτεϊνών και στη έκφραση των κωδικών γονιδίων (Chiara Braconi and Tushar Patel. 2012).

Άλλοι μηχανισμοί με τους οποίους θεωρείται ότι τα μακρά ncRNA ασκούν επίδραση στην έκφραση των γονιδίων είναι μέσω της ρύθμισης της

μεταγραφής, της ρύθμισης της δυναμικής του mRNA σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, ή της μεσολάβησης σε επιγενετικές αλλαγές (Orom UA, et al. 2010). Υπάρχουν κάποια μακρά ncRNA τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί ότι εκφράζονται σε αφθονία σε ΗΚΚ κυτταρικές σειρές και ιστούς (Braconi C, et al. 2011) (Calin GA, et al. 2007) (Panzitt K, et al. 2007) , όπως το HULC και το TUC338. Η εμπλοκή αυτών των δύο σε ΗΚΚ έχει υποτεθεί από έρευνες ότι πετυχαίνουν μείωση της κυτταρικής ανάπτυξης μέσω της καταστολής της έκφρασης των ncRNA (Chiara Braconi and Tushar Patel. 2012).

Πιθανοί ncRNA θεραπευτικοί στόχοι στον ΗΚΚ

Υπάρχουν αρκετά ncRNA τα οποία μπορούν να θεωρηθούν πιθανοί στόχοι σε μία θεραπευτική παρέμβαση.

miR-26

Το miR-26 είναι ένα miRNA, το οποίο έχει δειχθεί ότι ασκεί ένα πλήθος επιδράσεων στο ήπαρ όπως ρύθμιση της ηπατοκυτταρικής ανάπτυξης και της φλεγμονικής ανταπόκρισης που εμπλέκεται σε πολλούς ρυθμιστές-κλειδιά της καρκινογένεσης όπως η ιντερλευκίνη-6 (Ji J, et al. 2009) (Kota J, et al. 2009). Το miR-26 ρυθμίζει την ανάπτυξη του ΗΚΚ με το να πυροδοτεί το cyclin-dependent cell arrest στη φάση στασιμότητας του κυτταρικού κύκλου, και επίσης μειώνει την ανάπτυξη του όγκου του ήπατος σε ζωικά μοντέλα (Kota J, et al. 2009). Το miR-26 βρέθηκε να είναι μειωμένο στον ανθρώπινο ΗΚΚ εν συγκρίσει με το παρακείμενο υγιές ήπαρ (Ji J, et al. 2009). Για αυτό η επανεισαγωγή του miR-26 μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική στρατηγική στην εξουδετέρωση της ανάπτυξης και εξέλιξης του ΗΚΚ (Chiara Braconi and Tushar Patel. 2012).

miR-221/222

Το miR-221 και το miR-222 ανήκουν σε μία συστάδα στο χρωμόσωμα X και έχουν ενοχοποιηθεί για πολλές κακοήθειες πέραν του ΗΚΚ. Στον ΗΚΚ το miR-221 και το miR-222 βρέθηκαν υπερεκφρασμένα συγκρινόμενα με παρακείμενους υγιείς ιστούς και η έκφρασή τους είναι υψηλή σε φτωχά διαφοροποιημένους ΗΚΚ (Pineau P, et al. 2010).

Υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί μέσω των οποίων τα miR-221/222 μπορούν να προάγουν την ηπατοκυτταρική ανάπτυξη, όπως διαμόρφωση του κυτταρικού κύκλου και του πολλαπλασιασμού μέσω της επίδρασής τους σε μοριακούς ρυθμιστές-κλειδιά όπως ο p27Kip1 και ο αναστολέας εξαρτώμενη από κυκλίνες κινάση (Cdk) 1C p57 (CDKN1C/p57) (Visone R, et al. 2007). Την ίδια στιγμή τα miR221/222 μπορούν να αναστείλουν την απόπτωση με το να ρυθμίζουν την έκφραση του προαποπτωτικού παράγοντα bmf (Gramantieri L, et al. 2009). Τα miR-221/222 μπορούν επίσης να ελέγχουν να μονοπάτια Akt-mTOR που σχετίζονται με την επιβίωση και ως εκ τούτου επιδρούν τονοτικά στην κυτταρική επιβίωση και στην διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων (Garofalo M, et al. 2009) (Wong QW, et al. 2010). Λαμβάνοντας όλα αυτά τα in vitro δεδομένα, ανθρώπινοι ΗΚΚ με αυξημένη έκφραση των miR-221/222 έχουν συσχετιστεί με χειρότερα αποτελέσματα (Fornari F, et al. 2010) (Gramantieri L, et al. 2009) (Li J, et al. 2011). Παρόλο που τα αποτελέσματα downstream του miR-221 έχουν διευκρινιστεί, οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την αυξημένη έκφραση των miR-221/222 δεν είναι ξεκάθαροι. Πρόσφατα στοιχεία υποδεικνύουν ότι τα miR-221/222 προάγονται από το MET μέσω μιας πρωτεΐνης-ενεργοποιητή AP-1, αλλά χρειάζεται να γίνουν επιπλέον έρευνες πάνω σε αυτό (Garofalo M, et al. 2009).

TUC338

Το TUC338 είναι ένα μακρύ ncRNA που περιέχει μια αλληλουχία, η οποία έχει διατηρηθεί σε πολλά είδη. Το TUC338 είναι αυξημένο στο ΗΚΚ εν συγκρίσει με τα μη κακοήγη ηπατοκύτταρα (Braconi C, et al. 2011). Επιπλέον η έκφραση του αυξάνεται προοδευτικά αναλόγως της κατάστασης του ήπατος, από το υγιές ήπαρ, σε αυτό που πάσχει από κίρρωση, σε προνεοπλασματικό στάδιο και τέλος σε ΗΚΚ. Για αυτό τα επίπεδα έκφρασης του TUC338 έχουν συσχετιστεί με το στάδιο εξέλιξης της ασθένειας και διαφαίνεται η πιθανότητα να εμπλέκεται επίσης στον κακοήγη μετασχηματισμό. Φάνηκε από έρευνες ότι το TUC338 ενισχύει τόσο την εξαρτημένη όσο και την ανεξάρτητη ανάπτυξη των κυττάρων του ΗΚΚ. Αυτές οι επιδράσεις πραγματοποιούνται μέσω των πρωτεϊνών που ευθύνονται για τον έλεγχο των φάσεων G1/S του κυτταρικού κύκλου μέσω της αναστολής του

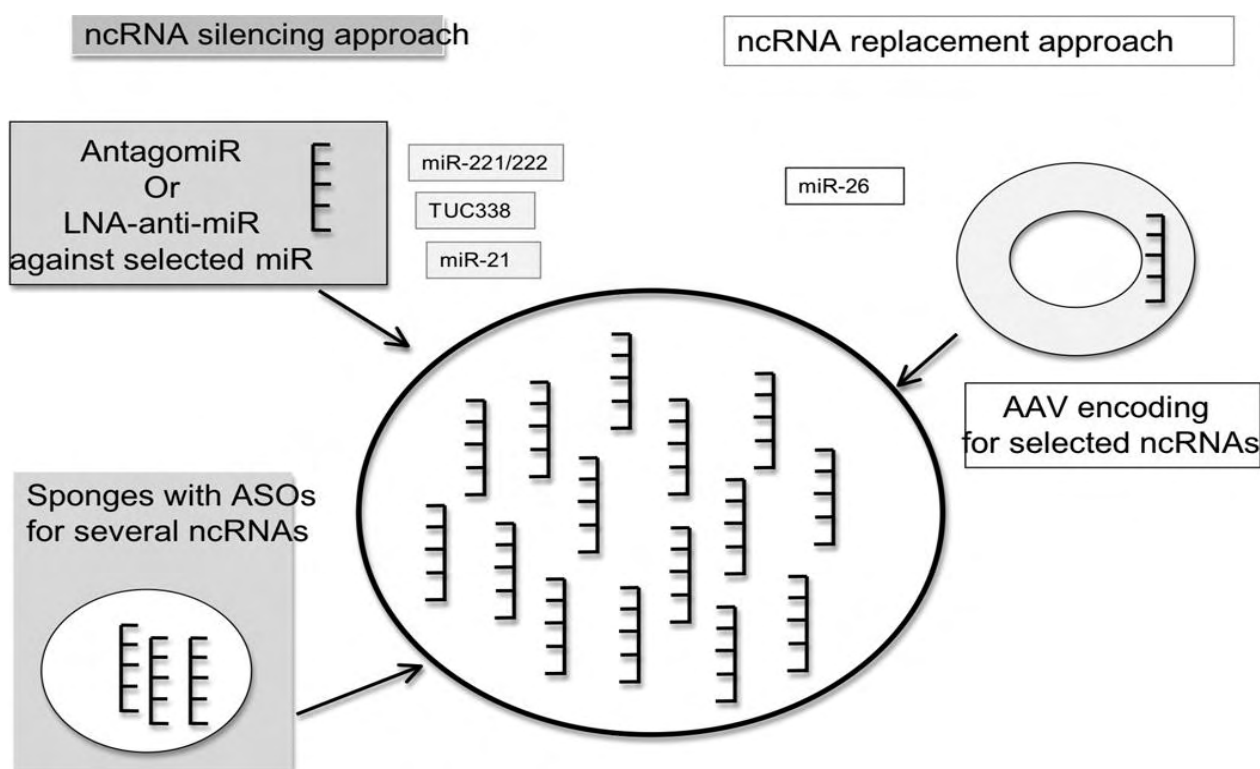
p16INK4a και την ενεργοποίηση της κυκλίνης D1 (CDK) (Chiara Braconi and Tushar Patel. 2012).

Διάφορες προσεγγίσεις στόχευσης της έκφρασης των miRNA

Για τα ncRNA όπως τα miRNAs των οποίων η έκφραση απορυθμίζεται σε καρκίνους και σχετίζεται με την εξέλιξη της ασθένειας, γίνονται προσπάθειες για στοχευμένη θεραπεία. Όσον αφορά τα καθοριστικά miRNA των οποίων η έκφραση μειώνεται σε ΗΚΚ γίνονται προσπάθειες αποκατάστασης αυτών μέσω των θεραπειών αντικατάστασης των miR όπου αποτελούνται από ώριμα λειτουργικά miRNA ή μιμητές των miRNA (Esquela-Kerscher A, et al. 2008). Όσον αφορά τα miRNA τα οποία υπερεκφράζονται στους ΗΚΚ, οι έρευνες εστιάζονται στην αποσιώπησή τους μέσω της επίδρασης με αντίσταιχα antago-miRs (Chiara Braconi and Tushar Patel. 2012).

Εικόνα 12

Θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν τα non coding RNA



Non-Coding RNAs as therapeutic targets in hepatocellular cancer. Chiara Braconi and Tushar Patel (2012).

Τα Antisense ολιγονουκλεοτίδια (ASO) είναι ένα μικρό μόριο DNA με μικρό αριθμό νουκλεοτιδίων, το οποίο συμπληρώνει ένα στόχο DNA με τους κανόνες συμπληρωματικότητας των βάσεων. Παρόλο που έχουν ανακαλυφθεί εδώ και 30 χρόνια (Stephenson ML and Zamecnik PC. 1978), η μόνη θεραπεία ASO που έχει εγκριθεί από την αμερικανική εταιρεία τροφίμων και φαρμάκων είναι το fomivirsen sodium, που στοχεύει το mRNA του κυτταρομεγαλοϊού. Ο μεγάλος περιορισμός των ASO είναι το πώς θα φτάσει το φάρμακο μέχρι τον στόχο και η αστάθεια του. Τα ASOs έχουν επίσης αναπτυχθεί για να στοχεύουν τα miRNAs. Οι Krutzfeldt et al. (Krutzfeldt J, et al. 2005) σχεδίασαν χημικώς τροποποιημένα μονόκλωνα RNA συζευγμένα χοληστερόλης συμπληρωματικά του miRNAs, που λέγονται antagomirs.

Η ενδοφλέβια αγωγή με antagomiR - 122 σε ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα μια αξιοσημείωτη μείωση των ενδογενών επιπέδων του miR-122 προάγοντας την μείωση ενός συγκεκριμένου miRNA. Τα επίπεδα του miR-122 ήταν μη ανιχνεύσιμα για 23 ημέρες μετά την ένεση. Συνακόλουθα μείωση των γονιδίων στόχων που αυξάνουν την έκφραση του miR-122 τα οποία εμπλέκονται στο μεταβολισμό της χοληστερόλης, είχε συνοδευτεί από μείωση επιπέδων χοληστερόλης στο πλάσμα για 2 εβδομάδες. Πειράματα με άλλα miRNAs, τα οποία εκφράζονται σε αρκετούς ιστούς εκτός από το συκώτι (όπως ο miR-16) έδειξαν ότι τα antagomiRs (μικρά rnas τα οποία κάνουν αποσιώπηση τα RNA) μπορούν να επιτύχουν ευρεία κατανομή και είναι ανεκτά χωρίς παρενέργειες στα ποντίκια (Chiara Braconi and Tushar Patel. 2012).

Τα antagomiR ολιγονουκλεοτίδια έχουν επίσης αποδειχτεί αποτελεσματικά στην στόχευση των μεταστατικών ηπατοκυτταρικών όγκων (Huynh C, et al. 2011). Πρόσφατες κλινικές δοκιμές σε ΗΚΚ για ASO θεραπείες περιλαμβάνουν antisense προσεγγίσεις για να στοχεύσουν το στόχο XIAP mRNA, αλλά κανένα antagomiR δεν κατάφερε να φτάσει στις κλινικές δοκιμές (πίνακας 2). Ωστόσο υπάρχουν πολλά υποσχόμενα προκλινικά δεδομένα που έχουν αναφερθεί. Επιπλέον έχει αναφερθεί μια μείωση 80-90% του miR-221 στο ήπαρ ενός ποντικίου με ΗΚΚ, του οποίου του είχαν χορηγήσει αγωγή με antagomiR σημασμένο με χοληστερόλη (cholesterol-tagged anti-miR-221). Η ανάπτυξη του όγκου είχε σταθεροποιηθεί και είχαν ανασταλεί κάποιοι

παράγοντες που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Chiara Braconi and Tushar Patel. 2012).

Locked Nuclei Acid-antimiR (LNA-antimiR)

Για να αυξηθεί η σταθερότητα και ειδικότητα των antisense miRNAs, έχουν συνθεθεί τροποποιημένα LNA ολιγονουκλεοτίδια (Elmen J, et al. 2008). Οι LNA-antimiRs έδειξαν βελτιωμένη ικανότητα αναστολής in vitro εν συγκρίσει με τα ASO. Σε ποντίκια ενδοπεριτονιακή ένεση του LNA-antimiR-122 βρέθηκε ότι είναι πιο αποτελεσματικό στο να ανταγωνιστεί το miR-122 εν συγκρίσει με τους antagomirs. Έρευνες με το LNA-antimiR έγιναν επίσης στην Αφρική σε πράσινες μαιμούδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μειώθηκε η χοληστερόλη στο πλάσμα για 7 εβδομάδες, μειώθηκε η έκφραση του miR-122 και η συσσώρευση του LNA-antimiR στο συκώτι. Δεν αναφέρθηκε καμία παρενέργεια στα πρωτεύοντα με την μόνη εξαίρεση μιας παροδικής αλλαγής της κρεατινίνης φωσφοκινάσης, αμινοτρανσφεράσες και bilirubin σε εκείνα τα ζώα που υπέστησαν βιοψία στο συκώτι (Elmen J, et al. 2008). Το miR-122 μπορεί να προσδεθεί με το γένωμα του HCV και να δράσει ως συμπαράγοντας στην συσσώρευση του ιικού RNA στις ηπατικές σειρές (Jangra RK, et al. 2010). Το LNA-antimiR-122 έχει αξιολογηθεί σε χρόνια μολυσμένους HCV χιμπατζήδες ως μια νέα anti-HCV θεραπεία (Lanford RE, et al. 2010). Αγωγή των 5 mg/kg του SPC3649 είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του RNA του HCV στον ορό μετά από 3 εβδομάδες θεραπείας. Συνακόλουθα τα επίπεδα του miR-122 στο συκώτι είχαν μειωθεί αξιοθαύμαστα σε 8 εβδομάδες μετά την τελευταία δόση. Η αντοχή του ιού στην θεραπεία δεν συνέβη, δεν παρατηρήθηκε αναδραστική αντίδραση κατά την ιαιμία (κυκλοφορία των ιών στο αίμα) κατά την διάρκεια της θεραπείας ή κάποια μετάλλαξη στην περιοχή του miR-122. Σημειώθηκε επίσης ιστολογική βελτίωση επιπλέον της παρατεινόμενης καταστολής της (κυκλοφορίας των ιών στο αίμα) ή τα επίπεδα ανεκτικότητας ήταν ασφαλή και καμία ανωμαλία του συκωτιού δεν παρατηρήθηκε. Έχοντας έως βάση αυτά τα αποτελέσματα διεξήχθησαν δοκιμές φάσεις I σε υγιείς εθελοντές για να περιγραφεί το επίπεδο ασφαλείας του SPC3649 και επέρχονται δοκιμές φάσεις II σε

ασθενείς με ηπατίτιδα C (πίνακας 2). (Chiara Braconi and Tushar Patel. 2012).

Άλλες στρατηγικές για στόχευση των miRNA.

Τα παράσιτα των miRNA είναι μεταγραφείς που εκφράζονται από ισχυρούς εκκινητές και μπορούν να δράσουν ως ανταγωνιστές αναστολείς. Περιέχουν περιοχές δέσμευσης για τα miRNA. Περιέχουν περιοχές δέσμευσης για μια οικογένεια miRNA ή για συνδυασμό των miRNA. Όταν οι ξενιστές που κωδικοποιούν αυτά τα παράσιτα τα οποία παροδικά μεταφέρονται μέσα στις κυτταρικές καλλιέργειες, τα παράσιτα καταστέλλουν τους miRNA στόχους παρόμοια με αυτή των ASO. Η χρήση των ιικών ξενιστών επέτρεψε την συνεχή αναστολή του miRNA για μεγάλη διάρκεια (Ebert MS, et al 2007). Μένει να καθοριστεί η δράση των παρασίτων και in vivo. Η χρήση μικρών φουρκετών RNA είναι μια ακόμα στρατηγική. Αυτή η κοντή φουρκέτα RNA περιέχει μια σφιχτή φουρκετοειδή σειρά που μπορεί να αποσιωπήσει μια σειρά γονιδίων, μέσω της παρέμβασης RNA. Το shRNA χρησιμοποιεί έναν ξενιστή με υποκινητή U6 για να εξασφαλίσει συνεχή έκφραση όταν εισαχθεί σε ένα κύτταρο. Αυτός ο ξενιστής συνήθως περνάει στα θυγατρικά κύτταρα επιτρέποντας στο αποσιωπημένο γονίδιο να κληρονομηθεί (Chiara Braconi and Tushar Patel. 2012).

Αποτελεσματικές θεραπείες που παραδίδουν τα NCRNA κατευθείαν στο σукώτι.

Οι γονιδιακές θεραπείες με ξενιστές βασίζονται στη χορήγηση του miRNA ή κάποιου μιμητή miRNA μέσω κάποιου AVV(Adeno-associated Virus). Ο Kota et al πρότειναν ένα AVV-based miRNA με το οποίο το miR-26a χορηγείται μέσα στο ήπαρ του ποντικίου με HKK για να αντικαταστήσει αυτό το miRNA, το οποίο συνήθως είναι μειωμένο σε HKK (Kota J, et al. 2009). Μία ένεση με scAAV8.miR-26a, είχε ως αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα έκφρασης του miR-26a στο ήπαρ μετά από 3 εβδομάδες, χωρίς κανένα σημάδι τοξικότητας ή διαμόρφωσης κάποιων άλλων miRNA μονοπατιών. Επιπλέον το scAAV8.miR-26a προστάτεψε τα ποντίκια από το να αναπτύξουν όγκο του ήπατος μέσω της μείωσης της ικανότητας του πολλαπλασιασμού και της προαγωγής του μηχανισμού της απόπτωσης. Το πλεονέκτημα αυτής της

τεχνικής είναι ότι τα miRNAs τα οποία χορηγούνται μέσω ιικών ξενιστών μεταγράφονται συνεχώς και επιτρέπουν να παραμείνουν μεγάλα επίπεδα έκφρασης στους ιστούς-στόχους.

Ωστόσο υπάρχουν και κάποια προβλήματα στην τεχνική. Η παρουσία αντιγόνου από κάποια κύτταρα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) έχουν ως αποτέλεσμα να προάγουν ανοσολογικές απαντήσεις του οργανισμού (Chiara Braconi and Tushar Patel. 2012).

Μη ιικές μέθοδοι

Λιποσωμικά προϊόντα ή νανοσωματίδια , αξιολογούνται σε αντι-ncRNA θεραπείες. Μία προσέγγιση περιλαμβάνει τη χρήση σταθερών λιπιδικών νουκλειικών οχημάτων (διπλοστοιβάδα λιπιδίων που μέσα κουβαλάει siRNA). Μόρια τα οποία συσσωματώνονται με πολυμερικούς προσδέτες (Heyes J, et al. 2005). Η παράδοση των siRNAs από αυτό το σύστημα στο ήπαρ πρωτεύοντων ζώων είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη αποτελεσματικότητα και μειωμένη τοξικότητα. (Ebert MS, et al. 2007). Μία άλλη προσέγγιση έχει να κάνει με τη χρήση προσδέτη όπως η N-acetylgalactosamine, galactose, απολιπο πρωτεΐνη ή alpha-tocopherol, οι οποίοι δένονται στην επιφάνεια των κυττάρων υποδοχέων που εκφράζονται στα ηπατοκύτταρα και για αυτό το λόγο μπορούν να στοχεύσουν συγκεκριμένους στόχους στο ήπαρ (Rozema DB, et al. 2007) (Akinc A, et al. 2008).

Συμπεράσματα

Όλο και περισσότερες έρευνες εστιάζουν στη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που λαμβάνουν μέρος στην καρκινογένεση. Ωστόσο υπάρχει ακόμα μεγάλο ανεξερεύνητο πεδίο που πρέπει να ερευνηθεί καθώς οι μηχανισμοί παθογένειας του ΗΚΚ δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Χρειάζεται να διεξαχθούν περισσότερες και λεπτομερέστερες έρευνες ώστε να μπορέσουμε να έχουμε πλήρη κατανόηση όλων των παραγόντων που οδηγούν σε ΗΚΚ.

Όσον αφορά τις θεραπευτικές προσεγγίσεις, γίνονται διάφορες έρευνες σε φάρμακα που στοχεύουν κρίσιμους μοριακούς στόχους που συμβάλουν στην καρκινογένεση, κάποιες από αυτές περνάνε και σε κλινικές δοκιμές πετυχαίνοντας θετικά αποτελέσματα.

Μέχρι τώρα η πιο σίγουρη και αξιόπιστη λύση είναι η χειρουργική εκτομή ή η μεταμόσχευση ήπατος όπου ο ασθενής σε αυτή τη περίπτωση πετυχαίνει πλήρη ίαση από την νόσο. Ωστόσο μικρό ποσοστό τελικά καταφέρνει να την πραγματοποιήσει εξαιτίας της δυσκολίας του ΗΚΚ να διαγνωστεί σε πρώιμο στάδιο.

Με βάση τα πιο πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα και τις τελευταίες επιστημονικές μελέτες, οι πιο υποσχόμενες φαρμακευτικές θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του ΗΚΚ, μπορεί να πει κανείς ότι είναι οι ακόλουθες.....

α) η **σοραφενίβη**, η οποία είναι ένας διαθέσιμος αναστολέας multi κινασών που σχεδιάστηκε για να στοχεύσει τα VEGFR-1, -2,-3, PDGFR και c-Kit. Η σοραφενίβη, σε διάφορες κλινικές δοκιμές έδειξε θεαματικά αποτελέσματα και κατάφερε να αυξήσει το προσδόκιμο ζωής σε αρκετούς ασθενείς τόσο σε πρώιμο στάδιο ΗΚΚ όσο και σε προχωρημένο. Έρευνες εστιάζουν στο συνδυασμό της σοραφενίβης με άλλα φάρμακα για να πετύχουν ακόμα καλύτερα αποτελέσματα.

β) οι **στατίνες**, οι οποίες αναστέλλουν προϊόντα του μεβαλονικού μονοπατιού, αποτρέποντας την μεταμεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών του Ras/Rho. Επίσης χρησιμοποιούνται για την απενεργοποίηση του ογκογονιδίου Myc, όπου η χρήση τους έδειξε ότι μειώνει τον υποτροπιασμό του ΗΚΚ.

γ) η **σαφραμισίνη**, αποδείχθηκε ότι έχει αντι-πολλαπλασιαστική δράση και μετριάξει τη δράση της GAPDH.

δ) η **φλαβόνη**, η οποία αποκαθιστά την έκφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου DLC1, παρατείνοντας την ζωή των πρωτεϊνών και μιμούμενη τη λειτουργία του, θεωρήθηκε αποτελεσματική για την αντιμετώπιση του ΗΚΚ.

ε) οι αναστολείς του mTOR **everolimus** (RAD001), **sirolimus** (Rapamune) και **temsirolimus** (CC-779) έχουν μελετηθεί και για την επάρκεια και για την ασφάλεια χρήσης τους σε ασθενείς με ΗΚΚ.

ζ) Το **Erlotinib** είναι ένας αναστολέας της τυροσίνης κινάσης του EGFR. Σε μελέτες in vitro κατέστειλε την αύξηση EGFR έκφρασης στις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Έχει δειχθεί ότι καταστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι RAF/MEK/ERK και μπλοκάρει τον σηματοδοτικό μεταγωγέα και ενεργοποιητή του μεσολαβητικού σήματος της μεταγραφής.

Παρ όλα αυτά, αν και εντυπωσιακά, θα λέγαμε ότι υπάρχει αρκετός δρόμος ακόμα μέχρι να καταφέρουμε να φτάσουμε σε ένα επίπεδο επιτυχίας ώστε να μπορέσουμε να αυξήσουμε το προσδόκιμο ζωής των ασθενών σε ένα ικανοποιητικό βαθμό. Υπάρχουν αρκετά προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν όπως η πολυπλοκότητα της νόσου η ανθεκτικότητα, καθώς επίσης και η προσαρμοστικότητα που εμφανίζει μετά από κάποια αρχικώς επιτυχούς αγωγής.

Έχοντας ως δεδομένα όλα τα παραπάνω και λαμβάνοντας υπόψη ότι ο ΗΚΚ είναι ένας από τους πιο θανατηφόρους καρκίνους σε όλο τον κόσμο μπορεί κανείς να συνειδητοποιήσει την ανάγκη για περαιτέρω έρευνες πάνω στο πεδίο αυτό, ώστε να μπορέσουμε κάποια στιγμή στο μέλλον να αυξήσουμε το προσδόκιμο ζωής των ασθενών σε επίπεδα που να τους επιτρέπουν να ζήσουν αρκετά χρόνια και, γιατί όχι, να θεραπεύονται πλήρως.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abou-Alfa GK, Gansukh B, Chou JF, Shia J, Capanu M, Kalin M, Chen HX, Zojwalla NJ, Katz S, Reidy DL, et al. Phase II Study of Cixutumumab (IMC-A12, NSC742460; C) in Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Oncol.* 2011;29:Abstract 4043.

Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figer A, De Greve J, Douillard JY, Lathia C, Schwartz B, et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006;24:4293–4300.

Abrams TJ, Lee LB, Murray LJ, Pryer NK, Cherrington JM. SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther.* 2003;2:471–478.

Adams, L. A. & Angulo, P. Recent concepts in nonalcoholic fatty liver disease. *Diabet. Med.* **22**,1129–1133 (2005).

Akinc A, Zumbuehl A, Goldberg M, Leshchiner ES, Busini V, Hossain N, Bacallado SA, Nguyen DN, Fuller J, Alvarez R, Borodovsky A, Borland T, Constien R, de Fougerolles A, Dorkin JR, Narayanannair Jayaprakash K, Jayaraman M, John M, Koteliensky V, Manoharan M, Nechev L, Qin J, Racie T, Raitcheva D, Rajeev KG, Sah DW, Soutschek J, Toudjarska I, Vornlocher HP, Zimmermann TS, Langer R, Anderson DG. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat. Biotechnol.* 2008;26(5):561–569.

Alberts SR, Fitch TR, Kim GP, Morlan BW, Dakhil SR, Gross HM, Nair S. Cediranib (AZD2171) in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a phase II North Central Cancer Treatment Group Clinical Trial. *Am J Clin Oncol.* 2012;35:329–333.

Alexia C, Fallot G, Lasfer M, Schweizer-Groyer G, Groyer A. An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2004;68:1003–1015.

Alitalo KM, Schwab M. Oncogene amplification in tumor cells. *Adv Cancer Res.* 1986;47:235–281.

Ambreen Ayub, Usman Ali Ashfaq,* and Asma Haque . HBV Induced HCC: Major Risk Factors from Genetic to Molecular Level. (2013).

Ariumi Y., Kuroki M., Dansako H., Abe K., Ikeda M., Wakita T., Kato N. The DNA damage sensors ataxia-telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 2008;82:9639–9646.

Ashkenazi A, Herbst R. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonist. *J Clin Invest* 2008;118:1979-1990.

Asselah T., Bieche I., Mansouri A., Laurendeau I., Cazals-Hatem D., Feldmann G., Bedossa P., Paradis V., Martinot-Peignoux M., Lebrech D., Guichard C., Ogier-Denis E., Vidaud M., Tellier Z., Soumelis V., Marcellin P., Moreau R. In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C. *J. Pathol.* 2010;221:264–274.

Avila MA, Berasain C, Sangro B, Prieto J. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2006;25:3866–3884.

Axe E.L., Walker S.A., Manifava M., Chandra P., Roderick H.L., Habermann A., Griffiths G., Ktistakis N.T. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 2008;182:685–701. doi: 10.1083/jcb.200803137.

Badvie, S. Hepatocellular carcinoma. *Postgrad. Med.J.* **76**, 4–11 (2000).

Bai S, Nasser MW, Wang B, Hsu SH, Datta J, Kutay H, Yadav A, Nuovo G, Kumar P, Ghoshal K. MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J. Biol. Chem.* 2009;284(46):32015–32027.

Bala S, Marcos M, Kodys K, et al. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor (TNF α)

production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(2):1436–1444.

Bardag-Gorce F, French BA, Joyce M, et al. Histone acetyltransferase p300 modulates gene expression in an epigenetic manner at high blood alcohol levels. *Experimental and Molecular Pathology*. 2007;82(2):197–202.

Benjamin L. Shneider; Sherman, Philip M. (2008). *Pediatric Gastrointestinal Disease*. Connecticut: PMPH-USA. σελ. 751. ISBN 1-55009-364-9.

Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:592–603.

Block, T. M., Mehta, A. S., Fimmel, C. J. & Jordan, R. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **22**, 5093–5107 (2003).

Boix L, Rosa JL, Ventura F, Castells A, Bruix J, Rodés J, Bartrons R. c-met mRNA overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1994;19:88–91.

Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *HEPATOLOGY* 2007;45:42-52.

Braconi C, Valeri N, Kogure T, Gasparini P, Huang N, Nuovo GJ, Terracciano L, Croce CM, Patel T. Expression and functional role of a transcribed noncoding RNA with an ultraconserved element in hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011;108(2):786–791.

Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006;25:3787- 3800.

Breuhahn K, Vreden S, Haddad R, Beckebaum S, Stippel D, Flemming P, et al. Molecular profiling of human hepatocellular carcinoma defines mutually exclusive interferon regulation and insulin-like growth factor II overexpression. *Cancer Res* 2004;64:6058-6064.

Bromberg JF. Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays*. 2001;23:161–169.

Brooks TA, Hurley LH. Targeting MYC expression through G-quadruplexes. *Genes Cancer*. 2010;1:641–649.

Budhu A, Forgues M, Ye QH, Jia HL, He P, Zanetti KA, et al. Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell* 2006;10:99-111.

Burris HA, Hurwitz HI, Dees EC, Dowlati A, Blackwell KL, O'Neil B, Marcom PK, Ellis MJ, Overmoyer B, Jones SF, et al. Phase I safety, pharmacokinetics, and clinical activity study of lapatinib (GW572016), a reversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, in heavily pretreated patients with metastatic carcinomas. *J Clin Oncol*. 2005;23:5305–5313.

Calfon M., Zeng H., Urano F., Till J.H., Hubbard S.R., Harding H.P., Clark S.G., Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. 2002;415:92–96. doi: 10.1038/415092a.

Calin GA, Liu CG, Ferracin M, Hyslop T, Spizzo R, Sevignani C, Fabbri M, Cimmino A, Lee EJ, Wojcik SE, Shimizu M, Tili E, Rossi S, Taccioli C, Pichiorri F, Liu X, Zupo S, Herlea V, Gramantieri L, Lanza G, Alder H, Rassenti L, Volinia S, Schmittgen TD, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer Cell*. 2007;12(3):215–229.

Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Conner EA, Lee JS, Factor VM, Thorgeirsson SS. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology*. 2006;130:1117–1128.

Cao Z, Fan-Minogue H, Bellovin DI, Yevtodiyenko A, Arzeno J, Yang Q, Gambhir SS, Felsher DW. MYC phosphorylation, activation, and tumorigenic potential in hepatocellular carcinoma are regulated by HMG-CoA reductase. *Cancer Res*. 2011;71:2286–2297.

Cao Z, Fan-Minogue H, Bellovin DI, Yevtodiyenko A, Arzeno J, Yang Q, et al. MYC phosphorylation, activation, and tumorigenic potential in hepatocellular

carcinoma are regulated by HMG-CoA reductase. *Cancer Res* 2011;71:2286-2297.

Cariani E, Lasserre C, Seurin D, Hamelin B, Kemeny F, Franco D, Czech MP, Ullrich A, Brechot C. Differential expression of insulin-like growth factor II mRNA in human primary liver cancers, benign liver tumors, and liver cirrhosis. *Cancer Res.* 1988;48:6844–6849.

Chan S.W., Egan P.A. Hepatitis C virus envelope proteins regulate CHOP via induction of the unfolded protein response. *FASEB J.* 2005;19:1510–1512.

Chen PJ, Yeh SH, Liu WH, Lin CC, Huang HC, Chen CL, Chen DS, Chen PJ. The androgen pathway stimulates microRNA-216a transcription to suppress the TSLC1 tumor suppressor gene in early hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 2012 [Epub ahead of print].

Chen X., Shen J., Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J. Biol. Chem.* 2002;277:13045–13052. doi: 10.1074/jbc.M110636200.

Chen YW, Boyartchuk V, Lewis BC. Differential roles of insulin-like growth factor receptor- and insulin receptor-mediated signaling in the phenotypes of hepatocellular carcinoma cells. *Neoplasia.* 2009;11:835–845.

Chiang D, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, et al. Focal gains of VEGFA and molecular classification of HCC. *Cancer Res* 2008;68:6779-6788.

Chiang D, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, et al. Focal gains of VEGFA and molecular classification of HCC. *Cancer Res* 2008;68:6779-6788.

Chiara Braconi and Tushar Patel. Non-Coding RNAs as therapeutic targets in hepatocellular cancer. (2012).

Ching YP, Wong CM, Chan SF, Leung TH, Ng DC, Jin DY, Ng IO. Deleted in liver cancer (DLC) 2 encodes a RhoGAP protein with growth suppressor function and is underexpressed in hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem.* 2003;278:10824–10830.

Choo S, Ng Q, Chen W, Tham C, Yong W, Wang L, Koh T, Goh B, Thng C, Huynh H, et al. A phase I/II study of AZD6244 in combination with sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. 2012;30:A4100.

Choudhury M, Pandey RS, Clemens DL, et al. Knock down of GCN5 histone acetyltransferase by siRNA decreases ethanol-induced histone acetylation and affects differential expression of genes in human hepatoma cells. *Alcohol*. 2011;45(4):311–324.

Chung GE, Yoon JH, Lee JH, Kim HY, Myung SJ, Yu SJ, Lee SH, Lee SM, Kim YJ, Lee HS. Ursodeoxycholic acid-induced inhibition of DLC1 protein degradation leads to suppression of hepatocellular carcinoma cell growth. *Oncol Rep*. 2011;25:1739–1746.

Chung TW, Lee YC, Kim CH. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB J*. 2004;18:1123–1125.

Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*. 2008;358:1160–1174.

Comoglio P, Giordano S, Trusolino L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addition and expedience. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:504-516.

Comporti, M. *et al*. F(2)-isoprostanes stimulate collagen synthesis in activated hepatic stellate cells: a link with liver fibrosis? *Lab. Invest.* **85**, 1381–1391 (2005).

Cotran, Ramzi S.; Kumar, Vinay; Fausto, Nelson; Nelso Fausto; Robbins, Stanley L.; Abbas, Abul K. (2005). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease* (7th έκδοση). St. Louis, MO: Elsevier Saunders. σελ. 878. ISBN 0-7216-0187-1.

Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic

phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene*. 2009;28(40):3526–3536.

Cox J.S., Shamu C.E., Walter P. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*. 1993;73:1197–1206. doi: 10.1016/0092-8674(93)90648-A.

Credle J.J., Finer-Moore J.S., Papa F.R., Stroud R.M., Walter P. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005;102:18773–18784.

Croce CM, Nowell PC. Molecular basis of human B cell neoplasia. *Blood*. 1985;65:1–7.

Croce MC. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Rev Genet*. 2009;10:704–714.

De BP, Gupta S, Zhao H, Drazba JA, Banerjee AK. Specific interaction in vitro and in vivo of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and LA protein with cis-acting RNAs of human parainfluenza virus type 3. *J Biol Chem*. 1996;271:24728–24735.

De Souza AT, Hankins GR, Washington MK, Fine RL, Orton TC, Jirtle RL. Frequent loss of heterozygosity on 6q at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor locus in human hepatocellular tumors. *Oncogene*. 1995;10:1725–1729.

Delang L, Paeshuyse J, Vliegen I, Leyssen P, Obeid S, Durantel D, et al. Statins potentiate the in vitro anti-hepatitis C virus activity of selective hepatitis C virus inhibitors and delay or prevent resistance development. *HEPATOLOGY* 2009;50:6-16.

Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM. Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 2005;5:930-942.

Deretic V., Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell. Host Microbe*. 2009;5:527–549. doi: 10.1016/j.chom.2009.05.016.

Desbois-Mouthon C, Cadoret A, Blivet-Van Eggelpoël MJ, Bertrand F, Cherqui G, Perret C, Capeau J. Insulin and IGF-1 stimulate the beta-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3 β inhibition and Ras activation. *Oncogene*. 2001;20:252–259.

Dhillon A.S., Hagan S., Rath O., Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007;26:3279–3290. doi: 10.1038/sj.onc.1210421.

Dieter Häussinger, επιμ. (2011). *Liver Regeneration*. Berlin: De Gruyter. σελ. 1. ISBN 9783110250794.

Dong X, Zhou G, Zhai Y, Zhang H, Yang H, Zhi L, Zhang X, Chu J, He F. Association of DLC1 gene polymorphism with susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese hepatitis B virus carriers. *Cancer Epidemiol*. 2009;33:265–270.

Drazen B. Zimonjic and Popescu. Role of DLC-1 AND MYC oncogene. (2012).

Du X, Qian X, Papageorge A, Vass WC, Braverman R, Lowy DR. Complex formation between DLC START domain and Cav1 contributes to the tumor suppressor function of DLC1. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 2011;52:523.

Dufour JF, Johnson F. Liver cancer: from molecular pathogenesis to new therapies. Summary of the EASL single topic conference. *J Hepatology* 2009, in press.

Durkin EM, Ullmannova V, Guan M, Popescu NC. Deleted in liver cancer 3(DLC-3), a novel RhoGTPase-activating protein, is downregulated in cancer and inhibits tumor cell growth. *Oncogene*. 2007;26:4580–4589.

Durkin ME, Avner MR, Huh CG, Yuan BZ, Thorgeirsson SS, Popescu NC. DLC-1, a Rho GTPase-activating protein with tumor suppressor function, is essential for embryonic development. *FEBS Lett*. 2005;579:1191–1196.

Durkin ME, Yuan BZ, Zhou X, Zimonjic DB, Lowy DR, Thorgeirsson SS, Popescu NC. DLC-1: a Rho GTPase-activating protein and tumor suppressor. *J Cell Mol Med*. 2007;11:1185–1207.

Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat. Methods*. 2007;4(9):721–726.

Eferl R, Ricci R, Kenner L, Zenz R, David JP, Rath M, Wagner EF. Liver tumor development. c-jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell*. 2003;112:181–192.

Egger D., Wolk B., Gosert R., Bianchi L., Blum H.E., Moradpour D., Bienz K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol*. 2002;76:5974–5984. doi:

El-Assal ON, Yamanoi A, Ono T, Kohno H, Nagasue N. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2001;7:1299–1305.

El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi M, Igarashi M, Yamamoto A, Nabika T, Nagasue N. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology*. 1998;27:1554–1562.

Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC, Weinberg RA. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev*. 2001;15:50–65.

Elmen J, Lindow M, Schutz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjarn M, Hansen HF, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup EM, Kauppinen S. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*. 2008;452(7189):896–899.

Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol*. 2007;35:495–516. doi: 10.1080/01926230701320337.

El-Serag HB, Johnson ML, Hachem C, Morgana RO. Statins are associated with a reduced risk of hepatocellular carcinoma in a large cohort of patients with diabetes. *Gastroenterology* 2009;136:1601-1608.

El-Serag, H. B., Tran, T. & Everhart, J. E. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **126**, 460–468 (2004).

Endo A, Hasumi K, Sakai K, Kanbe T. Specific inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by koningic acid (heptelidic acid) *J Antibiot (Tokyo)* 1985;38:920–925.

Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Häussinger D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology*. 2002;292:272–284.

Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins JF, Patrawala L, Cheng A, Ford L, Weidhaas JB, Brown D, Bader AG, Slack FJ. The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle*. 2008;7(6):759–764.

Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, Croce CM. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007;104(40):15805–15810.

Factor VM, et al. Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2007;67:9844-9851.

Faivre S, Fartoux L, Bouattour M, Bumsel F, Dreyer C, Raymond E, Rosmorduc O. A phase I study of AVE1642, a human monoclonal antibody-blocking insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R), given as a single agent and in combination with sorafenib as first-line therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) *J Clin Oncol*. 2011;29:Abstract 270.

Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006;6:674-687.

Farazi PA, Glickman J, Jiang S, Yu A, Rudolph KL, DePinho RA. Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:5021-5027.

Farrell, G. C. & Larter, C. Z. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* **43**, S99–S112 (2006).

Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *HEPATOLOGY* 2006; 43(2 Suppl 1):S45-S53. Takami T, Kaposi-Novak P, Uchida K, Gomez-Quiroz LE, Conner EA,

Finn RS, Kang YK, Mulcahy M, Polite BN, Lim HY, Walters I, Baudalet C, Manekas D, Park JW. Phase II, open-label study of brivanib as second-line therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18:2090–2098.

Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, Calin GA, Grazi GL, Giovannini C, Croce CM, Bolondi L, Negrini M. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2008;27(43):5651–5661.

Fornari F, Milazzo M, Chieco P, Negrini M, Calin GA, Grazi GL, Pollutri D, Croce CM, Bolondi L, Gramantieri L. MiR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res.* 2010;70(12):5184–5193.

Foy, E. *et al.* Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 2986–2991 (2005).

Fujita N., Itoh T., Omori H., Fukuda M., Noda T., Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol. Biol. Cell.* 2008;19:2092–2100.

Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind JF, Kunjithapatham R, Buijs M, Vossen JA, Tchernyshyov I, Cole RN, Syed LH, Rao PP, Ota S, Vali M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is pyruvylated during 3-bromopyruvate mediated cancer cell death. *Anticancer Res.* 2009;29:4909–4918.

Gao B., Hong F., Radaeva S. Host factors and failure of interferon-alpha treatment in hepatitis C virus. *Hepatology.* 2004;39:880–890. doi: 10.1002/hep.20139.

Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Ngankea A, Taccioli C, Pichiorri F, Alder H, Secchiero P, Gasparini P, Gonelli A, Costinean S, Acunzo M, Condorelli G, Croce CM. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell.* 2009;16(6):498–509.

Geschwind JF, Ko YH, Torbenson MS, Magee C, Pedersen PL. Novel therapy for liver cancer: Direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production. *Cancer Res.* 2002;62:3909–3913.

Golan T, Javle M. Targeting the insulin growth factor pathway in gastrointestinal cancers. *Oncology (Williston Park)* 2011;25:518–526, 529.

Gómez del Pulgar T, Benitah SA, Valerón PF, Espina C, Lacal JC. Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *Bioessays.* 2005;27:602–613.

Gosert R., Egger D., Lohmann V., Bartenschlager R., Blum H.E., Bienz K., Moradpour D. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J. Virol.* 2003;77:5487–5492. doi: 10.1128/JVI.77.9.5487-5492.2003.

Gosert R., Kanjanahaluethai A., Egger D., Bienz K., Baker S.C. RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J Virol.* 2002;76:3697–3708.

Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu CG, Calin GA, Giovannini C, Ferrazzi E, Grazi GL, Croce CM, Bolondi L, Negrini M.

Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2007;67(13):6092–6099.

Gramantieri L, Fornari F, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, Calin GA, Grazi GL, Croce CM, Bolondi L, Negrini M. MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality. *Clin. Cancer Res.* 2009;15(16):5073–5081.

Guan M, Tripathi V, Zhou X, Popescu NC. Adenovirus-mediated restoration of the expression of the tumor suppressor gene DLC1 inhibits the proliferation and tumorigenicity of aggressive, androgen-independent human prostate cancer cell lines: Prospects for gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 2008;15:371–381.

Halder J, Ray M, Ray S. Inhibition of glycolysis and mitochondrial respiration of ehrlich ascites carcinoma cells by methylglyoxal. *Int J Cancer.* 1993;54:443–449.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.

Harden TK, Sondek J. Regulation of phospholipase C isozymes by ras superfamily GTPases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2006;46:355–379.

Harding H.P., Zhang Y., Zeng H., Novoa I., Lu P.D., Calfon M., Sadri N., Yun C., Popko B., Paules R., Stojdl D.F., Bell J.C., Hettmann T., Leiden J.M., Ron D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell.* 2003;11:619–633. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00105-9.

Healy KD, Hodgson L, Kim TY, Shutes AT, Maddileti S, Juliano RL, Hahn KM, Harden TK, Bang YJ, Der CJ. DLC1 suppresses non-small lung cancer growth and invasion by RhoGAP-dependent and independent mechanisms. *Mol Carcinog.* 2008;47:326–337.

Henry JC, Park JK, Jiang J, Kim JH, Nagorney DM, Roberts LR, Banerjee S, Schmittgen TD. miR-199a-3p targets CD44 and reduces proliferation of CD44 positive hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;403(1):120–125.

Hepatitis C Virus and Cellular Stress Response: Implications to Molecular Pathogenesis of Liver Diseases
Po-Yuan Ke and Steve S.-L. Chen

Herencia C, Martínez-Moreno JM, Herrera C, Corrales F, Santiago-Mora R, Espejo I, Barco M, Almadén Y, de la Mata M, Rodríguez-Ariza A, et al. Nuclear translocation of β -catenin during mesenchymal stem cells differentiation into hepatocytes is associated with a tumoral phenotype. *PLoS One*. 2012;7:e34656.

Hers I, Wherlock M, Homma Y, Yagisawa H, Tavaré JM. Identification of p122RhoGAP (deleted in liver cancer-1) Serine 322 as a substrate for protein kinase B and ribosomal S6 kinase in insulin-stimulated cells. *J Biol Chem*. 2006;281:4762–4770.

Heyes J, Palmer L, Bremner K, MacLachlan I. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *J. Control Release*. 2005;107(2):276–287.

Hino, O., Kajino, K., Umeda, T. & Arakawa, Y. Understanding the hypercarcinogenic state in chronic hepatitis: a clue to the prevention of human hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol*. **37**, 883–887 (2002).

Hisai H, Kato J, Kobune M, Murakami T, Miyanishi K, Takahashi M, Yoshizaki N, Takimoto R, Terui T, Niitsu Y. Increased expression of angiogenin in hepatocellular carcinoma in correlation with tumor vascularity. *Clin Cancer Res*. 2003;9:4852–4859.

Ho C, Wang C, Mattu S, Destefanis G, Ladu S, Delogu S, Armbruster J, Fan L, Lee SA, Jiang L, Dombrowski F, Evert M, Chen X, Calvisi DF. AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) and N-ras (neuroblastoma ras viral oncogene homolog) coactivation in the mouse liver promotes rapid carcinogenesis by way of mTOR (mammalian target of rapamycin complex 1), FOXM1 (forkhead box M1)/SKP2, and c-myc pathways. *Hepatology*. 2012;55:833–845.

Hoek, J. B. & Pastorino, J. G. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* **27**, 63–68 (2002).

Homma Y, Emori Y. A dual functional signal mediator showing RhoGAP and phospholipase C-delta stimulating activities. *EMBO J.* 1995;14:286–291.

Hong K, Georgiades CS, Geschwind JF. Technology insight: Image-guided therapies for hepatocellular carcinoma--intra-arterial and ablative techniques. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006;3:315–324.

Hsu CH, Yang TS, Hsu C, Toh HC, Epstein RJ, Hsiao LT, Chen PJ, Lin ZZ, Chao TY, Cheng AL. Efficacy and tolerability of bevacizumab plus capecitabine as first-line therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2010;102:981–986.

Hu TH, Huang CC, Lin PR, Chang HW, Ger LP, Lin YW, Changchien CS, Lee CM, Tai MH. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2003;97:1929–1940.

Huang Q, Lan F, Zheng Z, Xie F, Han J, Dong L, Xie Y, Zheng F. Akt2 kinase suppresses glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)-mediated apoptosis in ovarian cancer cells via phosphorylating GAPDH at threonine 237 and decreasing its nuclear translocation. *J Biol Chem.* 2011;286:42211–42220.

Huarte M, Rinn JL. Large non-coding RNAs: missing links in cancer? *Hum. Mol. Genet.* 2010;19(R2):R152–R161.

Huether A, Hopfner M, Sutter AP, Baradari V, Schuppan D, Scherubl H. Signaling pathways involved in the inhibition of epidermal growth factor receptor by erlotinib in hepatocellular cancer. *World J Gastroenterol.* 2006;12:5160–5167.

Huynh C, Segura MF, Gaziel-Sovran A, Menendez S, Darvishian F, Chiriboga L, Levin B, Meruelo D, Osman I, Zavadil J, Marcusson EG, Hernando E. Efficient *in vivo* microRNA targeting of liver metastasis. *Oncogene.* 2011;30(12):1481–1488.

Huynh H. AZD6244 (ARRY-142886) enhances the antitumor activity of rapamycin in mouse models of human hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2010;116:1315–1325.

Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, Wada S, Tanaka Y, Kasahara A, Ueki T, Hirano T, Yamamoto H, Fujimoto J, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1998;27:951–958.

Izumi T., Io K., Matsui M., Shirakawa K., Shinohara M., Nagai Y., Kawahara M., Kobayashi M., Kondoh H., Misawa N., Koyanagi Y., Uchiyama T., Takaori-Kondo A. HIV-1 viral infectivity factor interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107:20798–20803.

Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res*. 2002;84:57–80.

Jangra RK, Yi M, Lemon SM. Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J. Virol*. 2010;84(13):6615–6625.

Ji J, Shi J, Budhu A, Yu Z, Forgues M, Roessler S, Ambros S, Chen Y, Meltzer PS, Croce CM, Qin LX, Man K, Lo CM, Lee J, Ng IO, Fan J, Tang ZY, Sun HC, Wang XW. MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *N. Engl. J. Med*. 2009;361(15):1437–1447.

Jones D.M., McLauchlan J. Hepatitis C virus: assembly and release of virus particles. *J. Biol. Chem*. 2010;285:22733–22739. doi: 10.1074/jbc.R110.133017.

Josep M. Llovet^{1,2} and Jordi Bruix². Molecular Targeted Therapies in Hepatocellular Carcinoma (2008).

Joyce M.A., Walters K.A., Lamb S.E., Yeh M.M., Zhu L.F., Kneteman N., Doyle J.S., Katze M.G., Tyrrell D.L. HCV induces oxidative and ER stress, and sensitizes infected cells to apoptosis in SCID/Alb-uPA mice. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000291.

Jung Woo Shin and Young-Hwa Chung. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: Current and future. (2013).

Kanai F, Yoshida H, Tateishi R, Sato S, Kawabe T, Obi S, Kondo Y, Taniguchi M, Tagawa K, Ikeda M, et al. A phase I/II trial of the oral antiangiogenic agent TSU-68 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;67:315–324.

Kato M, Sakai K, Endo A. Koningic acid (heptelidic acid) inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from various sources. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1120:113–116.

Kawata S, Yamasaki E, Nagase T, Inui Y, Ito N, Matsuda Y, Inada M, Tamura S, Noda S, Imai Y, Matsuzawa Y. Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. *Br J Cancer*. 2001;84:886–891.

Ke P.Y., Chen S.S. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J. Clin. Invest*. 2011;121:37–56. doi: 10.1172/JCI41474.

Ke P.Y., Chen S.S. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J. Clin. Invest*. 2011;121:37–56. doi: 10.1172/JCI41474.

Kelly TJ, Lerin C, Haas W, et al. GCN5-mediated transcriptional control of the metabolic coactivator PGC-1 β through lysine acetylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(30):19945–19952.

Kew MC. Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma. (2013).

Kew, M. C. Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Liver Int*. **23**, 405–409 (2003).

Kim S, Lee UJ, Kim MN, Lee EJ, Kim JY, Lee MY, Choung S, Kim YJ, Choi YC. MicroRNA miR-199a* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) *J. Biol. Chem*. 2008;283(26):18158–18166.

Kim TY, Lee JW, Kim HP, Jong HS, Kim TY, Jung M, Bang YJ. DLC-1, a GTPase-activating protein for Rho, is associated with cell proliferation, morphology and migration in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;355:72–77.

Kirpich I, Ghare S, Zhang J, et al. Binge alcohol-induced microvesicular liver steatosis and injury are associated with down-regulation of hepatic Hdac 1, 7, 9, 10, 11 and up-regulation of Hdac 3. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 2012;36(9):1578–1586.

Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene.* 2002;285:1–24.

Ko YH, Pedersen PL, Geschwind JF. Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: Characterization and targeting hexokinase. *Cancer Lett.* 2001;173:83–91.

Ko YH, Smith BL, Wang Y, Pomper MG, Rini DA, Torbenson MS, Hullihen J, Pedersen PL. Advanced cancers: Eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324:269–275.

Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 2000;351 Pt 2:289–305.

Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell.* 2009;137(6):1005–1017.

Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell.* 2009;137(6):1005–1017.

Kroemer G., Marino G., Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell.* 2010;40:280–293. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.023.

Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature*. 2005;438(7068):685–689.

Kumagai S, Narasaki R, Hasumi K. Glucose-dependent active ATP depletion by koniginic acid kills high-glycolytic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;365:362–368.

Kutay H, Klepper C, Wang B, et al. Reduced susceptibility of DNA methyltransferase 1 hypomorphic (Dnmt1(N/+)) mice to hepatic steatosis upon feeding liquid alcohol diet. *PLoS One*. 2012;7(8):e41949.

Lahoz A, Hall A. DLC1: a significant GAP in the cancer genome. *Genes Dev*. 2008;22:1724–1730.

Lai C.K., Jeng K.S., Machida K., Cheng Y.S., Lai M.M. Hepatitis C virus NS3/4A protein interacts with ATM, impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. *Virology*. 2008;370:295–309.

Lambert MP, Paliwal A, Vaissiere T, et al. Aberrant DNA methylation distinguishes hepatocellular carcinoma associated with HBV and HCV infection and alcohol intake. *Journal of Hepatology*. 2011;54(4):705–715.

Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S, Orum H. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*. 2010;327(5962):198–201.

Lee HC, Tian B, Sedivy JM, Wands JR, Kim M. Loss of Raf kinase inhibitor protein promotes cell proliferation and migration of human hepatoma cells. *Gastroenterology*. 2006;131:1208–1217.

Lee HJ, Howell SK, Sanford RJ, Beisswenger PJ. Methylglyoxal can modify GAPDH activity and structure. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:135–145.

Lee JH, Chung YH, Kim JA, Shim JH, Lee D, Lee HC, Shin ES, Yoon JH, Kim BI, Bae SH, et al. Genetic predisposition of hand-foot skin reaction after sorafenib therapy in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2013;119:136–142.

Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med* 2006;12:410-416.

Lee MN, Ha SH, Kim J, Koh A, Lee CS, Kim JH, Jeon H, Kim DH, Suh PG, Ryu SH. Glycolytic flux signals to mTOR through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-mediated regulation of rheb. *Mol Cell Biol*. 2009;29:3991–4001.

Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998;94:491–501. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81590-1.

Li Y, Huang T, Zhang X, Wan T, Hu J, Huang A, Tang H. Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase binding to hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in regulating expression of HBV surface antigen. *Arch Virol*. 2009;154:519–524.

Li, K. *et al.* Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 2992–2997 (2005).

Liao YC, Lo SH. Deleted in liver cancer-1 (DLC-1): a tumor suppressor not just for liver. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40:843–847.

Liao YC, Shih YP, Lo SH. Mutations in the focal adhesion targeting region of deleted in liver cancer-1 attenuate their expression and function. *Cancer Res*. 2008;68:7718–7722.

Liapi E, Geschwind JF. Transcatheter and ablative therapeutic approaches for solid malignancies. *J Clin Oncol*. 2007;25:978–986.

Limdi, J. K. & Crampton, J. R. Hereditary haemochromatosis. *Qjm* **97**, 315–324 (2004).

Lin CP, Liu CR, Lee CN, Chan TS, Liu HE. Targeting c-Myc as a novel approach for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2010;2:16–20.

Liu J, Kaur G, Zhawar VK, Zimonjic DB, Popescu NC, Kandpal R, Athwal RS. Role of SV40 integration site at chromosomal interval 1q21.1 in immortalized CRL2504 cells. *Cancer Res.* 2009;69:7819–7825.

Llovet JM, Decaens T, Raoul JL, Boucher E, Kudo M, Chang C, Kang YK, Assenat E, Lim HY, Boige V, et al. Brivanib in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma Who Were Intolerant to Sorafenib or for Whom Sorafenib Failed: Results From the Randomized Phase III BRISK-PS Study. *J Clin Oncol.* 2013;Aug 26; Epub ahead of print.

Low JS, Tao Q, Ng KM, Goh HK, Shu XS, Woo WL, Ambinder RF, Srivastava G, Shamay M, Chan AT, Popescu NC, Hsieh WS. A novel isoform of the 8p22 tumor suppressor gene DLC1 suppresses tumor growth and is frequently silenced in multiple common tumors. *Oncogene.* 2011;30:1923–1935.

Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998;94:481–490. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81589-5.

Macdonald, A. *et al.* The hepatitis C virus nonstructural NS5A protein inhibits activating protein-1 function by perturbing ras-ERK pathway signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 17775–17784 (2003).

Majumder, M., Ghosh, A. K., Steele, R., Ray, R. & Ray, R. B. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *J. Virol.* **75**, 1401–1407 (2001).

Marrogi, A. J. *et al.* Oxidative stress and p53 mutations in the carcinogenesis of iron overload-associated hepatocellular carcinoma. *J. Natl Cancer Inst.* **93**, 1652–1655 (2001).

Mas VR, Maluf DG, Archer KJ, Yanek KC, Fisher RA. Angiogenesis soluble factors as hepatocellular carcinoma noninvasive markers for monitoring hepatitis C virus cirrhotic patients awaiting liver transplantation. *Transplantation.* 2007;84:1262–1271.

Maton, Anthea; Jean Hopkins, Charles William McLaughlin, Susan Johnson, Maryanna Quon Warner, David LaHart, Jill D. Wright (1993). *Human Biology and Health*. Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall. ISBN 0-13-981176-1. OCLC 32308337.

Matsunaga K., Morita E., Saitoh T., Akira S., Ktistakis N.T., Izumi T., Noda T., Yoshimori T. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J. Cell. Biol.* 2010;190:511–521.

McClain, C. J., Hill, D. B., Song, Z., Deaciuc, I. & Barve, S. Monocyte activation in alcoholic liver disease. *Alcohol* **27**, 53–61 (2002).

McGivern D.R., Villanueva R.A., Chinnaswamy S., Kao C.C., Lemon S.M. Impaired replication of hepatitis C virus containing mutations in a conserved NS5B retinoblastoma protein-binding motif. *J. Virol.* 2009;83:7422–7433.

McHenry PR, Vargo-Gogola T. Pleiotropic functions of Rho GTPase signaling: a Trojan horse or Achilles' heel for breast cancer treatment? *Curr Drug Targets.* 2010;11:1043–1058.

Melen, K., Fagerlund, R., Nyqvist, M., Keskinen, P. & Julkunen, I. Expression of hepatitis C virus coreprotein inhibits interferon-induced nuclear import of STATs. *J. Med. Virol.* **73**, 536–547 (2004).

Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology.* 2007;133(2):647–658.

Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:976–990.

Mizushima N., Levine B., Cuervo A.M., Klionsky D.J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008;451:1069–1075.

Munakata T., Liang Y., Kim S., McGivern D.R., Huibregtse J., Nomoto A., Lemon S.M. Hepatitis C virus induces E6AP-dependent degradation of the retinoblastoma protein. *PLoS Pathog.* 2007;3:1335–1347.

Munakata T., Nakamura M., Liang Y., Li K., Lemon S.M. Down-regulation of the retinoblastoma tumor suppressor by the hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102:18159–18164.

Murphy DJ, Junttila MR, Pouyet L, Karnezis A, Shchors K, Bui DA, Brown-Swigart L, Johnson L, Evan GI. Distinct thresholds govern Myc's biological output in vivo. *Cancer Cell.* 2008;14:447–457.

Murray LJ, Abrams TJ, Long KR, Ngai TJ, Olson LM, Hong W, Keast PK, Brassard JA, O'Farrell AM, Cherrington JM, et al. SU11248 inhibits tumor growth and CSF-1R-dependent osteolysis in an experimental breast cancer bone metastasis model. *Clin Exp Metastasis.* 2003;20:757–766.

Nakajima M, Hayashi K, Egi Y, Katayama K, Amano Y, Uehata M, Ohtsuki M, Fujii A, Oshita K, Kataoka H, Chiba K, Goto N, Kondo T. Effect of Wf-536, a novel ROCK inhibitor, against metastasis of B16 melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003;52:319–324.

Ng IO, Liang ZD, Cao L, Lee TK. DLC1 is deleted in primary hepatocellular carcinoma and exerts inhibitory effects on the proliferation of hepatoma cell lines with deleted DLC1. *Cancer Res.* 2000;60:6581–6584.

Niwa M., Patil C.K., DeRisi J., Walter P. Genome-scale approaches for discovering novel nonconventional splicing substrates of the Ire1 nuclease. *Genome Biol.* 2005;6:R3.

Ogawa T, Tashiro H, Miyata Y, Ushitora Y, Fudaba Y, Kobayashi T, Arihiro K, Okajima M, Asahara T. Rho-associated kinase inhibitor reduces tumor recurrence after liver transplantation in a rat hepatoma model. *Am J Transplant.* 2007;7:347–355.

Oliva J, French BA, Li J, et al. Sirt1 is involved in energy metabolism: The role of chronic ethanol feeding and resveratrol. *Experimental and Molecular Pathology.* 2008;85(3):155–159.

Op De Beeck A., Cocquerel L., Dubuisson J. Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 2001;82:2589–2595.

Orom UA, Derrien T, Beringer M, Gumireddy K, Gardini A, Bussotti G, Lai F, Zytnicki M, Notredame C, Huang Q, Guigo R, Shiekhata R. Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell*. 2010;143(1):46–58.

Osipo C, Miele L. Hedgehog signaling in hepatocellular carcinoma: novel therapeutic strategy targeting hedgehog signaling in HCC. *Cancer Biol Ther* 2006;5:238-239.

Osna, N. A., Clemens, D. L. & Donohue, T. M., Jr. Ethanol metabolism alters interferon- γ signaling in recombinant HepG2 cells. *Hepatology* **42**, 1109–1117 (2005).

Pang X, Yi T, Yi Z, Cho S G, Qu W, Pinkaew D, Fujise K, Liu M. Morelloflavone, a biflavonoid, inhibits tumor angiogenesis by targeting rho GTPases and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Cancer Res*. 2009;69:518–525.

Panzitt K, Tschernatsch MM, Guelly C, Moustafa T, Stradner M, Strohmaier HM, Buck CR, Denk H, Schroeder R, Trauner M, Zatloukal K. Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA. *Gastroenterology*. 2007;132(1):330–342.

Paraskevi A. Farazi and Ronald A. DePinho Hepatocellular Carcinoma pathogenesis: from genes to environment (2006).

Parfrey, H., Mahadeva, R. & Lomas, D. A. $\alpha(1)$ antitrypsin deficiency, liver disease and emphysema. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 1009–1014 (2003).

Park J, Han D, Kim K, Kang Y, Kim Y. O-GlcNAcylation disrupts glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homo-tetramer formation and mediates its nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1794:254–262.

Park PH, Lim RW, Shukla SD. Involvement of histone acetyltransferase (HAT) in ethanol-induced acetylation of histone H3 in hepatocytes: Potential

mechanism for gene expression. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2005;289(6):G1124–G1136.

Park SW, Durkin ME, Thorgeirsson SS, Popescu NC. DNA variants of DLC-1, a candidate tumor suppressor gene in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 2003;23:133–137.

Park, K. J. *et al.* 1Hepatitis C virus NS5A protein modulates c-Jun N-terminal kinase through interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *J. Biol. Chem.* **278**, 30711–8 (2003).

Pavio N., Romano P.R., Graczyk T.M., Feinstone S.M., Taylor D.R. Protein synthesis and endoplasmic reticulum stress can be modulated by the hepatitis C virus envelope protein E2 through the eukaryotic initiation factor 2alpha kinase PERK. *J. Virol*. 2003;77:3578–3585.

Payne GS, Bishop JM, Varmus HE. Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. *Nature*. 1982;295:209–214.

Peters G. Oncogenes at viral integration sites. *Cell Growth Differ*. 1990;1:503–510.

Petrelli A, Perra A, Schernhuber K, Cargnelutti M, Salvi A, Migliore C, Ghiso E, Benetti A, Barlati S, Ledda-Columbano GM, Portolani N, De Petro G, Columbano A. Sequential analysis of multistage hepatocarcinogenesis reveals that miR-100 and PLK1 dysregulation is an early event maintained along tumor progression. *Oncogene*. 2012 J [Epub ahead of print]

Petrik J, Parker H, Alexander GJ. Human hepatic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase binds to the poly(U) tract of the 3' non-coding region of hepatitis C virus genomic RNA. *J Gen Virol*. 1999;80(Pt 12):3109–3113.

Piguet AC, Semela D, Keogh A, Wilkens L, Stroka D, Stoupis C, St-Pierre MV, Dufour JF. Inhibition of mTOR in combination with doxorubicin in an experimental model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2008;49:78–87.

Pihur V, Datta S, Datta S. Finding common genes in multiple cancer types through meta-analysis of microarray experiments: a rank aggregation approach. *Genomics*. 2008;92:400–403.

Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM, Dejean A. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107(1):264–269.

Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM, Dejean A. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107(1):264–269.

Pochareddy S, Edenberg HJ. Chronic alcohol exposure alters gene expression in HepG2 cells. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2012;36(6):1021–1033.

Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2004;4:505-518.

Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:505–518.

Ponting CP, Aravind L. START: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends Biochem Sci*. 1999;24:130–132.

Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu WC, Fan ST, Wong J. Correlation of serum basic fibroblast growth factor levels with clinicopathologic features and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma. *Am J Surg*. 2001;182:298–304.

Popescu NC, Zimonjic DB, DiPaolo JA. Viral integration, fragile sites and proto-oncogenes in human neoplasia. *Hum Genet*. 1990;84:383–386.

Popescu NC, Zimonjic DB. Chromosome-mediated alterations of the MYC gene in human cancer. *J Cell Mol Med*. 2002;6:151–159.

Popescu NC. Genetic alterations in cancer as a result of breakage at fragile sites. *Cancer Lett*. 2003;192:1–17.

Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 1997;57:4593–4599.

Qian X, Li G, Asmussen HK, Asnaghi L, Vass WC, Braverman R, Yamada KM, Popescu NC, Papageorge AG, Lowy DR. Oncogenic inhibition by a deleted in liver cancer gene requires cooperation between tensin binding and Rho-specific GTPase-activating protein activities. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:9012–9017.

Ramanathan RK, Belani CP, Singh DA, Tanaka M, Lenz HJ, Yen Y, Kindler HL, Iqbal S, Longmate J, Mack PC, et al. A phase II study of lapatinib in patients with advanced biliary tree and hepatocellular cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009;64:777–783.

Ray M, Basu N, Ray S. Inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of human malignant cells by methylglyoxal. *Mol Cell Biochem.* 1997;177:21–26.

Ray M, Basu N, Ray S. Inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of human malignant cells by methylglyoxal. *Mol Cell Biochem.* 1997;177:21–26.

Rehermann, B. & Nascimbeni, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Rev. Immunol.* **5**, 215–229 (2005).

Ridley AJ. Rho proteins and cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;84:13–19.

Riedl S.J., Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004;5:897–907. doi: 10.1038/nrm1496.

Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease (7th έκδοση). 1999. σελ. 101. ISBN 0-8089-2302-1.

Roberts LR, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Semin Liver Dis.* 2005;25:212–225.

Roessler S, Long EL, Budhu A, Chen Y, Zhao X, Ji J, Walker R, Jia HL, Ye QH, Qin LX, Tang ZY, He P, Hunter KW, Thorgeirsson SS, Meltzer PS, Wang XW. Integrative genomic identification of genes on 8p associated with hepatocellular carcinoma progression and patient survival. *Gastroenterology*. 2011 Dec 24; (Epub ahead of print)

Ron D., Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007;8:519–529. doi: 10.1038/nrm2199.

Roth JA, Grammer SF. Tumor suppressor gene therapy. In: El-Deiry WS, editor. *Tumor Suppressor Genes: Regulation, Function and Medicinal Applications*. Vol. 2. Humana Press; Totowa, NJ: 2003. pp. 577–597.

Rozema DB, Lewis DL, Wakefield DH, Wong SC, Klein JJ, Roesch PL, Bertin SL, Reppen TW, Chu Q, Blokhin AV, Hagstrom JE, Wolff JA. Dynamic PolyConjugates for targeted *in vivo* delivery of siRNA to hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007;104(32):12982–12987.

Saeed M., Suzuki R., Watanabe N., Masaki T., Tomonaga M., Muhammad A., Kato T., Matsuura Y., Watanabe H., Wakita T., Suzuki T. Role of the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J. Biol. Chem.* 2011;286:37264–37273.

Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:133–142.

Samadder NJ, Mukherjee B, Huang SC, Ahn J, Rennert HS, Greenson JK, et al. Risk of colorectal cancer in self-reported inflammatory bowel disease and modification of risk by statin and NSAID use. *Cancer* 2011;117:1640-1648.

Sanchez V., Spector D.H. Subversion of cell cycle regulatory pathways. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008;325:243–262.

Sanchez-Arago M, Cuezva JM. The bioenergetic signature of isogenic colon cancer cells predicts the cell death response to treatment with 3-bromopyruvate, iodoacetate or 5-fluorouracil. *J Transl Med.* 2011;9:19.

Santoro A, Rimassa L, Borbath I, Daniele B, Salvagni S, Van Laethem JL, Van Vlierberghe H, Trojan J, Kolligs FT, Weiss A, et al. Tivantinib for second-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2013;14:55–63.

Sarkany, R. P. The management of porphyria cutanea tarda. *Clin. Exp. Dermatol.* **26**, 225–232 (2001).

Scharf JG, Braulke T. The role of the IGF axis in hepatocarcinogenesis. *Horm Metab Res.* 2003;35:685–693.

Semela D, Dufour JF. Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2004;41:864–880.

Shanmugasundaram Ganapathy-Kanniappan,¹ Rani Kunjithapatham,¹ and Jean-Francois Geschwind¹ Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (2012).

Shen J., Chen X., Hendershot L., Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell.* 2002;3:99–111. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00203-4.

Shepard BD, Joseph RA, Kannarkat GT, et al. Alcohol-induced alterations in hepatic microtubule dynamics can be explained by impaired histone deacetylase 6 function. *Hepatology.* 2008;48(5):1671–1679.

Shivendra D. Shukla, Ph.D. and Robert W. Lim, Ph.D. Epigenetic Effects of Ethanol on the Liver and Gastrointestinal System. (2013)

Siegel AB, Cohen EI, Ocean A, Lehrer D, Goldenberg A, Knox JJ, Chen H, Clark-Garvey S, Weinberg A, Mandeli J, et al. Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2008;26:2992–2998.

Singh PP, Singh S. Statins are associated with reduced risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol* 2013;24:1721-1730.

Singh S, Singh AG, Singh PP, Murad MH, Iyer PG. Statins are associated with reduced risk of esophageal cancer, particularly in patients with Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013;11:620-629.

Sir D., Chen W.L., Choi J., Wakita T., Yen T.S., Ou J.H. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology*. 2008;48:1054–1061. doi: 10.1002/hep.22464.

Srisuttee R, Koh SS, Kim SJ, Malilas W, Boonying W, Cho IR, Jhun BH, Ito M, Horio Y, Seto E, et al. Hepatitis B virus X (HBX) protein upregulates β -catenin in a human hepatic cell line by sequestering SIRT1 deacetylase. *Oncol Rep*. 2012;28:276–282.

Stephenson ML, Zamecnik PC. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1978;75(1):285–288.

Sun W, Sohal D, Haller DG, Mykulowycz K, Rosen M, Soulen MC, Caparro M, Teitelbaum UR, Giantonio B, O'Dwyer PJ, et al. Phase 2 trial of bevacizumab, capecitabine, and oxaliplatin in treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2011;117:3187–3192.

Sun Z, Feng D, Everett LJ, et al. Circadian epigenomic remodeling and hepatic lipogenesis: Lessons from HDAC3. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2011;76:49–55.

Suzuki K, Tanaka M, Watanabe N, Saito S, Nonaka H, Miyajima A (July 2008). "p75 Neurotrophin receptor is a marker for precursors of stellate cells and portal fibroblasts in mouse fetal liver". *Gastroenterology* 135 (1): 270–281.e3. doi:10.1053/j.gastro.2008.03.075. PMID 18515089.

Tait S.W., Green D.R. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2010;11:621–632. doi: 10.1038/nrm2952.

Takamura M, Sakamoto M, Genda T, Ichida T, Asakura H, Hirohashi S. Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by

Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Hepatology*. 2001;33:577–581.

Tam KH, FAU - Yang ZF, Yang ZF, FAU - Lau CK, Lau CK, FAU - Lam CT, Lam CT, FAU - Pang RWC, Pang RW, FAU - Poon RTP, Poon RT. Inhibition of mTOR enhances chemosensitivity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2009 Jan 18;273(2):201–9. Epub 2008 Sep 27.

Tang Y, Banan A, Forsyth CB, et al. Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2008;32(2):355–364.

Tanguay, R. M., Jorquera, R., Poudrier, J. & St-Louis, M. Tyrosine and its catabolites: from disease to cancer. *Acta Biochim. Pol.* **43**, 209–216 (1996).

Tavian D, De Petro G, Benetti A, Portolani N, Giulini SM, Barlati S. u-PA and c-MET mRNA expression is co-ordinately enhanced while hepatocyte growth factor mRNA is down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2000;87:644–649.

Teodoridis JM, Hardie C, Brown R. CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: causes and implications. *Cancer Lett*. 2008;268:177–186.

Thomas MB, Morris JS, Chadha R, Iwasaki M, Kaur H, Lin E, Kaseb A, Glover K, Davila M, Abbruzzese J. Phase II trial of the combination of bevacizumab and erlotinib in patients who have advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. 2009;27:843–850.

Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002;31:339-346.

Thorgeirsson, S. S. & Grisham, J. W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature Genet.* **31**, 339–346 (2002).

Tille JC, Wood J, Mandriota SJ, Schnell C, Ferrari S, Mestan J, Zhu Z, Witte L, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 antagonists inhibit VEGF- and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;299:1073–1085.

To MD, Perez-Losada J, Mao JH, Balmain A. Crosstalk between Pten and Ras signaling pathways in tumor development. *Cell Cycle*. 2005;4:1185–1188.

Toh HC, Chen PJ, Carr BI, Knox JJ, Gill S, Ansell P, McKeegan EM, Dowell B, Pedersen M, Qin Q, et al. Phase 2 trial of linifanib (ABT-869) in patients with unresectable or metastatic hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2013;119:380–387.

Tovar V, Alsinet C, Sole M, Cabellos L, La'zaro A, Villanueva A, et al. Role of insulin-like growth factor signaling pathway in hepatocellular carcinoma. Molecular targeted therapies blocking IGF pathway *in vitro* and *in vivo* [Abstract]. *J Hepatol*. In press.

Tsan YT, Lee CH, Wang JD, Chen PC. Statins and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus infection. *J Clin Oncol* 2012;30:623-630.

Ueki T, Fujimoto J, Suzuki T, Yamamoto H, Okamoto E. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met proto-oncogene, in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1997;25:619–623.

Uematsu S, Higashi T, Nouse K, Kariyama K, Nakamura S, Suzuki M, Nakatsukasa H, Kobayashi Y, Hanafusa T, Tsuji T, et al. Altered expression of vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor-2 and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005;20:583–588.

Ullmannova V, Popescu NC. Inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis, reactivation of DLC1, and modulation of other gene expression by dietary flavone in breast cancer cell lines. *Cancer Detect Prev*. 2007;31:110–118.

Varmus H. Retroviruses. *Science*. 1988;240:1427–1435.

Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, Tovar V, Roayaie S, Minguez B, Sole M, et al. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2008;135:1972–183, 1972-183.

Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, Tovar V, Roayaie S, Minguez B, Sole M, Battiston C, Van Laarhoven S, Fiel MI, Di Feo A, Hoshida Y, Yea S, Toffanin S, Ramos A, Martignetti JA, Mazzaferro V, Bruix J, Waxman S, Schwartz M, Meyerson M, Friedman SL, Llovet JM. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2008;1983;135:1972–83. e1-11.

Villanueva A, Newell P, Chiang D, Friedman S, Llovet JM. Genes and signaling pathways involved in the pathogenesis of HCC. *Semin Liver Dis* 2007;27:55-76.

Visone R, Russo L, Pallante P, De Martino I, Ferraro A, Leone V, Borbone E, Petrocca F, Alder H, Croce CM, Fusco A. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocr. Relat. Cancer*. 2007;14(3):791–798.

von dem Bussche A., Machida R., Li K., Loevinsohn G., Khander A., Wang J., Wakita T., Wands J.R., Li J. Hepatitis C virus NS2 protein triggers endoplasmic reticulum stress and suppresses its own viral replication. *J. Hepatol*. 2010;53:797–804. doi: 10.1016/j.jhep.2010.05.022.

Wakita T., Pietschmann T., Kato T., Date T., Miyamoto M., Zhao Z., Murthy K., Habermann A., Krausslich H.G., Mizokami M., Bartenschlager R., Liang T.J. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med*. 2005;11:791–796. doi: 10.1038/nm1268.

Wei Y, Ponzetto A, Tiollais P, Buendia MA. Multiple rearrangements and activated expression of c-myc induced by woodchuck hepatitis virus integration in a primary liver tumour. *Res Virol*. 1992;143:89–96.

Weiner, A. *et al.* Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 2755–2759 (1995).

Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes - the Achilles heel of cancer. *Science*. 2002;297:63–64.

Whittaker R, Loy PA, Sisman E, et al. Identification of microRNAs that control lipid droplet formation and growth in hepatocytes via high-content screening. *Journal of Biomolecular Screening*. 2010;15(7):798–805.

Wong CM, Lee JM, Ching YP, Jin DY, Ng IO. Genetic and epigenetic alterations of DLC-1 gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63:7646–7651.

Wong CM, Wong CC, Lee JM, Fan DN, Au SL, Ng IO. Sequential alterations of miRNA expression in hepatocellular carcinoma development and venous metastasis. *Hepatology*. 2011 [Epub ahead of print].

Wong CM, Yam JW, Ching YP, Yau TO, Leung TH, Jin DY, Ng IO. Rho GTPase-activating protein deleted in liver cancer suppresses cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2005;65:8861–8868.

Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PB, Wong N. MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. *Clin. Cancer Res*. 2010;16(3):867–875.

Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PB, Wong N. MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. *Clin. Cancer Res*. 2010;16(3):867–875.

Wood JM, Bold G, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Frei J, Hofmann F, Mestan J, Mett H, O'Reilly T, et al. PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res*. 2000;60:2178–2189.

Xiong Y, Fang JH, Yun JP, Yang J, Zhang Y, Jia WH, Zhuang SM. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2010;51(3):836–845.

Xu C, Lee SA, Chen X. RNA interference as therapeutics for hepatocellular carcinoma. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2011;6:106–115.

Xue W, Krasnitz A, Lucito R, Sordella R, Vanaelst L, Cordon-Cardo C, Singer S, Kuehnel F, Wigler M, Powers S, Zender L, Lowe SW. DLC1 is a chromosome 8p tumor suppressor whose loss promotes hepatocellular carcinoma. *Genes Dev.* 2008;22:1439–1444.

Yang SH, Liu ML, Tien CF, Chou SJ, Chang RY. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) interaction with 3' ends of japanese encephalitis virus RNA and colocalization with the viral NS5 protein. *J Biomed Sci.* 2009;16:40.

Yap TA, de Bono JS. Targeting the HGF/c-Met axis: state of play. *Mol Cancer Ther.* 2010;9:1077–1079.

Yau T, Chan P, Pang R, Ng K, Fan ST, Poon RT. Phase 1-2 trial of PTK787/ZK222584 combined with intravenous doxorubicin for treatment of patients with advanced hepatocellular carcinoma: implication for antiangiogenic approach to hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2010;116:5022–5029.

Ye J., Rawson R.B., Komuro R., Chen X., Dave U.P., Prywes R., Brown M.S., Goldstein J.L. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell.* 2000;6:1355–1364. doi: 10.1016/S1097-2765(00)00133-7.

Yin H, Hu M, Zhang R, et al. MicroRNA-217 promotes ethanol-induced fat accumulation in hepatocytes by down-regulating SIRT1. *Journal of Biological Chemistry.* 2012;287(13):9817–9826.

Yin X.M., Wang K., Gross A., Zhao Y., Zinkel S., Klocke B., Roth K.A., Korsmeyer S.J. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature.* 1999;400:886–891. doi: 10.1038/23730.

Yoshida H., Matsui T., Yamamoto A., Okada T., Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 2001;107:881–891. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00611-0.

Yoshida H., Oku M., Suzuki M., Mori K. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J. Cell. Biol.* 2006;172:565–575. doi: 10.1083/jcb.200508145.

Yoshizumi T, Ohta T, Ninomiya I, Terada I, Fushida S, Fujimura T, Nishimura G, Shimizu K, Yi S, Miwa K. Thiazolidinedione, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, inhibits growth and metastasis of HT-29 human colon cancer cells through differentiation-promoting effects. *Int J Oncol.* 2004;25:631–639.

Yoshizumi T, Ohta T, Ninomiya I, Terada I, Fushida S, Fujimura T, Nishimura G, Shimizu K, Yi S, Miwa K. Thiazolidinedione, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, inhibits growth and metastasis of HT-29 human colon cancer cells through differentiation-promoting effects. *Int J Oncol.* 2004;25:631–639.

You WK, McDonald DM. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB Rep.* 2008;41:833–839.

Yuan BZ, Jefferson AM, Millecchia L, Popescu NC, Reynolds SH. Morphological changes and nuclear translocation of DLC1 tumor suppressor protein precede apoptosis in human non-small cell lung carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 2007;313:3868–3880.

Yuan BZ, Miller MJ, Keck CL, Zimonjic DB, Thorgeirsson SS, Popescu NC. Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP. *Cancer Res.* 1998;58:2196–2199.

Zang WQ, Fieno AM, Grant RA, Yen TS. Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a cellular protein that binds to the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element. *Virology.* 1998;248:46–52.

Zhang K., Shen X., Wu J., Sakaki K., Saunders T., Rutkowski D.T., Back S.H., Kaufman R.J. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of

CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell*. 2006;124:587–599. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.040.

Zhang Y, Wei W, Cheng N, Wang K, Li B, Jiang X, Sun S. Hepatitis C virus-induced up-regulation of microRNA-155 promotes hepatocarcinogenesis by activating Wnt signaling. *Hepatology*. 2012;56:1631–1640.

Zhao P., Han T., Guo J.J., Zhu S.L., Wang J., Ao F., Jing M.Z., She Y.L., Wu Z.H., Ye L.B. HCV NS4B induces apoptosis through the mitochondrial death pathway. *Virus. Res.* 2012;169:1–7. doi: 10.1016/j.virusres.2012.04.006.

Zheng Y., Gao B., Ye L., Kong L., Jing W., Yang X., Wu Z. Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response. *J. Microbiol.* 2005;43:529–536.

Zhou J., Liu C.Y., Back S.H., Clark R.L., Peisach D., Xu Z., Kaufman R.J. The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103:14343–14348.

Zhou Q, Lui VW, Yeo W. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. *Future Oncol.* 2011;7:1149–1167.

Zhou X, Thorgeirsson SS, Popescu NC. Restoration of DLC-1 gene expression induces apoptosis and inhibits both cell growth and tumorigenicity in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene*. 2004;23:1308–1313.

Zhou Y, Yi X, Stoffer JB, Bonafe N, Gilmore-Hebert M, McAlpine J, Chambers SK. The multifunctional protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is both regulated and controls colony-stimulating factor-1 messenger RNA stability in ovarian cancer. *Mol Cancer Res*. 2008;6:1375–1384.

Zhu AX, Abrams TA, Miksad R, Blaszkowsky LS, Meyerhardt JA, Zheng H, Muzikansky A, Clark JW, Kwak EL, Schrag D, et al. Phase 1/2 study of everolimus in advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2011;117:5094–5102.

Zimonjic DB, Keck-Waggoner C, Popescu NC. Novel genomic imbalances and chromosome translocations involving c-myc gene in Burkitt's lymphoma. *Leukemia*. 2001;15:1582–1588.

Zoulim F., Chevallier M., Maynard M., Trepo C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Rev. Med. Virol.* 2003;13:57–68. doi: 10.1002/rmv.371.

