

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ
ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MCT4 ΣΤΟ ΣΤΡΩΜΑ ΠΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΕΙ ΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ
ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΩΝ ΗΠΑΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ

ΠΕΤΡΙΔΗΣ ΧΡΙΣΤΟΣ, MD, MSc

ΓΕΝΙΚΟΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2016

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. **Εμμανουήλ Πικουλής, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής, Α' Χειρουργική Κλινική, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών**
2. **Ευάγγελος Φελέκουρας, Καθηγητής Χειρουργικής, Α' Χειρουργική Κλινική, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών**
3. **Νικόλαος Καβαντζας, Αναπληρωτής Καθηγητής, Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών**

Επιβλέπων:

Εμμανουήλ Πικουλής, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής, Α' Χειρουργική Κλινική, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Χρίστος Α. Πετρίδης M.D, MSc

Χρίστος Πετρίδης M.D, MSc

Επίθετο: Πετρίδης
Όνομα: Χρίστος
Ηλικία: 33
Ημερ. Γεννήσεως: 01/03/1983
Εθνικότητα: Κυπριακή
Οικογενειακή κατάσταση: Παντρεμένος (μία κόρη)
Φύλο: Άντρας
Διεύθυνση: Λεωφόρος Ρικ 39, Διαμέρισμα 310, Αγλαντζιά, Λευκωσία, ΤΚ 2122
Τηλέφωνο: +357-99470918
E-Mail: petxristos@hotmail.com

1. Εργασιακή εμπειρία

1. Ιούλιος 2015- σήμερα

Θέση Εξειδικευμένου Εντατικολογίας στη ΜΕΘ του Γενικού Νοσοκομείου Λευκωσίας

2. Μάρτιος 2009-Μάρτιος 2015:

Ειδικευόμενος Γενικής Χειρουργικής στο Γενικό Νοσοκομείο Λευκωσίας. (Εισαγωγή μετά από γραπτές εξετάσεις του Υπουργείου Υγείας Κύπρου)

Διευθυντής: Δρ. Ανδρέου Χαράλαμπος

Η θέση περιλάμβανε γενικές εφημερείες σε κυκλική διάταξη κάθε 4 ημέρες, εξωτερικά ιατρεία γενικής χειρουργικής, κλινικής μαστού, μικρά χειρουργεία, χειρουργεία, τμήμα ενδοσκοπήσεων καθώς επίσης και εφημερείες στο θάλαμο γενικής χειρουργικής (62 κλίνες).

Κατά τη διάρκεια των έξι χρόνων επίσης ασκήθηκα για ένα εξάμηνο στο τμήμα Ουρολογίας και ένα εξάμηνο στο τμήμα ΩΡΛ του Γενικού Νοσοκομείου Λευκωσίας.

Απόκτηση τίτλου ειδικότητας τον Απρίλιο του 2015 μετά από γραπτές και προφορικές εξετάσεις στο Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αναγνώριση τίτλου ειδικότητας από το Υπουργείο Υγείας Κύπρου τον Ιούνιο του 2015

2. Ακαδημαϊκά Προσόντα

1. Σεπτέμβριος 2002 – Αυγούστος 2008: Πτυχίο Ιατρικής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Βαθμός Πτυχίου: Άριστα (8,8/10)

2. Οκτώμβριος 2010 – Ιούνιος 2013: Μεταπτυχιακός τίτλος (MSc) στη Διοίκηση Μονάδων Υγείας

Τμήμα Οικονομικών και Διοίκησης του Ανοικτού Πανεπιστημίου Κύπρου

Βαθμός 7,1/10, Λίαν Καλώς

3. Μάιος 2012 - σήμερα: Υποψήφιος Διδάκτορας Πανεπιστημίου Αθηνών

Τίτλος διδακτορικής διατριβής:

«Η μελέτη της προγνωστικής αξίας της πρωτεΐνης MCT4 στο στρώμα που περιβάλλει τα καρκινικά κύτταρα ορθοκολικού καρκίνου και ηπατικών μεταστάσεων»

Επιτροπή αξιολόγησης:

1. Εμμανουήλ Πικουλής, PhD, MD, Αν. Καθηγητής Χειρουργικής, Α' Χειρουργική Κλινική, Λαϊκό Νοσοκομείο, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
2. Ευάγγελος Φελέκουρας, PhD, MD, Καθηγητής Χειρουργικής, Α' Χειρουργική Κλινική, Λαϊκό Νοσοκομείο, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. Νικόλαος Καβαντζάς, PhD, MD, Καθηγητής Παθολογοανατομίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

3. Έρευνα

1. 2013: Ποιότητα ζωής των εφήβων ασθενών με ιδιοπαθή σκολίωση στη Κύπρο

Επιβλέπων:

Ανδρέας Παυλάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής στο τμήμα Διοίκησης Μονάδων Υγείας του
Ανοικτού Πανεπιστημίου Κύπρου

Email: pavlakis@ouc.ac.cy, Τηλέφωνο 99314033

(Η έρευνα έγινε υπό την έγκριση της Επιτροπής Βιοηθικής Κύπρου)

2. 2012 – σήμερα: «Η μελέτη της προγνωστικής αξίας της πρωτεΐνης MCT4 στο
στρώμα που περιβάλλει τα καρκινικά κύτταρα ορθοκολικού καρκίνου και
ηπατικών μεταστάσεων»

Επιβλέπων:

Εμμανουήλ Πικουλής, PhD, MD, Καθηγητής Χειρουργικής, Α' Χειρουργική Κλινική, Λαϊκό
Νοσοκομείο, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

4. Δημοσιεύσεις

1. [Hepatic epithelioid hemangioendothelioma and the danger of misdiagnosis: report of a case.](#)

Neofytou K, Chrysochos A, Charalambous N, Dietis M, **Petrides C**, Andreou C, Petrou A

Case Rep Oncol Med. 2013; 2013:243939. doi: 10.1155/2013/243939. Epub 2013 Feb 28. PMID: 23533870 [PubMed]

2. [Pneumothorax following ERCP: Report of Two Cases with Different Pathophysiology](#)

Neofytou K, Petrou A, Savva C, **Petrides C**, Andreou C, Felekouras E, Loizou S.

Case Rep Med. 2013;2013:206564. doi: 10.1155/2013/206564. Epub 2013 Jun 24. PMID:23864863 [PubMed]

3. [Hyponatremic renal pseudofailure and massive ascites following normal vaginal delivery: a diagnostic and therapeutic challenge.](#)

Charalampidis S, **Petrides C**, Charalampous C, Stavrou S.

Ren Fail. 2012;34(2):237-40. doi: 10.3109/0886022X.2011.647206. Epub 2012 Jan 20. PMID:22260718 [PubMed]

4. [Acute appendicitis as a rare complication of gastric band](#)

Christos Petrides, Kyriakos Neofytou, Athanasios Petrou, and Chrysanthos Georgiou

Journal of Surgical Case Reports, Oct 2013; 2013(10): rjt084. Published online Oct 5, 2013. doi:10.1093/jscr/rjt084 PMID: PMC3855073

5. [Pneumatosis cystoides intestinalis after cetuximab chemotherapy for squamous cell carcinoma of parotid gland](#)

Petrides Christos, Neofytou Kyriakos, Ioannou Andreas, Parpounas Konstantinos, Georgiou Chrysanthos, Petrou Athanasios, Pikoulis Emmanouel, Journal Of Case Reports in Oncology Medicine

6. [Pancreatic Perivasular Epithelioid Cell tumour \(PEComa\) presenting with upper gastrointestinal bleeding](#)

Petrides Christos , Neofytou Kyriakos, Aamir Z Khan, Journal Of Case Reports in Oncology Medicine, Volume 2015 (2015), Article ID 431215

7. [Insidious manifestation of pyogenic liver abscess cause by Streptococcus intermedius and Micrococcus luteus: Report of a case and review of literature](#)

Andreas Ioannou, Alexandra Karatsi, Maro Kliridou, **Christos Petrides**, Eleni Photiou and Solonas Chimonides, Oxford Medical Case Reports

Άρθρα υπό δημοσίευση:

1. [Monocarboxylate transporter 4 as a prognostic biomarker in patients with colorectal cancer and liver metastases](#)

Petrides Christos, Neofytou Kyriakos, Agorgiannis Giorgios, Petrou Athanasios, Angelou Anastasios, Papalambros Alexandros, Kavantzas Nikolaos, Felekouras Evangelos, Liakakos Theodoros, Pikoulis Emanouel, IJSO

6. **Παρουσιάσεις σε Συνέδρια**

1. **Pneumatosis cystoides intestinalis after cetuximab chemotherapy for squamous cell carcinoma of parotid gland**

Georgiou Chrysanthos, Petrides Christos, Georgiades Andreas, Kkese Katerina

12^o Ελλαδοκυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο, Λευκωσία, Κύπρος, Δεκέμβριος 2015

2. **Insidious manifestation of pyogenic liver abscess cause by Streptococcus intermedius and Micrococcus luteus: Report of a case and review of literature**

Andreas Ioannou, Alexandra Karatsi, Maro Kliridou, Christos Petrides, Eleni Photiou and Solonas Chimonides, Journal Of Case Reports in Infectious Disease

20th Greek Conference of Internal Medicine, Athens, 2014

3. **Pancreatic Perivasular Epithelioid Cell tumour (PEComa) presenting with upper gastrointestinal bleeding**

Petrides Christos , Neofytou Kyriakos, Aamir Z Khan

29th Greek Conference of Surgery, November 2014, Athens, Greece

4. **Pneumatosis cystoides intestinalis after cetuximab chemotherapy for squamous cell carcinoma of parotid gland**

Petrides Christos , Neofytou Kyriakos, Ioannou Andreas, Parpounas Konstantinos, Georgiou Chrysanthos, Petrou Athanasios, Pikoulis Emmanouel

29th Greek Conference of Surgery, November 2014, Athens, Greece

5. **Acute appendicitis as a rare complication of gastric band**

Christos Petridis, Kyriakos Neofytou, Athanasios Petrou, Andreas Ioannou, Menelaos Dietis, Chrysanthos Georgiou, Chrysochos Andreas, Andreou Charalmbos,

11th Greek-Cypriot Conference of Surgery, November 2013, Nicosia, Cyprus

6. Pneumatosis cystoides intestinalis after cetuximab chemotherapy for squamous cell carcinoma of parotid gland

Christos Petridis, Kyriakos Neofytou, Athanasios Petrou, Andreas Ioannou, Menelaos Dietis, Chrysanthos Georgiou, Sakis Loizou, Andreas Chrysochos, Andreou Charalambos,
11th Greek-Cypriot Conference of Surgery, November 2013, Nicosia, Cyprus

7. Combined ultrasonic aspiration and saline-linked radiofrequency precoagulation. A step toward bloodless liver resection without the need of liver inflow occlusion

Petrou Athanasios, Chatzikostas Panagiotis, Neofytou Kyriakos, Petridis Christos, Andreou Andreas, Felekuras Evangelos, Mudan Satvinder, Andreou Charalambos;,
28th Greek Conference of Surgery, November 2012, Athens, Greece

8. Combined Ultrasonic Aspiration and Saline-Linked Radiofrequency Precoagulation. A step toward bloodless liver resection without the need of liver inflow occlusion.

Mudan S, Petrou A, Neofytou K, Giakoustidis A, Cananzi F, Petrides C, Andreou A, Andreou C, Felekuras E. 10th EHPBA Congress, European-African Hepato-Pancreato Biliary Association, May 29-31, 2013

9. The role of monoclonal antibody Hep-Par-1 και and other cytochromes in the location of the primary tumor in a patient with pathological clavicle fracture due to metastases of unknown hepatocellular

Eleftherios I Mantonakis, Neofytou Kyriakos, Petridis Christos, Athanasios S. Petrou, Alexandros E. Papalampros
28th Greek Conference of Surgery, November 2012, Athens, Greece

10. Pathologic complete response to neoadjuvant chemoradiation therapy in locally advanced pancreatic adenocarcinoma

Petrou Athanasios, Andreou Andreas, Neofytou Kyriakos, Petridis Christos, Bramis Kostas

28th Greek Conference of Surgery, November 2012, Athens, Greece

11. Intermittent obstructive jaundice: A possible clinical manifestation of klatskin tumor

Petrou Athanasios, Chatzikostas Panagiotis, Chrisochos Andreas, Cristodoulou Zinonas, Loizou Marios, Dietis Menelaos, Petridis Christos, Neofytou Kyriakos, Andreou Andreas, Andreou Charalambos

28th Greek Conference of Surgery, November 2012, Athens, Greece

12. Chylous ascites following pancreaticoduodenectomy

Petrou Athanasios, Petridis Christos, Neofytou Kyriakos, Andreou Andreas, Bramis Kostas

28th Greek Conference of Surgery, November 2012, Athens, Greece

13. Groove pancreatitis as part of the differential diagnosis of cancer of the head of pancreas: Presentation of six cases

Athanasios Petrou, Bramis Kostas, Manzelli Antonio, Neofytou Kyriakos, Petridis Christos, Andreou Andreas, Andreou Charalambos

28th Greek Conference of Surgery, November 2012, Athens, Greece

14. Hepatic epithelioid hemangioendothelioma (HEHE) and the danger of misdiagnosis. Case report and report of the literature

Chrisohos Andreas, Loizou Marios, Christodoulou Zinonas, Petrou Athanasios, Dietis Menelaos, Petridis Christos, Neofytou Kyriakos, Andreou Andreas, Andreou Charalambos

28th Greek Conference of Surgery, November 2012, Athens, Greece

15. Preoperative diagnoses and treatment of celiac artery stenosis in a patient scheduled to have pancreaticoduodenectomy

Bramis Kostas, Neofytou Kyriakos, Petridis Christos, Andreou Andreas, Petrou Athanasios

28th Greek Conference of Surgery, November 2012, Athens, Greece

16. Challenges in the diagnosis and management of intraductal papillary mucinous neoplasma

Athanasios Petrou, Alexandros Papalambros, Petridis Christos, Neofytou Kyriakos, Konstantinos

Bramis

28th Greek Conference of Surgery, November 2012, Athens, Greece

17. Appendix adenocarcinoma as a rare presentation of acute appendicitis

Loizou Sakis, Neofytou Kyriakos, Petridis Christos, Andreou Charalambos

13th Cypriot Conference of Surgery, December 2012, Nicosia, Cyprus

18. Combined ultrasonic aspiration and saline-linked radiofrequency precoagulation. A step toward bloodless liver resection without the need of liver inflow occlusion

Petrou Athanasios, Chatzikostas Panagiotis, Neofytou Kyriakos, Petridis Christos, Andreou

Andreas, Felekuras Evangelos, Mudan Satvinder, Andreou Charalambos

13th Cypriot Conference of Surgery, December 2012, Nicosia, Cyprus

19. RFA of liver metastases from Colorectal Cancer: Cyprus experience

P. Chatzikostas, M.Dietis, Petrides Christos, Partasides V, Charalmbous C, Andreou C.

10th National Greek-Cypriot Surgery Conference, November 2011, Nicosia, Cyprus

20. “Hemorrhage and pulmonary embolism”

Chr. Georgiou, A. Vasileiou, Chr. Petrides,

16th conference of trauma and emergency surgery , Neapolis University, June 2011, Paphos

21. The role of stereotactic core biopsy in early diagnosis of breast cancer

Papazachariou I , Christoforidis C, Petrides C, Nikolaou M., Paraskeva E, Paraskeva A, Loizou S , Andreou Ch.

9th Greek-Cypriot Conferece of Surgery, November 2009, Nicosia, Cyprus

22. Hemorrhage and rapture of a GIST neoplasm in a young patient: A case report

Paidonomou M, Christoforidis C, Petrides C, Nikolaou M., Paraskeva E, Paraskeva A, Papazachariou I, Andreou Ch.

9th Greek-Cypriot Conferece of Surgery, November 2009, Nicosia, Cyprus

23. Screening and follow up of colon cancer

Polydorou N, Paidonomou M, Christoforidis C, Petrides C, Nikolaou M., Paraskeva E, Paraskeva A, Papazachariou I, Andreou Ch.

9th Greek-Cypriot Conferece of Surgery, November 2009, Nicosia, Cyprus

8. Εκπαιδευτικά Προγράμματα

Ιούνιος 2009. Advanced Trauma Life Support (ATLS)

Οκτώμβριος 2009. Advanced Life Support (ALS)

9. Σεμινάρια

2015: 12th Greek-Cypriot Conference of Surgery, December 2015, Nicosia, Cyprus

2014: 12th Cypriot Conference of Surgery, November 2014, Nicosia, Cyprus

2013: 11th Greek-Cypriot Conference of Surgery, November 2013, Nicosia, Cyprus

2012: 28th Greek Conference of Surgery, November 2012, Athens, Greece

2012: Trauma Seminar, Paphos, Cyprus

2012: 13th Cypriot Conference of Surgery, December 2012, Nicosia, Cyprus

2011: 10th Greek-Cypriot Conference of Surgery, November 2013, Nicosia, Cyprus

2010: 12th Cypriot Conference of Surgery, December 2012, Nicosia, Cyprus

2009: 9th Greek-Cypriot Conference of Surgery, November 2009, Nicosia, Cyprus

2009: Trauma and Emergency seminar, Nicosia, Cyprus

10. Διαδρακτική Εμπειρία

Honorary Lecturer at the University of Nicosia Medical School

Συμμετοχή στην εκπαίδευση των φοιτητών του Πανεπιστημίου Λευκωσίας κατά την άσκηση τους στην κλινική της Γενικής Χειρουργικής του Γενικού Νοσοκομείου Λευκωσίας.

11. Επαγγελματικές Οργανώσεις

1. Πλήρης εγγραφή στο Μητρώο Ιατρών Κύπρου
2. Παγκύπριος Ιατρικός Σύλλογος

12. Γλώσσες

Ελληνικά (native)

English (very good)

13. Άλλα

Computer Skills: Full working knowledge of Microsoft Windows, Word, Excel, Power Point and Internet Explorer. I have also diploma in ECDL and GCE A-Level on Computer skills.

Ευχαριστίες

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί μία από τις συχνότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας στο δυτικό κόσμο. Η πρόληψη, η έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπισή του, καθώς και η εισαγωγή νέων στοχευμένων θεραπειών συνιστά επιτακτική ανάγκη για την αποτελεσματική και εξατομικευμένη καταπολέμησή του. Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών καρκινογένεσης μπορεί να συμβάλει ουσιαστικά στην κατεύθυνση αυτή.

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στην Α' Χειρουργική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του κ. Εμμανουήλ Πικούλη, Καθηγητή Χειρουργικής, η συμβολή του οποίου στο σχεδιασμό, την υλοποίηση, τη συγγραφή και τη δημοσίευσή της υπήρξε αμέριστη. Τον ευχαριστώ θερμά και τον ευγνωμονώ για τη δυνατότητα που μου έδωσε, τη στήριξη και τις συμβουλές του σε όλα τα στάδια της διδακτορικής διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην κ. Ευάγγελο Φελέκουρα, Καθηγητή Χειρουργικής, για την ακούραστη βοήθειά του, τη συνέπεια, τις γνώσεις, την καθοδήγηση και τη θερμή υποστήριξή του σε όλη τη διάρκεια της παρούσας μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα, τον κ. Νικόλαο Καβαντζά, Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής, για την πάντα πρόθυμη βοήθειά του, τις συμβουλές του και την αδιάκοπη στήριξή του κατά την εκπόνηση της διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γιώργο Αγρογιάννη, Ιατρό Παθολογοανατόμο, Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομική για την πολύτιμη συνεισφορά του στην επεξεργασία των ιστολογικών παρασκευασμάτων.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη στήριξη και την αγάπη με τις οποίες πλαισίωσαν τις προσπάθειές μου.

Περίληψη

Σκοπός

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι ο καθορισμός της προγνωστικής αξίας της μεμβρανικής πρωτεΐνης μεταφοράς μονοκαρβοξυλασών (MCT4) σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου και ηπατικές μεταστάσεις (CRLM). Διερευνήσαμε τη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της MCT4 στους ασθενείς με CRLM και της συνολικής επιβίωσης (overall survival-OS) καθώς επίσης και του διαστήματος ελεύθερου νόσου (Disease Free Survival – DFS). Η μελέτη της έκφρασης της MCT4 έγινε τόσο στα κύτταρα του στρώματος που περιβάλλουν τις ηπατικές μεταστάσεις και ειδικότερα στους ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο (CAFs) όσο και στα ίδια τα καρκινικά κύτταρα. Ο πληθυσμός της μελέτης αφορούσε ασθενείς με καρκίνο στο παχύ έντερο οι οποίοι είχαν μεταστατική νόσο μόνο στο ήπαρ χωρίς οποιαδήποτε άλλη εξωηπατική εντόπιση.

Μέθοδος

Πρόκειται για μια αναδρομική έρευνα κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν τα κλινικά αρχεία και τα ιστολογικά παρασκευάσματα 107 ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου και ηπατικές μεταστάσεις. Η ανίχνευση και καθορισμός της έκφρασης της MCT4 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας η οποία αξιολογήθηκε με ημιποσοτική μέθοδο. Δημιουργήθηκαν τελικά δύο ομάδες ασθενών προς σύγκριση της συνολικής τους επιβίωσης (OS) και του διαστήματος ελεύθερου νόσου (DFS). Η πρώτη ομάδα περιλάμβανε τους ασθενείς τους οποίους τα ιστολογικά παρασκευάσματα είχαν ασθενή χρώση για την MCT4 (weak MCT4 expression) και η δεύτερη ομάδα περιλάμβανε αυτούς που παρουσίαζαν ισχυρή χρώση για την MCT4 (strong MCT4 expression). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για τη συνολική επιβίωση (OS) και το διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) περιλάμβανε τόσο τη μέθοδο Kaplan-Meier όσο και πολυπαραγοντικές μεθόδους ανάλυσης (Cox-regression methods).

Αποτελέσματα

Τα ιστολογικά δείγματα από CLRM των 57 ασθενών (53,27%) παρουσίασαν ασθενή χρώση των κυττάρων του στρώματος ως προς την MCT4 σε αντίθεση με τα δείγματα 50 ασθενών (46,73%) τα οποία παρουσίασαν ισχυρή χρώση των κυττάρων του στρώματος για την MCT4. Από την στατιστική ανάλυση που ακολούθησε οι ασθενείς οι οποίοι εμφάνιζαν ισχυρή χρώση για την MCT4 είχαν μειωμένο διάστημα ελεύθερο νόσου - DFS (HR 1.79; 95%CI, 1.12-2.85; P=0,014) καθώς επίσης και μειωμένη συνολική πενταετή επιβίωση - OS (HR 3.81 95%CI, 1.88-7.72; P<0,001) στην μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης. Η συσχέτιση αυτή παρέμεινε στατιστικά σημαντική και κατά τη διενέργεια της πολυπαραγοντικής ανάλυσης για το διάστημα ελεύθερο νόσου – DFS και για τη συνολική πενταετή επιβίωση - OS (HR 1.95; 95% CI, 1.19-3.17; P=0.007, και HR 4.38; 95%CI, 2.15-8.92; P<0.001 αντίστοιχα). Το ποσοστό έκφρασης της MCT4 στα καρκινικά κύτταρα δεν συσχετίζεται με το διάστημα ελεύθερο νόσου – DFS και τη συνολική πενταετή επιβίωση - OS στους ασθενείς με CRLM. Το διάστημα ελεύθερο νόσου – DFS και η συνολική πενταετής επιβίωση - OS για τους ασθενείς με ασθενή χρώση στα κύτταρα του στρώματος για την MCT4 ήταν 43% και 78% ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τους ασθενείς που εμφάνιζαν ισχυρή χρώση για την MCT4 ήταν 15% and 37% αντίστοιχα.

Συμπέρασμα

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συνδέουν την ισχυρή έκφραση της MCT4 στα κύτταρα του στρώματος (και ειδικότερα στους ινοβλάστες-CAFs) με χειρότερη συνολική επιβίωση και συχνότερες υποτροπές στους ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου και ηπατικές μόνο μεταστάσεις. Τα αποτελέσματα αυτά πρέπει να επικυρωθούν και με άλλες μελέτες για να μπορέσει η MCT4 να καθιερωθεί ως προγνωστικός δείκτης στον CRLM και παράλληλα πρέπει να μελετηθεί η ανάπτυξη αναστολέων της MCT4 οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν

συνεργικά με τα υπάρχοντα χημειοθεραπευτικά σχήματα για μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του μεταστατικού δυναμικού των καρκινικών κυττάρων. Η στοχοποίηση με μικρά μόρια-αναστολείς του κυτταρικού μεταβολισμού μπορεί να επιφέρει θετικά ευεργετικά αποτελέσματα στους ασθενείς με κακοήθεια.

Abstract

OBJECTIVE:

To validate the prognostic significance of the expression of Monocarboxylate Transporter 4 (MCT4) in patients with colorectal liver metastases (CRLM). In this study, we investigated the correlation between MCT4 expression in stromal and tumor cells of colorectal liver metastases (CRLM) with disease free (DFS) and overall survival (OS) in liver-only colorectal metastases treated with liver resection following neoadjuvant chemotherapy.

METHODS:

This is a retrospective study, of 107 patients with colorectal liver metastases. MCT4 expression in both stromal and tumor cells was studied by immunohistochemistry. The staining was scored semiquantitatively as weak, or strong. DFS and OS were calculated using both Kaplan-Meier and multivariate Cox-regression methods

RESULTS:

Specimens from 57 patients (53,27%) showed weak levels of stromal MCT4 staining, whereas 50 patients (46,73%) showed strong levels of MCT4 staining. From the statistical analysis strong stromal MCT4 expression was associated with decreased DFS (HR 1.79; 95%CI, 1.12-2.85; P=0,014) and OS (HR 3.81 95%CI, 1.88-7.72; P<0,001) in univariate analysis. This finding remained significant in multivariate analysis for both DFS and OS (HR 1.95; 95%CI, 1.19-3.17; P=0.007, and HR 4.38; 95%CI, 2.15-8.92; P<0.001 respectively). Tumour MCT4 expression was not associated with DFS and OS. Five-years DFS and OS rates were 43% and 78% respectively in patients with weak and 15% and 37% respectively in patients with strong stromal MCT4 expression.

CONCLUSION:

Our results indicated that strong expression of stromal MCT4 in CRLM was associated with poor prognosis in patients who undergo liver resection for liver-only colorectal metastases. This finding could be further more validated in independent studies and MCT4 could be used as a new biomarker in CRLM and creates the possibility of new studies in targeted therapies.

Keywords

MCT4, CRLM, colorectal cancer prognosis

Πίνακας Περιεχομένων

Γενικό Μέρος

1. Παχύ έντερο

1.1 Στοιχεία ανατομίας παχέος εντέρου.....Σελ. 25

1.2 Φυσιολογία του παχέος εντέρου.....Σελ. 32

2. Ήπαρ

2.1 Στοιχεία ανατομίας ήπατος..... Σελ. 34

2.2 Φυσιολογία του ήπατος..... Σελ. 38

3. Καρκίνος του παχέος εντέρου

3.1 Επιδημιολογία Σελ. 41

3.2 Παράγοντες κινδύνου Σελ. 43

3.3 Κλινική εικόνα Σελ. 49

3.4 Διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου Σελ. 51

3.5 Σταδιοποίηση καρκίνου παχέος εντέρου Σελ. 58

3.6 Θεραπεία καρκίνου παχέος εντέρου Σελ. 63

3.7 Καρκίνος του παχέος εντέρου και ηπατικές μεταστάσεις Σελ. 68

3.8 Θεραπευτική προσέγγιση ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου και ηπατικές
Μεταστάσεις Σελ. 69

4. Προγνωστικοί παράγοντες στον καρκίνο του παχέος εντέρου Σελ. 77

5. Προγνωστικοί παράγοντες σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και

ηπατικές μεταστάσεις που υποβάλλονται σε ηπατεκτομή Σελ. 85

6. Κυτταρικός μεταβολισμός και καρκίνος

- 6.1 Το μικροπεριβάλλον των κακόηθων όγκων Σελ. 89
- 6.2 Το «Warburg effect» Σελ. 91
- 6.3 Αυτοφαγία/Μιτοχρονδριοφαγία Σελ. 98
- 6.4 Μεταγραφικοί παράγοντες που δρουν ως διεγέρτες της αυτοφαγίας Σελ. 101
- 6.5 Αυτοφαγία στα κύτταρα του καρκινικού στρώματος Σελ. 107

7. Διαμεμβρανικοί μεταφορείς μονοκαρβοξυλασών (MCTs) και γαλακτικό οξύ Σελ. 111

8. «Reverse Warburg effect» Σελ. 118

9. Μεταβολικός συνεταιρισμός CAFs/καρκινικών κυττάρων Σελ. 122

10. Το «Reverse Warburg effect» και ο μεταβολικός συνεταιρισμός

CAFs/καρκινικών κυττάρων προάγουν τις διεργασίες της καρκινογένεσης Σελ. 131

11. Η σημασία του «Reverse Warburg Effect» και

του «Stromal-Epithelial Metabolic Coupling» για τον ασθενή με καρκίνο Σελ. 135

12. Προγνωστικοί δείκτες οι οποίοι σχετίζονται με το «Reverse Warburg Effect»

και το "Stromal-Epithelial Metabolic Coupling" Σελ. 137

Ειδικό Μέρος

1. Σκοπός Σελ. 150

2. Υλικό και Μέθοδος Σελ. 152

2.1 Ανοσοϊστοχημεία Σελ. 155

2.2 Έλεγχος αποτελεσμάτων Ανοσοϊστοχημείας Σελ. 157

2.3 Στατιστική Ανάλυση	Σελ. 159
3. Αποτελέσματα	Σελ. 161
3.1 Διάστημα Ελεύθερο Νόσου (DFS)	Σελ. 170
3.2 Συνολική Επιβίωση (OS)	Σελ. 177
4. Συζήτηση	Σελ. 184
4.1 Θεραπευτικές προσεγγίσεις σε σχέση με την MCT4	Σελ. 195
5. Συμπεράσματα	Σελ. 204

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Παχύ έντερο

1.1 Στοιχεία Ανατομίας Παχέος Εντέρου

Το παχύ έντερο αποτελεί το τελικό τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα μετά το λεπτό έντερο και εκτείνεται από το τέλος του ειλεού μέχρι τον πρωκτό, έχοντας συνολικό μήκος περίπου 1,5m ενώ η διάμετρός του βαίνει προοδευτικά μειούμενη από τα 7,5cm του τυφλού στα 2,5cm του σιγμοειδούς, αν και μπορεί να αυξηθεί θεαματικά σε περιπτώσεις διάτασης. Διαιρείται ανατομικά στα εξής επιμέρους τμήματα: το τυφλό, το ανιόν, το εγκάρσιο, το κατιόν, το σιγμοειδές κόλον και το ορθό (Εικόνα 1).

Τυφλό: αποτελεί το πρώτο τμήμα του παχέος εντέρου και ονομάζεται έτσι επειδή το κάτω μέρος του απολήγει τυφλά. Είναι μια σακοειδής διαμόρφωση με μήκος 6-8 cm, το οποίο εκτείνεται χαμηλότερα από την ειλεοτυφλική βαλβίδα, περιβάλλεται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από περιτόναιο και βρίσκεται στο δεξιό λαγόνιο βόθρο. Στο σημείο αυτό βρίσκεται και η σκωληκοειδής απόφυση. Πρακτικά πρόκειται για εκκόλπωμα που εξορμάται από το οπίσθιο κεντρικό τμήμα του τυφλού περίπου 3 cm κάτωθεν της ειλεοτυφλικής συμβολής. Το μήκος της κατά μέσο όρο είναι 8-10 cm και η διάμετρός της 5 mm. Αν και μπορεί να λάβει οποιαδήποτε θέση (οπισθοτυφλική, προειλεϊκή, υποτυφλική, πυελική, οπισθοειλεϊκή κ.λπ.), στο 85-95% των περιπτώσεων βρίσκεται στη μεσότητα του οπισθίου τοιχώματος του τυφλού, πλησίον του ειλεού και περιφερικότερα από την ειλεοτυφλική συμβολή. Προς τα άνω το τυφλό συνέχεται με το ανιόν κόλον. Το τυφλό επικοινωνεί επίσης με το λεπτό έντερο διαμέσου της ειλεοτυφλικής βαλβίδας, την ανατομική δηλαδή περιοχή όπου ο τελικός ειλεός εισέρχεται εντός του παχέος εντέρου. Η ειλεοτυφλική βαλβίδα ρυθμίζει την πρόωθηση του περιεχομένου του τελικού ειλεού

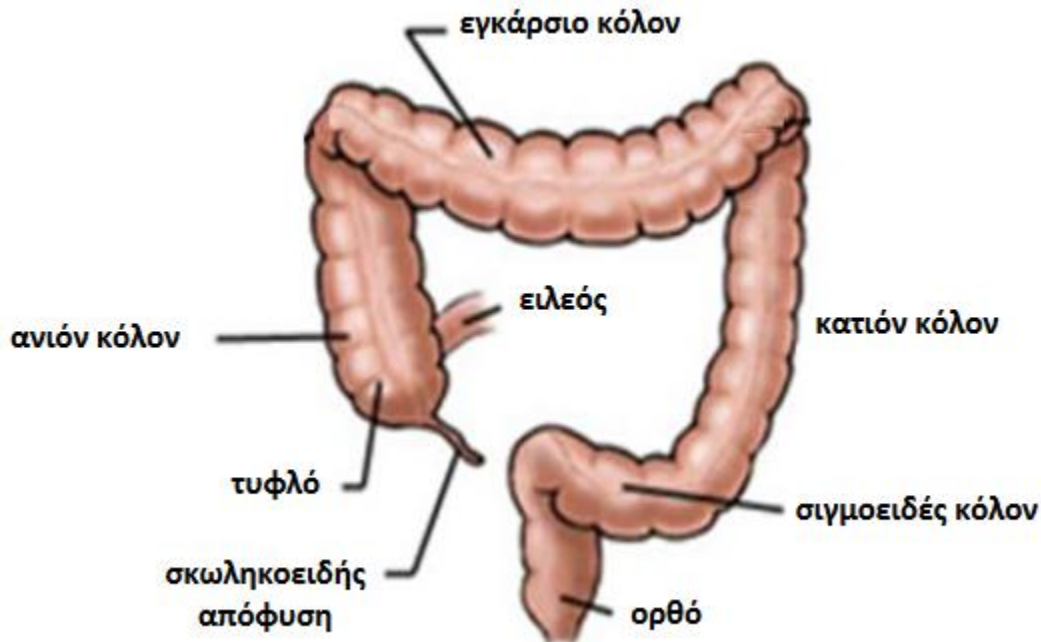
προς το τυφλό, ενώ η παλινδρόμηση περιεχομένου από το τυφλό προς τον ειλεό φαίνεται να εμποδίζεται από την ειλεοτυφλική γωνίωση^{1,2}.

Ανιόν κόλον: έχει μήκος περίπου 15cm και εκτείνεται από το τυφλό μέχρι την κάτω επιφάνεια του ήπατος, όπου ανακάμπτει προς τα αριστερά, σχηματίζοντας τη δεξιά ή ηπατική κολική καμπή. Η ηπατική καμπή υποστηρίζεται από το νεφροκολικό σύνδεσμο, βρίσκεται δε ακριβώς μπροστά του κατώτερου τμήματος του δεξιού νεφρού και της κάθετης μοίρας του δωδεκαδακτύλου. Το ανιόν περιβάλλεται από περιτόναιο κατά την πρόσθια και τις δύο πλάγιες επιφάνειές του, ενώ η οπίσθια επιφάνειά του δεν καλύπτεται από περιτόναιο αλλά από χαλαρό συνδετικό ιστό. Η ανάκαμψη του περιτοναίου στο πλάγιο κοιλιακό τοίχωμα ονομάζεται γραμμή του Toldt και αποτελεί χρήσιμο ανατομικό στοιχείο στις χειρουργικές επεμβάσεις του ανιόντος κόλου³.

Εγκάρσιο κόλον: Αποτελεί το μεγαλύτερο τμήμα του παχέως εντέρου με μήκος περίπου 45 cm. Περιβάλλεται από περιτόναιο σε όλες του τις επιφάνειες και συμφύεται με το μείζον επίπλουν κατά την πρόσθια-άνω επιφάνειά του. Η αριστερή ή σπληνική καμπή βρίσκεται πίσω από τον κάτω πόλο του σπλήνα και καθηλώνεται στο διάφραγμα με το φρενοκολικό σύνδεσμο. Συγκριτικά με την ηπατική καμπή, η σπληνική καμπή σχηματίζει πιο οξεία γωνία και βρίσκεται σε πιο ψηλή θέση.

Κατιόν κόλον: αρχίζει από την αριστερή κολική καμπή και φέρεται προς τα κάτω, στην αριστερή λαγόνια χώρα, μέχρι την είσοδο της ελάσσοнос πυέλου, όπου μεταπίπτει στο σιγμοειδές κόλον. Έχει μήκος περίπου 25εκ. Καλύπτεται από περιτόναιο κατά την πρόσθια και τις δύο πλάγιες επιφάνειές του. Κατά την οπίσθια του επιφάνεια έρχεται σε επαφή με τον αριστερό νεφρό, τον τετράγωνο οσφυϊκό και τον εγκάρσιο κοιλιακό μυ^{2,3,7}.

Σιγμοειδές: Το σιγμοειδές αποτελεί ένα κινητό, σχήματος S τμήμα του παχέος εντέρου, του οποίου όμως το μήκος (35-40 cm) και το σχήμα ποικίλλει. Καλύπτεται πλήρως από περιτόναιο, το οποίο είναι προσκολλημένο στο πλάγιο τοίχωμα της πυέλου. Το σιγμοειδές κείται στο σιγμοειδικό βόθρο, ο οποίος σχηματίζεται από την πτύχωση που σχηματίζει το μακρύ και χαλαρό μεσοσιγμοειδές. Ακριβώς κάτω από αυτόν το χώρο βρίσκεται ο ουρητήρας ο οποίος κατά την πορεία του διασταυρώνεται με τα σπερματικά, τα αριστερά κολικά και τα σιγμοειδικά αγγεία.



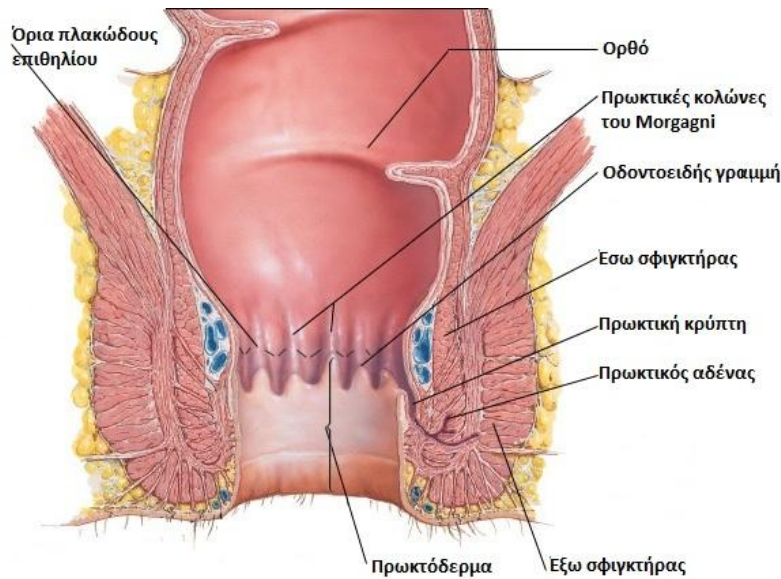
Εικόνα 1: Τα μέρη του παχέως εντέρου

Ορθό: Το ορθό είναι το τελευταίο τμήμα του παχέος εντέρου πριν αυτό καταλήξει στον πρωκτό. Βρίσκεται μέσα στην πυέλο, ανάμεσα στα κόκκαλα της λεκάνης. Το ορθό έχει μήκος γύρω στα 12cm και έχει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της κένωσης του εντέρου. Τα τελευταία ελάχιστα εκατοστά του ορθού περιβάλλονται από τους σφικτήρες που ελέγχουν την εγκράτεια του εντέρου. Το ορθό συνέχεται κατά την πρόσθια επιφάνειά του στις μεν γυναίκες με

το οπίσθιο τοίχωμα του κόλπου και τον τράχηλο της μήτρας, στους δε άνδρες με το οπίσθιο τοίχωμα της ουροδόχου κύστης, τις σπερματοδόχες ληκύθους, τον προστάτη και τον σπερματικό πόρο. Κατά την οπίσθια επιφάνειά του συνεχεται με τα μέσα ιερά αγγεία και τις ρίζες του ιερού πλέγματος. Το ορθό χαρακτηρίζεται από την απουσία κολικών ταινιών, επιπλοϊκών αποφύσεων, και κολικών κυψελών και μεσοκόλου, στοιχεία τα οποία χαρακτηρίζουν το υπόλοιπο παχύ έντερο. Ο αυλός του έχει σχετικά μεγάλη διάμετρο και διατείνεται εύκολα. Καθώς το περιτόναιο ανακάμπτει περίπου στα 7-9 cm από το δακτύλιο του πρωκτού στους άνδρες και στα 5-7 cm στις γυναίκες, χωρίζει το ορθό σε άνω τριτημόριο το οποίο καλύπτεται από περιτόναιο κατά την πρόσθια και τις πλάγιες επιφάνειές του, μέσο τριτημόριο το οποίο καλύπτεται από περιτόναιο μόνο κατά την πρόσθια επιφάνειά του και κάτω, το οποίο είναι αμιγώς εξωπεριτοναϊκό καθώς καμία επιφάνειά του δεν καλύπτεται από περιτόναιο^{1,2}.

Πρωκτικός Σωλήνας: Ο πρωκτικός σωλήνας έχει μήκος 3,5-5cm και επεκτείνεται από την είσοδο του πρωκτού μέχρι την ορθοπρωκτική γωνία. Περιβάλλεται από ισχυρότατους μύες (σφιγκτήρες), οι οποίοι επειδή βρίσκονται σε τονική σύσπαση προκαλούν σύμπτωση των πλαγίων τοιχωμάτων. Το εσωτερικό τοίχωμα του σωλήνα αυτού είναι διαφορετικό στο πάνω μέρος και διαφορετικό στο κάτω. Σε απόσταση 1,5 cm μετά την είσοδο του πρωκτού είναι το επίπεδο που αλλάζει το εσωτερικό τοίχωμα και η γραμμή αυτή λέγεται οδοντωτή γραμμή. Αυτός είναι ο λόγος που οι όγκοι του πρωκτού ανάλογα του επιπέδου από το οποίο εξορμώνται έχουν διαφορετική αντιμετώπιση. Το κατώτερο τμήμα του παχέος εντέρου που μεταβαίνει στον πρωκτό λέγεται ορθό (απευθυσμένο). Στο σημείο που μεταβαίνει, πτυχώνεται και σχηματίζει 6-14 πτυχές, οι οποίες λέγονται στήλες morgagni, ανάμεσά τους σχηματίζονται κρύπτες, όπου εκεί εκβάλουν οι πρωκτικοί αδένες, οι οποίοι έχουν σημασία στην παθογένεια των περιεδρικών αποστημάτων. Σε αυτόν τον σωλήνα και πάνω από τη γραμμή που διαχωρίζει το εσωτερικό

τοίχωμα του πρωκτού ευρίσκεται το αιμορροϊδικό πλέγμα [αγγειακά μαξιλάρια (vascular cushions)], το οποίο ευθύνεται για την ανάπτυξη των αιμορροΐδων.

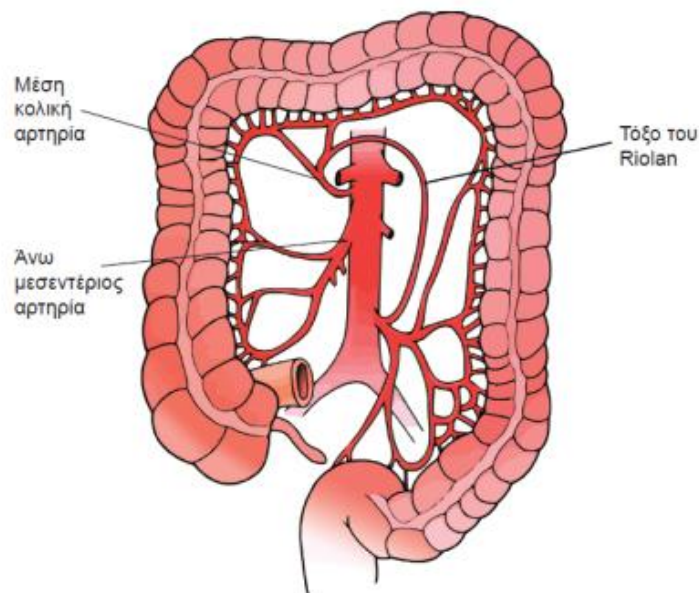


Εικόνα 2: Πρωκτικός σωλήνας

Αιμάτωση: Η αιμάτωση του παχέος εντέρου γίνεται από την άνω και κάτω μεσεντέρια αρτηρία, σύμφωνα με την εμβρυολογική ανάπτυξη των τμημάτων του (Εικόνα 3). Η άνω μεσεντέρια αρτηρία εκφύεται από την αορτή ισοϋψώς προς το άνω χείλος του παγκρέατος στο ύψος του Ο₁ σπονδύλου και ακολουθεί πορεία πίσω από τον αυχένα του παγκρέατος σε επαφή με την αγκιστροειδή απόφυση, ακολούθως μπροστά από την 3^η μοίρα του δωδεκαδακτύλου και στη συνέχεια προς τα κάτω και δεξιά στη ρίζα του μεσεντερίου. Το τυφλό, το ανιόν κόλον και τα δύο πρώτα τριτημόρια του εγκαρσίου κόλου αιματώνονται από κλάδους της άνω μεσεντέριας αρτηρίας. Οι φλέβες ακολουθούν τις αρτηρίες και καταλήγουν στην άνω μεσεντέρια φλέβα, ενώ η λέμφος αποχετεύεται στους άνω μεσεντέριους λεμφαδένες³.

Το τελευταίο τριτημόριο του εγκαρσίου κόλου, το κατιόν και το σιγμοειδές αιματώνονται από κλάδους της κάτω μεσεντέριας αρτηρίας. Η κάτω μεσεντέριος αρτηρία εκφύεται από την αορτή

περίπου 3-4 cm πάνω από τον διχασμό της και κατέρχεται προς την πύελο. Η κάτω μεσεντέριος χορηγεί την αριστερή κολική και δύο έως έξι σιγμοειδικές αρτηρίες. Οι σιγμοειδικές αρτηρίες σχηματίζουν αρτηριακά τόξα μέσα στο μεσοσιγμοειδές και αναστομώνονται με την αριστερή κολική και την άνω αιμορροϊδική αρτηρία. Οι φλέβες από τα τμήματα αυτά του παχέως εντέρου καταλήγουν στην κάτω μεσεντέρια φλέβα και η λέμφος παροχετεύεται στους κάτω μεσεντέριους λεμφαδένες. Το ορθό εμφανίζει πολύπλοκη αιμάτωση και φλεβική απορροή. Αιματώνεται από κλάδους της κάτω μεσεντέριας αρτηρίας και της έσω λαγόνιας αρτηρίας, ενώ οι φλέβες του καταλήγουν στην κάτω μεσεντέρια φλέβα (πυλαία κυκλοφορία) αλλά και στην έσω λαγόνια φλέβα (συστηματική κυκλοφορία) και αποτελούν σημαντικό σημείο αναστόμωσης μεταξύ της πυλαίας και της συστηματικής κυκλοφορίας. Με παρόμοιο τρόπο η λέμφος παροχετεύεται τόσο στα κάτω μεσεντέρια λεμφογάγγλια όσο και στους έσω λαγόνιους λεμφαδένες^{6,7}.



Εικόνα 3: Αιμάτωση του παχέως εντέρου

Οι αρτηρίες που αρδεύουν το παχύ έντερο σχηματίζουν την επιχείλιο αρτηρία του Drummond. Αυτή σχηματίζεται ουσιαστικά από μια σειρά αναστομωτικών τόξων μεταξύ των κλάδων της ειλεοκολικής, της δεξιάς, της μέσης κολικής αρτηρίας και των σιγμοειδικών αρτηριών. Πορεύεται παράλληλα με το μεσεντερικό χείλος του παχέως εντέρου και σε απόσταση 1-8 cm από το εντερικό τοίχωμα. Επίσης ως τόξο του Riolan ορίζεται η παρουσία αναστομών μεταξύ της μέσης κολικής αρτηρίας και του ανιόντα κλάδου της αριστερής κολικής αρτηρίας, δημιουργώντας επικοινωνία της άνω με την κάτω μεσεντέριο αρτηρία.

Νεύρωση: Το δεξιό κόλον δέχεται συμπαθητική νεύρωση από το ανώτερο μεσεντέριο πλέγμα (προερχόμενο από τα Θ10 - Θ12 μυελοτόμια) και παρασυμπαθητική από το πνευμονογαστρικό νεύρο. Το αριστερό κόλον δέχεται συμπαθητική νεύρωση προερχόμενη από τα 01 - 03 μυελοτομία. Σχηματίζεται το κάτω μεσεντέριο πλέγμα και κατόπιν το ανώτερο υπογάστριο πλέγμα το οποίο διχάζεται στα δύο υπογάστρια νεύρα. Η παρασυμπαθητική νεύρωση του αριστερού κόλου, ορθού, πρωκτού και των πυελικών σπλάγγων προέρχεται από τα Π1-2-3 μυελοτομία^{3,4}.

1.2 Φυσιολογία του παχέος εντέρου

Νερό: Φυσιολογικά το παχύ έντερο απορροφά με ένα μηχανισμό παθητικής μεταφοράς το 90% της ποσότητας του ύδατος που φτάνει στον αυλό του από το λεπτό έντερο. Το ποσό αυτό ανέρχεται περίπου στα 1-2L ημερησίως ενώ σε συγκεκριμένες καταστάσεις μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 5L. Η αδυναμία του παχέως εντέρου να απορροφήσει την ποσότητα του προερχόμενου από τον ειλέο ύδατος, προκαλεί τις διαρροϊκές κενώσεις. Το ποσό ύδατος που τελικά αποβάλλεται από τα κόπρανα δεν ξεπερνά τα 100-150 ml^{3,4}.

Ηλεκτρολύτες: Σε φυσιολογικές συνθήκες λειτουργίας του γαστρεντερικού σωλήνα, στο παχύ έντερο επαναρροφάται νάτριο και χλώριο προς το εντερικό κύτταρο και αποβάλλεται κάλιο και διττανθρακικά προς τον εντερικό αυλό. Το νάτριο επαναρροφάται με μηχανισμό ενεργητικής μεταφοράς διαμέσου της αντλίας Na-K-ATPάσης, με αποτέλεσμα περίπου 400 mEq νατρίου να απορροφώνται από το κόλον ημερησίως. Η ενεργητική μεταφορά νατρίου δημιουργεί οσμωτική κλίση με τελικό αποτέλεσμα την παθητική μεταφορά του ύδατος από τον εντερικό αυλό. Το κάλιο απεκκρίνεται ενεργητικά στον αυλό του εντέρου και επαναρροφάται παθητικά, ενώ το χλώριο επαναρροφάται ενεργητικά μέσω αντλίας ανταλλαγής χλωρίου-διττανθρακικών. Η προερχόμενη από τη διάσπαση της ουρίας και των πρωτεϊνών (με την επίδραση των βακτηριδίων της εντερικής χλωρίδας) αμμωνία, επαναρροφάται παθητικά και στη συνέχεια μεταφέρεται στο ήπαρ^{4,5}.

Τα διάφορα τμήματα του παχέος εντέρου, καθώς και διαφορές στη λειτουργία των κυττάρων του εντερικού βλεννογόνου παίζουν διαφορετικό ρόλο στη μεταφορά και ανταλλαγή του ύδατος και των ηλεκτρολυτών. Ειδικότερα, η απορρόφηση του ύδατος και των αλάτων επιτελείται κυρίως στο ανιόν και το εγκάρσιο κόλον. Τα επιφανειακά κύτταρα εμπλέκονται στην απορρόφηση

ύδατος και ηλεκτρολυτών, ενώ τέλος τα κύτταρα που εδράζονται στις κρύπτες με την απέκκριση αυτών^{4,5}.

Μεταβολισμός και αποθήκευση: Αν και το μεγαλύτερο ποσοστό της διατροφής πέπτεται στο στομάχο και στο λεπτό έντερο, το παχύ έντερο διατηρεί και αυτό ένα σημαντικό ρόλο στην πέψη. Η διαδικασία ζύμωσης των υδατανθράκων από τη μικροβιακή χλωρίδα λαμβάνει χώρα κυρίως στο δεξιό κόλον και στο εγγύς εγκάρσιο, οδηγώντας στην παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (βουτυρικό, προπιονικό, ακετικό) και τελικά το μεγαλύτερο τους ποσοστό (περίπου 95%) απορροφώνται στο κόλον⁴.

Στο παχύ έντερο φτάνουν και πρωτεϊνικά υπολείμματα, τα οποία εισέρχονται στη διαδικασία της βακτηριακής (αναερόβιας) ζύμωσης με κυριότερη εντόπιση το αριστερό κόλον. Τα προϊόντα της ζύμωσης αυτής είναι λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου, αμμωνία, αμίνες, φαινόλες και ινδόλες. Τμήμα των μεταβολιτών αυτών χρησιμεύει ως πηγή αζώτου για τη βακτηριακή ανάπτυξη, ένα μέρος τους απορροφάται, ενώ τα υπόλοιπα αποβάλλονται από τα κόπρανα. Τα λίπη που προσλαμβάνονται με την τροφή φαίνεται να μην απορροφώνται καθόλου στο κόλον. Η κύρια πηγή ενέργειας για το βλεννογόνο του παχέος εντέρου είναι το περιεχόμενο του εντερικού αυλού, καθώς τα κύτταρά του δεν μπορούν να προσλάβουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά από τη συστηματική κυκλοφορία. Κύρια πηγή ενέργειας αποτελεί το βουτυρικό οξύ καθώς συμβάλλει στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του βλεννογόνου, όπως επίσης και η απορρόφηση ύδατος και αλάτων. Το προπιονικό οξύ χρησιμοποιείται στο ήπαρ για τη γλυκονογένεση, ενώ το ακετικό χρησιμεύει ως πηγή ενέργειας για τους μυς. Το εγγύς κόλον έχει κυρίως αποθηκευτικό ρόλο, ενώ το άπω αποτελεί τον αγωγό. Μετά από δεξιά κολεκτομή, το

εγκάρσιο κόλον προσαρμόζεται στις ανάγκες και υποκαθιστά τον αποθηκευτικό ρόλο του αφαιρεθέντος δεξιού κόλου εξίσου αποτελεσματικά⁷.

2. Ήπαρ

2.1 Στοιχεία Ανατομίας Ήπατος

Το ήπαρ έχει φυσιολογικό βάρος 1.4–1.6 kg (3.1–3.5 lb), και αποτελεί περίπου το 2% του συνολικού βάρους του σώματος^{1,2}. Καταλαμβάνει ολόκληρο το δεξιό υποχόνδριο, τμήμα του ιδίως επιγαστρίου καθώς επίσης και τμήματα του αριστερού υποχονδρίου. Το σχήμα του μοιάζει με σφήνα της οποίας η βάση βρίσκεται προς τα δεξιά και η κορυφή της προς τα αριστερά. Διακρίνονται τρία χείλη (πρόσθιο, δεξιό και αριστερό) καθώς και τρεις επιφάνειες (άνω, κάτω και οπίσθια). Στην κάτω επιφάνεια του ήπατος υπάρχει η πύλη από την οποία εισέρχονται η πυλαία φλέβα και η ηπατική αρτηρία και εξέρχεται ο χοληδόχος πόρος. Στην κάτω επιφάνεια του δεξιού λοβού υπάρχει ο κυστικός βόθρος με τη χοληδόχο κύστη καθώς επίσης και διάφορα εντυπώματα που σχηματίζονται από πιέσεις των γειτονικών σπλάγχων. Με τα περιβάλλοντα σπλάχνα συνδέεται μέσω συνδέσμων (ηπατοδωδεκαδακτυλικός, ηπατογαστρικός, ηπατοκολικός). Η στήριξη του, ωστόσο, στη θέση του οφείλεται κυρίως στην αρνητική ενδοκοιλιακή πίεση και τις ηπατικές φλέβες που εκβάλλουν στην κάτω κοίλη φλέβα^{2,3}.

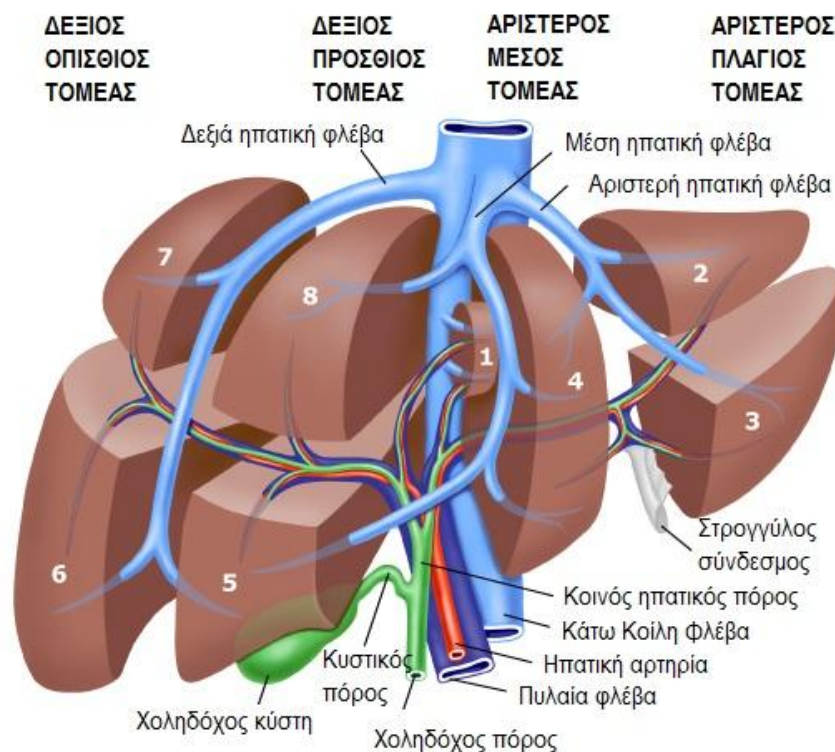
Μακροσκοπικά το ήπαρ διαιρείται σε τέσσερις λοβούς, διαίρεση η οποία βασίζεται στα επιφανειακά του χαρακτηριστικά. Ο δρεπανοειδής σύνδεσμος είναι ορατός από την πρόσθια επιφάνεια του ήπατος. Αυτός χωρίζει το ήπαρ σε δεξί και αριστερό ανατομικό λοβό. Αν ανασπαστεί το ήπαρ, για να αποκαλυφθεί η οπίσθια επιφάνεια του, παρατηρούνται άλλοι δύο λοβοί οι οποίοι βρίσκονται ανάμεσα στο δεξιό και τον αριστερό. Αυτοί είναι ο κερκοφόρος (προς τα άνω) και ο τετράπλευρος (προς τα κάτω). Στην οπίσθια επιφάνεια οι λοβοί

διαχωρίζονται από το φλεβώδη σύνδεσμο και τον στρογγύλο σύνδεσμο του ήπατος. Η εγκάρσια σχισμή χωρίζει τον κερκοφόρο από τον τετράπλευρο λοβό και η δεξιά οβελιαία αύλακα, που υποδέχεται τη διερχόμενη κάτω κοίλη φλέβα, χωρίζει αυτούς τους δύο λοβούς από τον δεξιό λοβό του ήπατος. Κάθε λοβός αποτελείται από λόβια, από το κέντρο των οποίων διέρχεται μια φλέβα που καταλήγει στις τρεις ηπατικές φλέβες, και μεταφέρει το αίμα έξω από το ήπαρ. Στην επιφάνεια των λοβίων διέρχονται χοληφόρα, φλέβες και αρτηρίες που μεταφέρουν υγρά από και προς αυτά^{1,7}.

Σύνδεσμοι του ήπατος: Το μεγαλύτερο μέρος του ήπατος περιβάλλεται από περιτόναιο εκτός από τμήμα του οπίσθιου μέρους της κάτω επιφάνειας που έρχεται σε άμεση επαφή με το τερόντιο κέντρο του διαφράγματος. Οι ανακάμψεις του περισπλάχνιου πετάλου του περιτοναίου γύρω από την γυμνή επιφάνεια του ήπατος αποτελούν το πρόσθιο και το οπίσθιο πέταλο του στεφανιαίου συνδέσμου. Τα δύο πέταλα συναντώνται στα δύο άκρα τους και αποτελούν το δεξιό και τον αριστερό τρίγωνο σύνδεσμο του ήπατος. Το πρόσθιο πέταλο του στεφανιαίου συνδέσμου περίπου στη μεσότητα του ανακάμπτει προς τα εμπρός και σχηματίζει το δρεπανοειδή σύνδεσμο, που διαιρεί τη διαφραγματική επιφάνεια του ήπατος σε δεξιό και αριστερό λοβό. Ο δρεπανοειδής σύνδεσμος παρουσιάζει ένα ελεύθερο χείλος που προσφύεται στο κοιλιακό τοίχωμα μέχρι τον ομφαλό και περιέχει τον στρογγύλο σύνδεσμο που είναι η αποφραχθείσα ομφαλική φλέβα του εμβρύου. Το οπίσθιο πέταλο του στεφανιαίου συνδέσμου ανακάμπτει σχηματίζοντας τον ήπατονεφρικό σύνδεσμο^{1,2,7}.

Το ήπαρ χαρακτηρίζεται και από τη λειτουργική ανατομική του. Ο ηπατικός πόρος, η αρτηρία και η φλέβα χωρίζονται σε δεξιό και αριστερό κλάδο και τα τμήματα του ήπατος που δέχονται αυτούς τους κλάδους συνιστούν το δεξιό και αριστερό λοβό του ήπατος αντίστοιχα. Ο δεξιός λοβός διαιρείται περαιτέρω σε πρόσθιο (δεξιό πλάγιο) και οπίσθιο (δεξιό παράμεσο) τμήμα από

τη δεξιά ηπατική φλέβα. Ο αριστερός λοβός διαιρείται σε μέσο (αριστερό παράμεσο) και πλάγιο (αριστερό πλάγιο) τμήμα από την αριστερή ηπατική φλέβα. Το μέσο τμήμα ονομάζεται επίσης τετράπλευρος λοβός. Στο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα κατά Couinaud (ή γαλλικό) οι λειτουργικοί λοβοί χωρίζονται περαιτέρω σε ένα σύνολο οχτώ τμημάτων..



Εικόνα 4: Ανατομία ήπατος

Ο κερκοφόρος λοβός αποτελεί μια ξεχωριστή δομή που δέχεται αίμα και από τους δύο αγγειακούς κλάδους, δεξιό και αριστερό. Συγκεκριμένα ο κερκοφόρος λοβός αποτελεί το τμήμα I, ο αριστερός λοβός αποτελείται από τα τμήματα II και III, ενώ ο τετράπλευρος λοβός και ο υπόλοιπος δεξιός λοβός αποτελείται από τα τμήματα V, VI, VII και VIII^{2,3}.

Αγγείωση: Το ήπαρ έχει διπλή αιματική παροχή, λαμβάνει αίμα τόσο από την πυλαία φλέβα όσο και από την ηπατική αρτηρία. Η πυλαία φλέβα, που παρέχει περίπου το 75% της αιματικής

παροχής στο ήπαρ, μεταφέρει φλεβικό αίμα από τον σπλήνα και από το γαστρεντερικό σωλήνα και το σύνολο των επιμέρους οργάνων που τον αποτελούν. Η ηπατική αρτηρία συνεισφέρει το υπόλοιπο 25% της αιματικής παροχής και μεταφέρει αρτηριακό αίμα στο ήπαρ. Οξυγόνο παρέχεται και από τις δύο πηγές αιμάτωσης. Οι απαιτήσεις σε οξυγόνο καλύπτονται περίπου εξ ημισίας από την πυλαία φλέβα και την ηπατική αρτηρία. Το αίμα περνά διαμέσου των κολποειδών τριχοειδών και διοχετεύεται στο κεντρικό φλεβίδιο κάθε λοβίου. Τα κεντρικά φλεβίδια ενώνονται, σχηματίζοντας τελικά τις τρεις ηπατικές φλέβες, οι οποίες και εγκαταλείπουν το ήπαρ^{1,2,3}.

Χοληφόρο σύστημα: Ο όρος χοληφόρο δέντρο οφείλεται στις διακλαδώσεις σαν δέντρου των χοληφόρων οδών. Η χολή που παράγεται στο ήπαρ, συλλέγεται στα χοληφόρα σωληνάκια, τα οποία συνενώνονται για να σχηματίσουν τους χοληφόρους πόρους. Μέσα στο ήπαρ αυτοί οι πόροι ονομάζονται ενδοηπατικοί χοληφόροι πόροι, ενώ όταν εξέλθουν από αυτό αναφέρονται ως εξωηπατικοί. Οι ενδοηπατικοί πόροι τελικά αποχετεύονται στο δεξιό και αριστερό ηπατικό πόρο, οι οποίοι συνενώνονται για να σχηματίσουν τον κοινό ηπατικό πόρο. Ο κυστικός πόρος που προέρχεται από τη χοληδόχο κύστη συμβάλλει με τον κοινό ηπατικό για να σχηματίσει τον κοινό χοληδόχο πόρο. Η χολή είναι δυνατόν είτε να αποχετευτεί κατευθείαν στο δωδεκαδάκτυλο μέσω του κοινού χοληδόχου πόρου είτε να αποθηκευτεί προσωρινά στη χοληδόχο κύστη μέσω του κυστικού πόρου. Ο κοινός χοληδόχος πόρος και ο παγκρεατικός πόρος εκβάλλουν μαζί στο δεύτερο τμήμα του δωδεκαδάκτυλου, στο φύμα του Vater^{3,6}.

2.2 Φυσιολογία του Ήπατος

Το ήπαρ είναι ο μεγαλύτερος αδένας του σώματος και επιτελεί ένα μεγάλο αριθμό λειτουργιών. Οι τρεις κυριότερες λειτουργικές κατηγορίες είναι (1) η παραγωγή και απέκκριση της χολής, η οποία φέρεται στον εντερικό σωλήνα, (2) η συμμετοχή σε πολλές μεταβολικές λειτουργίες, που αφορούν στο μεταβολισμό του λίπους, των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων, και (3) τη διήθηση του αίματος και την απαλλαγή του από μικρόβια και άλλα ξένα σώματα, που εισήλθαν από τον αυλό του γαστρεντερικού σωλήνα^{4,5}.

Ειδικότερα παρατίθενται κάποιες από τις σημαντικές λειτουργίες στις οποίες συμμετέχει το ήπαρ:

Παραγωγή και έκκριση χολής: Η σημαντικότερη λειτουργία του ήπατος όσον αφορά το γαστρεντερικό σωλήνα είναι η παραγωγή και έκκριση της χολής. Η παραγομένη ποσότητα από το ήπαρ είναι περίπου 500ml την ημέρα. Τα ηπατοκύτταρα παράγουν χολή μέσα στα χοληφόρα τριχοειδή, χρησιμοποιώντας χολικά οξέα, χοληστερόλη, λεκιθίνες και χολικές χρωστικές, συστατικά τα οποία συντίθενται από τα ηπατοκύτταρα. Τα συστατικά αυτά απεκκρίνονται στα χοληφόρα σωληνάκια, τα οποία με τη σειρά τους συγκλίνουν σε ακόμη μεγαλύτερους πόρους και, τελικά, σε ένα μόνο μεγάλο χοληφόρο πόρο. Η χολή, δηλαδή, συλλέγεται στο σύστημα των χοληφόρων και τελικά εκκρίνεται στο δωδεκαδάκτυλο μέσω του χοληδόχου πόρου. Ο κύριος ρόλος της χολής είναι η μετατροπή μη διαλυτών ουσιών της διατροφής σε υδατοδιαλυτές ενώσεις οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να απορροφηθούν από το γαστρεντερικό σύστημα^{4,5}.

Ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων: Το ήπαρ αποτελεί σημαντική αποθήκη γλυκογόνου στο σώμα. Είναι όργανο με ουσιώδη σημασία στη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης του οργανισμού. Τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης αίματος προκαλούν αποθήκευση

γλυκογόνου στο ήπαρ, ενώ τα χαμηλά επίπεδα γλυκόζης προκαλούν τη διάσπαση του γλυκογόνου του ήπατος και απελευθέρωση γλυκόζης στο αίμα^{3,4}. Επίσης, το ήπαρ αποτελεί την κύρια θέση όπου λαμβάνει χώρα η γλυκονεογένεση, δηλαδή η μετατροπή των αμινοξέων, των λιπών ή των απλών υδατανθράκων σε γλυκόζη. Στο ήπαρ, τέλος, μεταβολίζεται το γαλακτικό οξύ διαμέσου του κύκλου του Cori με τελικό αποτέλεσμα τη διατήρηση της παροχής γλυκόζης στην περιφέρεια σε συνθήκες που προάγουν τον αναερόβιο μεταβολισμό (υποξία).

Ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπών: Το ήπαρ έχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων. Συμμετέχει στη σύνθεση λιποπρωτεϊνών και τριγλυκεριδίων, ενώ τα ηπατοκύτταρα είναι η κύρια πηγή χοληστερόλης στο ανθρώπινο σώμα και η κύρια θέση απέκκρισής της. Επίσης, το ήπαρ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη γλυκονεογένεση από τα λιπαρά οξέα και στο μεταβολισμό της χοληστερόλης^{3,4}.

Ρύθμιση του μεταβολισμού των πρωτεϊνών: Το ήπαρ συμμετέχει με σημαντικό ρόλο και στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών. Η διάσπαση των πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή αμμωνίας, που δε μπορεί να μεταβολισθεί από την πλειονότητα των ιστών και η οποία είναι τοξική για τον ανθρώπινο οργανισμό. Στο ήπαρ πραγματοποιείται μετατροπή της αμμωνίας σε ουρία, η οποία και απεκκρίνεται με τα ούρα. Επίσης αξίζει να αναφερθεί ότι στο όργανο αυτό λαμβάνει χώρα η σύνθεση των μη απαραίτητων αμινοξέων καθώς επίσης και η σύνθεση όλων των κύριων πρωτεϊνών του πλάσματος συμπεριλαμβανομένων των λιποπρωτεϊνών, των αλβουμινών, των σφαιρινών, του ινωδογόνου και άλλων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην πήξη του αίματος^{3,4}.

Αποθήκευση βιταμινών και σιδήρου: Στο ήπαρ αποθηκεύονται ορισμένες βιταμίνες, μεταξύ των οποίων η A, η D και η B12. Τα αποθέματα των βιταμινών αυτών στο ήπαρ

χρησιμοποιούνται από τον οργανισμό ως προστασία στις περιπτώσεις εκείνες που υπάρχει μειωμένη πρόσληψη με τη διατροφή. Επίσης, το ήπαρ αποτελεί το δεύτερο πιο σημαντικό αποθηκευτικό χώρο σιδήρου μετά την αιμοσφαιρίνη^{3,4}.

Διάσπαση ορμονών, απενεργοποίηση και απέκκριση φαρμάκων και τοξινών: Το ήπαρ μετασχηματίζει και απεκκρίνει μεγάλο αριθμό φαρμάκων και τοξινών. Οι ουσίες αυτές μετατρέπονται σε ανενεργές μορφές μέσω αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στα ηπατοκύτταρα. Τα τελευταία περιλαμβάνουν ένζυμα που πραγματοποιούν χημικές μετατροπές πολλών ουσιών ή καταλύουν τη σύζευξή τους με γλυκουρονικό οξύ, γλυκίνη ή γλουταθειόνη. Οι μετατροπές αυτές έχουν ως τελικό αποτέλεσμα τη μετατροπή των ουσιών αυτών σε υδατοδιαλυτές και ευκολότερα απεκκρίσιμες από τους νεφρούς^{3,4}.

Καρκίνος του παχέος εντέρου

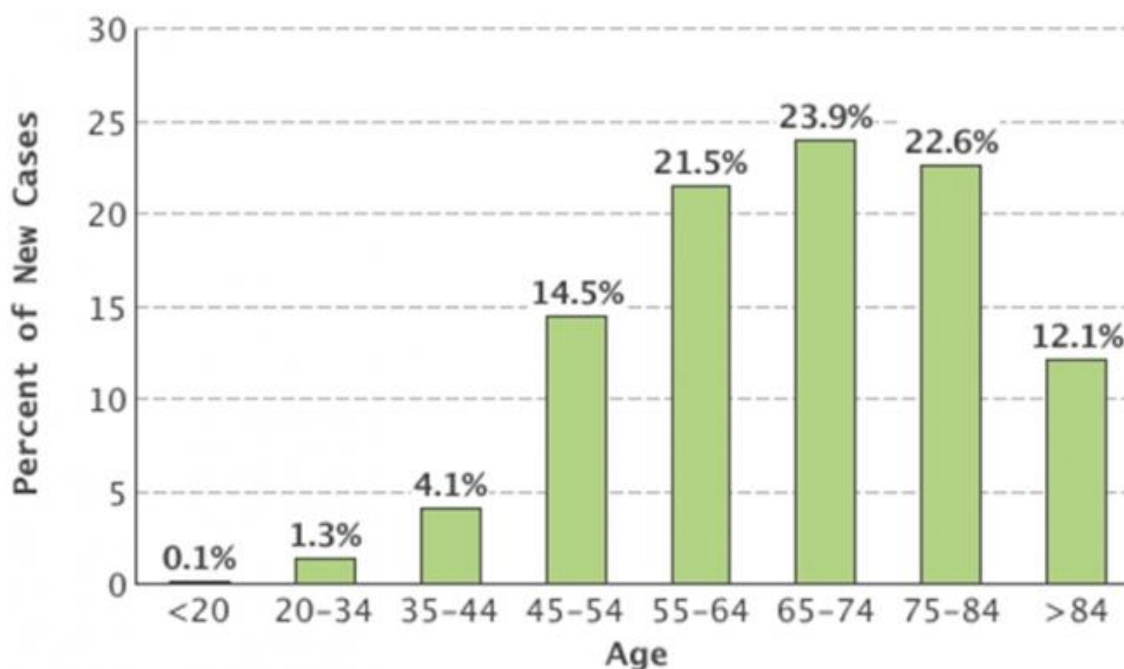
3.1 Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ο τρίτος πιο συχνός κακοήθης όγκος και η τρίτη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο στον κόσμο μετά από τον καρκίνο των πνευμόνων και του μαστού. Εκτιμάται ότι περίπου 132.700 νέες περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου διαγιγνώσκονται ετησίως στις Ηνωμένες Πολιτείες, 93.090 περιπτώσεις παχέος εντέρου και 39,610 καρκίνου του ορθού^{8,9}. Αν και η θνησιμότητα του ορθοκολικού καρκίνου στις ΗΠΑ έχει μειωθεί σταδιακά από το 1990 σε ποσοστό περίπου 3% ετησίως, το οποίο οφείλεται κατά κύριο λόγο στην εισαγωγή προγραμμάτων προσυμπτωματικού ελέγχου με κολonosκόπηση, η επίπτωσή του στις περισσότερες δυτικές χώρες είναι σταθερή ή αυξάνεται ελαφρώς κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Αντίθετα, τα ποσοστά του αυξήθηκαν ραγδαία σε πολλές περιοχές και σε κράτη που ιστορικά είχαν χαμηλό κίνδυνο, συμπεριλαμβανομένης της Ισπανίας, αλλά και σε άλλες χώρες της Ανατολικής Ασίας και Ανατολικής Ευρώπης^{10,11}.

Γεωγραφικές διαφορές καταγράφονται παγκοσμίως και όσον αφορά τη συνολική επιβίωση από τη νόσο, με το μεγαλύτερο ποσοστό 5ετούς επιβίωσης να καταγράφεται στις ΗΠΑ (61%) και το μικρότερο στην Κίνα (32%)⁹. Η βελτίωση αυτή του προσδόκιμου επιβίωσης στο Δυτικό κόσμο μπορεί να αποδοθεί στην ευρεία εφαρμογή στο γενικό πληθυσμό προγραμμάτων προσυμπτωματικού ελέγχου αλλά και στη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα των συμπληρωματικών θεραπειών, με την ανακάλυψη και κλινική εφαρμογή δραστικότερων χημειοθεραπευτικών σχημάτων^{9,10}.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι σπάνιος πριν την ηλικία των 40 ετών και η επίπτωσή του αυξάνεται προοδευτικά μεταξύ 40 και 50 ετών, γίνεται δε πολύ μεγαλύτερη για κάθε δεκαετία

στη συνέχεια. Η νόσος παρουσιάζεται με αυξημένη επίπτωση στους άνδρες (αναλογία ανδρών/γυναικών για καρκίνο παχέος εντέρου 1,2:1 και αναλογία ανδρών/γυναικών για καρκίνο ορθού 1,8:1)^{9,10}. Ο μέσος κίνδυνος εμφάνισης ορθοκολικού καρκίνου σε όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου είναι 5% και το 90% των περιπτώσεων εμφανίζονται μετά την ηλικία των 50 ετών.



Εικόνα 5: Η συχνότητα του καρκίνου παχέος εντέρου από SEER 18 2008-2012, (All Races, Both Sexes). Παρουσιάζονται τα νέα περιστατικά ανά ηλικιακή ομάδα. Μέση ηλικία κατά τη διάγνωση είναι τα 68 έτη

Σημαντικό στοιχείο επίσης είναι η παρατήρηση ότι από το 1998 μέχρι σήμερα, καταγράφεται διεθνώς μια σταδιακή αύξηση του καρκίνου του παχέος εντέρου κεντρικότερα από την σπληνική καμπή και ιδιαίτερα στο τυφλό, το οποίο αποτελεί πλέον τη θέση εμφάνισης για το 55% του συνόλου των περιπτώσεων^{11,12}. Η αλλαγή αυτή στην ανατομική κατανομή του ορθοκολικού καρκίνου μπορεί σε κάποιο βαθμό να αποδοθεί στη βελτίωση των μεθόδων διάγνωσης, αλλά μπορεί να αντανακλά και σε μια πραγματική αύξηση της επίπτωσης του καρκίνου του ανιόντος

κόλου και του τυφλού. Η κολονοσκόπηση είναι πιο αποτελεσματική στην πρόληψη του καρκίνου του αριστερού τμήματος του παχέως εντέρου και θα μπορούσε να είναι μια αιτία της αλλαγής αυτής. Είναι πιθανό ότι μέρος της αποτελεσματικότητας αυτής, οφείλεται σε τεχνικά στοιχεία της κολονοσκόπησης (κακή προετοιμασία του δεξιού κόλου, ελλιπής κολονοσκόπηση, ανατομικές ιδιαιτερότητες του δεξιού κόλου που μειώνουν την ορατότητα) αλλά υπάρχει επίσης και διαφορά στη βιολογία καθώς και στους κυτταρικούς μηχανισμούς της νόσου αυτής στα διάφορα τμήματα του παχέως εντέρου που συμβάλλει σε αυτή τη διαφορά στην επίπτωση. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι οδοντωτοί πολύποδες (οδοντωτά αδενώματα, serrated adenomas) οι οποίοι είναι δυσκολότερο να εντοπιστούν ενδοσκοπικά λόγω του επίπεδου σχήματος. Οι πολύποδες αυτοί έχουν χαρακτηριστικά μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF V600E, μεταλλάσσονται σε ορθοκολικό καρκίνο με μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability) και η συχνότητα τους είναι μεγαλύτερη στο δεξίο κόλον.

3.2 Παράγοντες κινδύνου

Ηλικία: Υπάρχει αύξηση στην επίπτωση του ορθοκολικού καρκίνου με την αύξηση της ηλικίας^{13,14}.

Κληρονομικά σύνδρομα: Υπάρχουν μερικές ειδικές γενετικές διαταραχές, οι περισσότερες των οποίων κληρονομούνται με τον αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα και συνδέονται με πολύ υψηλό κίνδυνο για ορθοκολικό καρκίνο, αποτελούν όμως λιγότερο από το 5% των περιπτώσεων του καρκίνου του παχέως εντέρου. Τα γενετικά αυτά σύνδρομα είναι η οικογενής πολυποδίαση (Familial adenomatous polyposis (FAP)) και οι παραλλαγές της (το Gardner's syndrome, το Turcot's syndrome, και η attenuated familial adenomatous polyposis), το

σύνδρομο MAP (MUTYH-associated polyposis) και το σύνδρομο Lynch (κληρονομικός μη πολυποειδικός καρκίνος παχέως εντέρου (HNPCC))^{8,17}.

Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στο σύνδρομο οικογενούς πολυποδίασης (FAP). Είναι το πλέον συχνό σύνδρομο πολυποδίασης, μεταδιδόμενο κατά τον επικρατούντα αυτοσωματικό χαρακτήρα. Χαρακτηρίζεται από πρόωρη εκδήλωση εκατοντάδων έως και χιλιάδων αδενωματοδών πολυπόδων καθ'όλη την έκταση του εντέρου. Εάν οι ασθενείς παραμείνουν χωρίς θεραπεία, αναπτύσσεται ορθοκολικός καρκίνος φθάνοντας στην ηλικία των 35-40 ετών. Επιπροσθέτως, υπάρχει ο κίνδυνος αναπτύξεως και άλλων κακοηθειών.

Η γενετική ανωμαλία της νόσου εντοπίζεται στη γενετική μετάλλαξη του APC γονιδίου. Το APC γονίδιο είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο εντοπιζόμενο στη περιοχή 5q21. Η λειτουργία του δεν είναι τελείως κατανοητή, αλλά έχειδειχθεί ότι παίζει ρόλο στη διάταξη των χρωμοσωμάτων κατά την κυτταρική διαίρεση στη μετάφαση. Φυσιολογικά οι APC πρωτεΐνες προάγουν την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων του κόλου. Η πλέον σπουδαία λειτουργία της είναι η απομόνωση της διεγερτικής επίδρασης της β-κατενίνης στον όγκο, μία πρωτεΐνη η οποία με τη μεταγραφή της ενεργοποιεί τα σχετιζόμενα με την ανάπτυξη γονίδια σε συνδυασμό με παράγοντες ιστικής κωδικοποίησης.

Μεταλλάξεις του APC γονιδίου καταλήγουν σε ακρωτηριασμένη μη λειτουργική πρωτεΐνη. Η κατάληξη της απώλειας της APC λειτουργίας εμποδίζει (προλαμβάνει) την κυτταρική απόπτωση και επιτρέπει στη β-κατενίνη να συσσωρεύεται ενδοκυτταρίως και να διεγείρει την κυτταρική ανάπτυξη με επακόλουθο την ανάπτυξη αδενωμάτων.

Υπάρχουν πολλά σύνδρομα πολυποδίασεως του εντέρου, που κάποτε εθεωρούντο χωριστές κλινικές οντότητες. Σήμερα αποτελούν μέρος ή συνιστώσα του ίδιου φαινοτυπικού φάσματος

της νόσου FAP. Το σύνδρομο Gardner χαρακτηρίζεται απ'ότι και η κλασική μορφή FAP και επί πλέον από οστεώματα (ιδιαίτερα στα οστά του κρανίου και της κάτω γνάθου), οδοντικές ανωμαλίες και όγκους των μαλακών ιστών. Το σύνδρομο Turcot χαρακτηρίζεται απ'ότι και η κλασική μορφή FAP και από όγκους του ΚΝΣ (μυελοβλαστώματα).

Ατομικό ιστορικό καρκίνου παχέως εντέρου: Σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε εκτομή για ορθοκολικό καρκίνο αναπτύχθηκε μετάχρονος καρκίνος σε ποσοστό 1,5-3% εντός των πρώτων 5 μετεγχειρητικών ετών

Αδενωματώδεις πολύποδες: Το ατομικό ιστορικό μεγάλου (>1 cm) αδενωματώδους πολύποδα με λαχνωτή ή σωληνολαχνωτή ιστολογική εικόνα ή με υψηλού βαθμού δυσπλασία και ιδιαίτερα η ύπαρξη πολλαπλών πολυπόδων, αυξάνει το σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου περίπου κατά 3,5-6,5 φορές στους ασθενείς αυτούς, σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό¹⁸.

Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου παχέως εντέρου: Ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης ορθοκολικού καρκίνου σε άτομα που στο οικογενειακό τους περιβάλλον και σε 1ου βαθμού συγγενή διεγνώσθηκε αδενωματώδης πολύποδας ή ορθοκολικός καρκίνος, είναι περίπου 2 σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό. Ο κίνδυνος αυξάνεται περισσότερο εάν σε δύο 1ου βαθμού συγγενείς ανευρέθηκε ορθοκολικός καρκίνος ή εάν η νόσος διαγνώσθηκε σε ηλικία μικρότερη των 50-60 ετών. Έτσι μερικές χώρες προτείνουν στις κατευθυντήριες οδηγίες προσυμπτωματικού ελέγχου για τον καρκίνο του παχέως εντέρου, οι ασθενείς με τέτοιο ιστορικό να αρχίζουν τον έλεγχο στα 40 έτη^{14,15}.

Φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου:

1. Ελκώδης κολίτιδα: Ο αυξημένος κίνδυνος (5-15 φορές) ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου παρατηρείται 10 χρόνια μετά την αρχική διάγνωση της νόσου στις περιπτώσεις εκείνες που

πρόκειται για πανκολίτιδα και 15-20 χρόνια μετά την αρχική διάγνωση της νόσου σε περιπτώσεις τμηματικής προσβολής (συνήθως στο αριστερό κόλον) του παχέος εντέρου (3 φορές αυξημένος κίνδυνος για αριστερή νόσο)¹⁹. Η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου αυξάνεται με τη συνολική διάρκεια της νόσου καθώς και στους ασθενείς με ενεργό φλεγμονή με τελικό αποτέλεσμα κατά την τέταρτη δεκαετία της νόσου η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου να φτάνει στο 30% σε ασθενείς με πανκολίτιδα. Ο κίνδυνος δεν φαίνεται να αυξάνεται αισθητά με την πρωκτίτιδα ή με την νόσο γενικά του περιφερικού παχέος εντέρου-ορθού. Η επίπτωση του ορθοκολικού καρκίνου ανέρχεται περίπου στο 0,5% ανά έτος για ασθενείς με διάρκεια νόσου μεταξύ 10 και 20 ετών και στο 1% για κάθε έτος μετά την 20ετία. Η συνύπαρξη ελκώδους κολίτιδας και σκληρυντικής χολαγγειίτιδας αυξάνει ακόμη περισσότερο το σχετικό κίνδυνο¹⁹.

2. Νόσος Crohn: Αν και μέχρι σήμερα υπάρχουν λιγότερα στοιχεία για τη συσχέτιση της νόσου Crohn με τον καρκίνο του παχέος εντέρου φαίνεται πως σχετίζεται με παρόμοιο σχετικό κίνδυνο για ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου, όπως και η ελκώδης κολίτιδα ειδικά όταν πρόκειται περί πανκολίτιδας. Αν και οι συστάσεις ποικίλλουν, προτείνεται διαδικασία επιτήρησης τουλάχιστον όταν ποσοστό μεγαλύτερο από το 33% (1/3) του βλεννογόνου του παχέος εντέρου συμμετέχει στην νόσο¹⁹.

Προηγηθείσα ακτινοβολία στην περιοχή της πυέλου: Σχετίζεται με υψηλότερη επίπτωση ορθοκολικού καρκίνου μετά από διάστημα 5-10 ετών από την εφαρμογή της ακτινοβολίας. Ενήλικες επιζώντες κακοήθειας παιδικής ηλικίας οι οποίοι έλαβαν ακτινοβολία στην κοιλιακή χώρα διατρέχουν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης στην ενήλικη ζωή γαστρεντερικών νεοπλασμάτων και η πλειονότητα από αυτά είναι ορθοκολικός καρκίνος. Οι κατευθυντήριες οδηγίες από ομάδες εξειδικευμένων στην Ογκολογία Παίδων συστήνουν κολονοσκόπηση κάθε 5 χρόνια για τους επιζώντες του καρκίνου παιδικής ηλικίας που έλαβαν 30 Gy ή περισσότερα στην

κοιλιακή χώρα, με έναρξη 10 χρόνια μετά από την ακτινοβολία ή σε ηλικία 35 ετών, εφόσον αυτό είναι μεταγενέστερο^{16,17}.

Παχυσαρκία: Είναι παράγοντας κινδύνου για καρκίνο του παχέος εντέρου και πιο συγκεκριμένα οι παχύσαρκοι ασθενείς (BMI > 30) εμφανίζουν 1,5 φορές αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου σε σχέση με αυτούς που έχουν φυσιολογικό σωματικό βάρος. Μια συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση των δεδομένων από 13 μελέτες ανέφεραν ότι η αύξηση του σωματικού βάρους μεταξύ της πρώιμης ενήλικης ζωής και της μέσης ηλικίας συσχετίστηκε με μια μικρή αλλά σημαντική αύξηση του κινδύνου καρκίνου του παχέος εντέρου (αναλογία κινδύνου [HR] 1.23, 95% CI 1.14-1.34). Η αναλογία κινδύνου για αύξηση του σωματικού βάρους μεταξύ μέσης ηλικίας και μεγάλης ηλικίας ήταν χαμηλότερη, αλλά εξακολουθεί να είναι στατιστικά σημαντική (HR 1.15, 95% CI 1.08-1,24)^{20,21}. Ο κίνδυνος ήταν υψηλότερος για εκείνους τους ασθενείς που βρίσκονταν στην ανώτερη κατηγορία σωματικού βάρους. Η παχυσαρκία φαίνεται επίσης να αυξάνει την πιθανότητα θανάτου από καρκίνο παχέος εντέρου, παρατήρηση η οποία οφείλεται εν μέρει και στο αυξημένο ποσοστό μετεγχειρητικών επιπλοκών που συμβαίνει στους ασθενείς αυτούς^{20,21}.

Σακχαρώδης Διαβήτης: Αυξανόμενα στοιχεία συγκλείνουν στη συσχέτιση του σακχαρώδη διαβήτη με αυξημένο κίνδυνο ορθοκολικού καρκίνου. Ο σχετικός κίνδυνος στους διαβητικούς ασθενείς είναι 1,30 και αποδίδεται στην υπερινσουλιναίμια²². Η ινσουλίνη είναι η ορμόνη που βοηθά το μεταβολισμό του σακχάρου, αλλά ταυτοχρόνως έχει και αναβολικές δράσεις (μέσω του IGF). Η ινσουλίνη βοηθά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και ο καρκίνος οφείλεται στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, οπότε υπάρχει και προφανής συσχέτιση. Επίσης μελέτες για τη μοριακή εξήγηση της συσχέτισης του σακχαρώδη διαβήτη με τον καρκίνο του παχέος εντέρου κατέληξαν στο ότι όταν τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα είναι υψηλά (δηλαδή

κάποιος έχει διαβήτη) ενεργοποιείται ένα γονίδιο που λέγεται TCF. Το γονίδιο αυτό με τη σειρά του επιδρά στο ογκογονίδιο p53 και η αλληλουχία αυτών των γεγονότων οδηγεί στην καρκινογένεση. Η χρόνια θεραπεία με ινσουλίνη μπορεί επίσης να αυξήσει τον κίνδυνο καρκίνου του παχέος εντέρου στους διαβητικούς ασθενείς, καθώς διαπιστώθηκε κίνδυνος σχετιζόμενος με την ηλικία και το φύλο 2,1 φορές μεγαλύτερος σε ασθενείς που λαμβάνουν ινσουλίνη πάνω από 1 έτος. Μια μετα-ανάλυση 14 μελετών εκτιμά ότι ο κίνδυνος καρκίνου του παχέος εντέρου μεταξύ των διαβητικών ήταν περίπου 38% υψηλότερος από ό, τι σε μη διαβητικούς (σχετικός κίνδυνος [RR] 1.38, 95% CI 1.26-1,51), και για καρκίνο του ορθού ήταν 20% υψηλότερος (RR 1.20, 95% CI 1,09-1.31)^{16,17,22}.

Η μακροχρόνια κατανάλωση κόκκινου ή τυποποιημένου κρέατος: Η κατανάλωση αυτού του είδους κρέατος έχει ιδιαίτερη σημασία για την εμφάνιση όγκων στο αριστερό κόλο. Το 2015, η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ, WHO) επεξεργάστηκε νέα στοιχεία που συνδέουν την πρόσληψη κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος με τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Σύμφωνα με μεγάλο αριθμό μελετών και το συνεχές εύρημα της συσχέτισης του καρκίνου του παχέος εντέρου με επεξεργασμένα κρέατα σε όλες τις μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς, οι ειδικοί κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι πρέπει η κοινωνία να ταξινομήσει τα επεξεργασμένα κρέατα (π.χ., λουκάνικα, μπέικον, ζαμπόν, καπνιστό η παστό βόειο κρέας, corned beef, και άλλα καπνιστά η αλατισμένα που έχουν υποστεί ζύμωση, ή διάφορες επεξεργασίες) ως καρκινογόνες ουσίες ομάδας 1, τοποθετώντας τα τρόφιμα αυτά στην ίδια κατηγορία κινδύνου για τον καρκίνο με τον αμιάντο, τα τσιγάρα και το αλκοόλ. Η συσχέτιση αυτή αμφισβητήθηκε από άλλες μελέτες λόγω του πολυπαραγοντικού μοντέλου σύγκρισης των αποτελεσμάτων το οποίο είχε ως συνέπεια οι συστάσεις της ΠΟΥ για την καρκινογένεση από την κατανάλωση κόκκινου κρέατος

(δηλαδή, βόειο κρέας, χοιρινό, αρνί, μοσχάρι, πρόβειο κρέας, άλογο, κατσίκι) είναι να ταξινομούνται ως ομάδας 2α καρκινογόνες ουσίες (δηλαδή ουσίες με πιθανή συσχέτιση)²³.

Κάπνισμα: Το κάπνισμα έχει συσχετιστεί με αυξημένη συχνότητα και θνησιμότητα από ορθοκολικό καρκίνο. Το κάπνισμα είναι επίσης ένας παράγοντας κινδύνου για ουσιαστικά όλα τα είδη των πολυπόδων του παχέος εντέρου²⁴.

Αλκοόλ: Κατανάλωση περισσότερων από 45gr οινοπνεύματος ημερησίως, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο (περίπου 1,45) ανάπτυξης καρκίνου παχέος εντέρου, γεγονός που αποδίδεται σε πλημμελή πρόσληψη ή δυσαπορρόφηση του φυλλικού οξέος^{24,26}.

3.3 Κλινική Εικόνα

Σε πρώιμο στάδιο δεν υπάρχουν ειδικά κλινικά συμπτώματα τα οποία μπορούν να θέσουν με ακρίβεια τη διάγνωση και αυτοί οι ασθενείς μπορούν να διαγνωστούν μόνο αν συμμετέχουν σε προγράμματα προσυμπτωματικού ελέγχου. Τα συμπτώματα της νόσου παρουσιάζονται συνήθως λόγω της αύξησης του όγκου εντός του αυλού του οργάνου, η λόγω επέκτασης σε άλλα ενδοκοιλιακά ή απομακρυσμένα όργανα, και ως εκ τούτου, η συμπτωματική εκδήλωση του, ισοδυναμεί συνήθως με σχετικά προχωρημένη νόσο^{5,6}.

Διακρίνουμε συνοπτικά τρεις τρόπους με τους οποίους μπορεί να εκδηλωθεί ο καρκίνος του παχέως εντέρου, δηλαδή:

1. Με ύποπτα σημεία και συμπτώματα
2. Σε ασθενείς που υποβάλλονται σε τυχαίο η προσυμπτωματικό έλεγχο και οι οποίοι έχουν μεσαίο ή υψηλό κίνδυνο

3. Ως επείγουσα κατάσταση η οποία μπορεί να εκδηλωθεί με εντερική απόφραξη, περιτονίτιδα ή σπάνια, με οξεία αιμορραγία πεπτικού.

Τα τυπικά συμπτώματα που συνδέονται με ορθοκολικό καρκίνο και οφείλονται στην ανάπτυξη του όγκου είναι: η αιματοχεσία ή μέλαινες κενώσεις, το κοιλιακό άλγος, η ανεξήγητη σιδηροπενική αναιμία, οι αλλαγές στις συνήθειες του εντέρου και η απώλεια βάρους. Λιγότερο συχνά συμπτώματα είναι η κοιλιακή διάταση, η ναυτία και ο έμετος, που μπορεί να είναι δείκτες απόφραξης.

Η αιματοχεσία είναι πιο συχνή στον καρκίνο του ορθού και του σιγμοειδούς, παρά του λοιπού κόλου. Η λανθάνουσα αιμορραγία εξαρτάται από τη θέση αλλά όχι και από το στάδιο του καρκίνου. Όγκοι που αναπτύσσονται στο τυφλό και το ανιόν κόλον χαρακτηρίζονται από τετραπλάσια ημερήσια απώλεια αίματος (9 ml/ημέρα) έναντι όγκων σε άλλες θέσεις. Τέλος, η σιδηροπενική αναιμία οδηγεί στην αποκάλυψη ορθοκολικού καρκίνου συνήθως σε προχωρημένο στάδιο^{5,6,7}.

Το κοιλιακό άλγος μπορεί να οφείλεται σε επεισόδια ατελούς εντερικής απόφραξης, περιτοναϊκή διασπορά ή σε σπάνιες περιπτώσεις, διάτρηση εντέρου και συνοδό γενικευμένη περιτονίτιδα. Ακόμα ένα σύμπτωμα που μπορεί να παρουσιάζει η νόσος, ο τεινεσμός μπορεί να οφείλεται σε διήθηση των μυών του εδάφους της πυέλου ή σε διήθηση του ισχιακού και του θυρεοειδούς νεύρου σε περιπτώσεις τοπικά εκτεταμένης νόσου.

Αλλαγή των εντερικών συνηθειών παρατηρείται συνήθως σε όγκους του αριστερού κόλου. Αντίθετα με τους όγκους του δεξιού κόλου που έχουν την τάση να σχηματίζουν πολύποδες ή να αναπτύσσονται ταχέως, οι όγκοι του αριστερού κόλου αναπτύσσονται συνήθως κυκλοτερώς ή δακτυλιοειδώς, προκαλώντας μείωση της διαμέτρου του εντερικού αυλού με συνέπεια

δυσκοιλιότητα, διάρροια ή εντερική απόφραξη, ενώ περιγράφεται ως σύμπτωμα των όγκων του ορθού και η μείωση της διαμέτρου των κοπράνων^{5,6}.

Στις σπάνιες κλινικές εκδηλώσεις του καρκίνου του παχέος εντέρου ανήκουν:

1. η τοπική διήθηση και περιορισμένη διάτρηση προς γειτονικά όργανα όπως η ουροδόχος κύστη (με συνέπεια πνευματουρία: έξοδος αέρα κατά την ούρηση) ή το λεπτό έντερο και η δημιουργία συριγγίου,
2. ο πυρετός αγνώστου αιτιολογίας και
3. ο σχηματισμός ενδοκοιλιακών, οπισθοπεριτοναϊκών ή τοιχωματικών αποστημάτων. Η ύπαρξη των αποστημάτων αυτών κάνει δύσκολη αν όχι αδύνατη τη διαφοροδιάγνωση του από την εκκολπωματίτιδα.

Βακτηραιμία ή/και σηψαιμία από στρεπτόκοκκο ή κλωστηρίδιο μπορεί να οφείλονται σε υποκείμενη κακοήθεια του παχέος εντέρου σε ένα 10-25% των ασθενών. Ο ορθοκολικός καρκίνος αποτελεί το 6% των αδενοκαρκινωμάτων αγνώστου πρωτοπαθούς προέλευσης και τέλος μπορεί να διαγνωσθεί τυχαία από την ανεύρεση ηπατικών μεταστάσεων που ανευρέθηκαν τυχαία κατά τη διάρκεια απεικονιστικών εξετάσεων για άλλους λόγους (πχ χολολιθίαση).

3.4 Διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου

Η διάγνωση της νόσου επιτυγχάνεται κατόπιν απεικόνισης του εντερικού αυλού είτε σε ασθενείς με τουλάχιστον ένα από τα προαναφερθέντα συμπτώματα (σε συμπτωματικούς ασθενείς) είτε σε ασυμπτωματικούς ασθενείς που υποβάλλονται σε προσυμπτωματικό έλεγχο. Οι πλέον

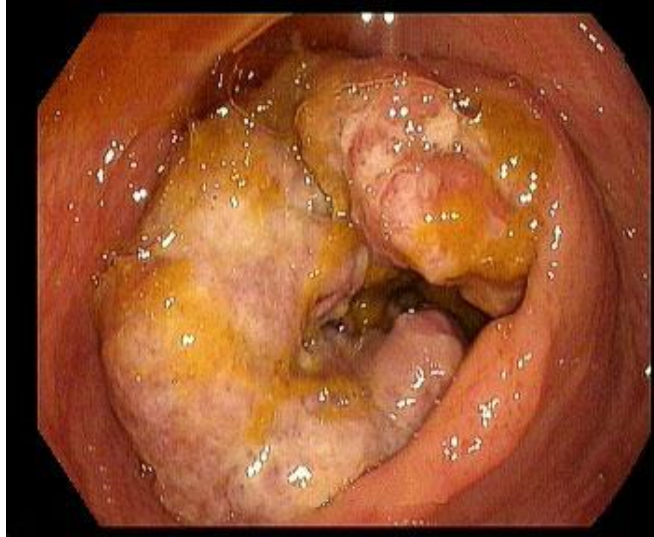
αξιόπιστες απεικονιστικές μέθοδοι που διατίθενται είναι κυρίως η κολονοσκόπηση και σε πολύ λιγότερο βαθμό ο βαριούχος υποκλυσμός (BY).

Κολονοσκόπηση

Αποτελεί την εξέταση εκλογής για τον έλεγχο του παχέος εντέρου τόσο σε συμπτωματικούς όσο και σε ασυμπτωματικούς ασθενείς. Εντοπίζει τις πρωτοπαθείς αλλά και τις σύγχρονες βλάβες κατά μήκος του παχέος εντέρου, ενώ προσφέρει τη δυνατότητα της αφαίρεση πολυπόδων καθώς επίσης και της λήψης βιοψιών. Είναι σημαντικό να εξετάζεται όλο το μήκος του παχέος εντέρου για την ανάδειξη πιθανόν σύγχρονων βλαβών, ενώ εάν μία κακοήθης απόφραξη αποκλείει την προεγχειρητική κολονοσκόπηση, αυτή θα πρέπει να πραγματοποιείται αργότερα, σε δεύτερο χρόνο.

Η συντριπτική πλειοψηφία των ορθοκολικών καρκίνων είναι ενδοαυλικές μάζες που προέρχονται από τον βλεννογόνο. Οι μάζες μορφολογικά μπορεί να είναι εξωφυτικές, πολυποειδείς ή επίπεδες . Κυκλοτερείς βλάβες έχουν ακτινολογική εικόνα (στο βαριούχο υποκλυσμό) ως επί «δαγκωμένου μήλου». Αιμορραγία μπορεί να δει κανείς σε εύθρυπτες, νεκρωτικές ή εξελκωμένες βλάβες.

Η μειοψηφία των νεοπλασματικών βλαβών του παχέος εντέρου (σε συμπτωματικούς και ασυμπτωματικούς ασθενείς) είναι σχετικά επίπεδες (nonpolypoid) και έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να υποκρύπτουν ορθοκολικό καρκίνου παχέος εντέρου. Καρκίνοι που δημιουργούνται σε τέτοια επίπεδα αδενώματα είναι δυσκολότερο να απεικονισθούν με την κολονοσκόπηση από τους καρκίνους που αναπτύσσονται σε πολυειδή αδενώματα, όμως και για αυτούς τους νεοπλασματικούς τύπους η κολονοσκόπηση είναι καλύτερη από το βαριούχο υποκλυσμό και από την CT-κολονοσκόπηση μια και υπάρχουν ειδικές τεχνικές για αυτό.



Εικόνα 6 : Καρκίνος παχέος εντέρου σε κολονοσκόπηση

Για ενδοσκοπικά ορατές αλλοιώσεις, οι μέθοδοι οι οποίοι ακολουθούνται από τους ενδοσκόπους για τη δειγματοληψία ιστών περιλαμβάνουν βιοψίες, βουρτσίσματα (κυτταρολογική, Brushing), και πολυποδεκτομή. Για βλάβες που αφαιρούνται εξολοκλήρου ενδοσκοπικά (με πολυποδεκτομή, ενδοσκοπική εκτομή του βλεννογόνου ή ενδοσκοπική υποβλεννογόνια εκτομή), το τατουάζ είναι σημαντικό, για τον εντοπισμό, τη διάγνωση και τη θεραπεία ακόμα και για την κολεκτομή. Τα τατουάζ συνήθως τοποθετούνται ακριβώς δίπλα ή μερικά εκατοστόμετρα περιφερικά της βλάβης, με σκοπό η θέση τους να υποβοηθεί το διεγχειρητικό εντοπισμό της βλάβης (ειδικότερα στις λαπαροσκοπικές κολεκτομές).

Μεταξύ ασυμπτωματικών ασθενών, η αποτυχία της κολονοσκόπησης να ανιχνεύσει τους πολύποδες ή ορθοκολικό καρκίνο είναι 2-6% και το ποσοστό αυτό αφορά κυρίως βλάβες του δεξιού τμήματος του παχέος εντέρου. Εάν μια κακοήθης απόφραξη αποκλείει μια πλήρη κολονοσκόπηση προεγχειρητικά, όλο το υπόλοιπο παχύ πρέπει να εξεταστεί σύντομα μετά την εκτομή.

Όταν η κολονοσκόπηση είναι ελλιπής και σε απουσία απόφραξης, μια άλλη επιλογή είναι η PillCam 2, μια ασύρματη Video ενδοσκοπική κάψουλα παχέος εντέρου που έχει εγκριθεί για προσυμπτωματικό έλεγχο (screening), αν και η χρήση της σε ασθενείς με συμπτώματα που υποδηλώνουν καρκίνο παχέος εντέρου (π.χ., αναιμία, αιμορραγία από το ορθό, απώλεια βάρους) είναι υπό αμφισβήτηση.

Η μη-ολοκλήρωση μιας διαγνωστικής κολονοσκόπησης σε συμπτωματικούς ασθενείς συμβαίνει στο 11-12%. Οι λόγοι για τους οποίους παρουσιάζεται αυτό το μειονέκτημα της μεθόδου της κολονοσκόπησης περιλαμβάνουν την αδυναμία του κολονοσκοπίου να φθάσει τον όγκο ή να απεικονίσει τον βλεννογόνο κεντρικά του όγκου για τεχνικούς λόγους (π.χ., αποφρακτικός όγκος, δύσκολο ανατομικά παχύ έντερο, κακή προετοιμασία) καθώς και η δυσανεξία του ασθενούς. Σε τέτοιες περιπτώσεις μια εναλλακτική λύση είναι η εικονική κολονοσκόπηση.

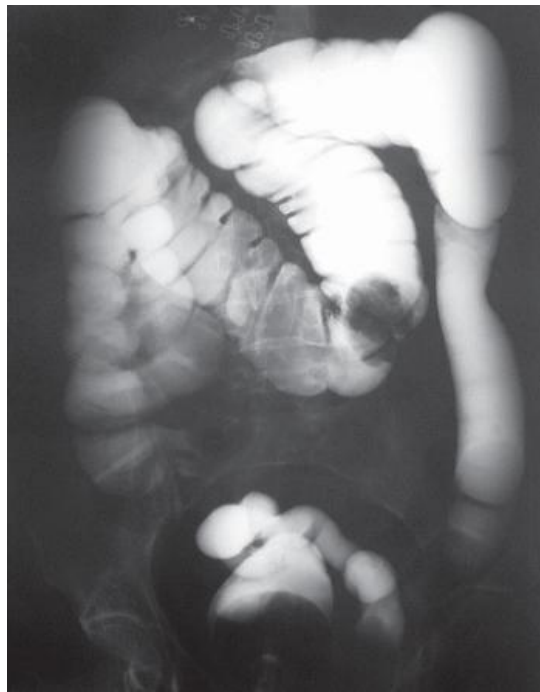
Σιγμοειδοσκόπηση

Τα τελευταία 50 χρόνια, υπάρχει μια σταδιακή στροφή προς τον καρκίνο του δεξιού κόλου όπως αναφέρθηκε και στο τμήμα της επιδημιολογίας του παχέος εντέρου σε όλο τον κόσμο, με μεγαλύτερη την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης του καρκίνου του τυφλού. Εξαιτίας αυτού, και λόγω της υψηλής συχνότητας του σύγχρονου ορθοκολικού καρκίνου η σιγμοειδοσκόπηση γενικά δεν θεωρείται κατάλληλη διαγνωστική εξέταση για έναν ασθενή ύποπτο για καρκίνο παχέος εντέρου.

Βαριούχος υποκλυσμός

Ο βαριούχος υποκλυσμός με εμφύσηση αέρα (τεχνική διπλής αντίθεσης), σε συνδυασμό με τη σιγμοειδοσκόπηση χρησιμοποιείται επίσης, αλλά έχει μικρότερη διαγνωστική ακρίβεια από αυτή της κολονοσκόπησης. Στο 5-10% των ασθενών στους οποίους η κολονοσκόπηση αδυνατεί να

αναδείξει τον όγκο ή να ελέγξει όλο το μήκος του παχέος εντέρου για τεχνικούς λόγους, ο βαριούχος υποκλυσμός διπλής αντίθεσης, θέτει τη διάγνωση. Ο βαριούχος υποκλυσμός (BY), είναι μια εξέταση που χρησιμοποιείται όλο και πιο λίγο διότι υπολείπεται σε αξιοπιστία, ειδικότητα και ευαισθησία συγκρινόμενος με την κολονοσκόπηση. Παρά τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει η μέθοδος αυτή, υπάρχουν περιπτώσεις που μπορεί να δώσει συμπληρωματικές πληροφορίες για να τεθεί η διάγνωση.



Εικόνα 7 : Καρκίνος εγκαρσίου κόλου σε εξέταση βαριούχου υποκλυσμού (BY)

Εικονική κολονοσκόπηση

Η εικονική κολονοσκόπηση παρέχει μια εξομοίωση του αυλού του παχέος εντέρου με εμφύσηση αέρα που διαστέλλει το παχύ έντερο. Η τεχνική χρησιμοποιεί εικόνες που αποκτήθηκαν με συμβατική ή ελικοειδή AT (αξονική τομογραφία) ή μαγνητική τομογραφία, οι οποίες τελικά

υποβάλλονται σε κατάλληλη επεξεργασία από εξειδικευμένο λογισμικό με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία συνεχών εικόνων (video) που επιτρέπει στο χειριστή να περιηγηθεί στον αυλό ενός καθαρού από κόπρανα παχέος εντέρου προς οποιαδήποτε κατεύθυνση ο ίδιος επιθυμεί. Η CT colonography απαιτεί μηχανική προετοιμασία του εντέρου που είναι παρόμοια με αυτή που απαιτείται για τον βαριούχο υποκλυσμό, δεδομένου ότι τα κόπρανα μπορεί να μιμηθούν πολύποδες. Η CT colonography αξιολογήθηκε σε ασθενείς με ελλιπή κολonosκόπηση και ως μια αρχική διαγνωστική εξέταση σε ασθενείς με συμπτώματα που υποδηλώνουν ορθοκολικό καρκίνο, όμως η μέθοδος αυτή στερείται τον επεμβατικό χαρακτήρα της κολonosκόπησης και κατά συνέπεια το βασικό της πλεονέκτημα που είναι η δυνατότητα για βιοψία των ύποπτων βλαβών. Η CT colonography πρέπει να περιορίζεται στους ασθενείς που είναι σε θέση να περάσουν αέρια και ικανούς να κάνουν προετοιμασία εντέρου. Για ασθενείς με αποφρακτικούς όγκους μια καλή εναλλακτική λύση της CT colonography είναι η AT κοιλίας.

Συστηματικές ανασκοπήσεις σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί για αυτές τις εξετάσεις σε ασυμπτωματικούς ασθενείς δείχνουν ότι εικονική κολonosκόπηση και κολonosκόπηση έχουν παρόμοια διαγνωστική αξία για την ανίχνευση ορθοκολικών καρκίνων και μεγάλων πολύποδων. Τα πλεονεκτήματα της κολonosκόπησης όμως δεν περιορίζονται μόνο στις δυνατότητες που της δίνει ο επεμβατικός της χαρακτήρας, αλλά και στην ικανότητα της για εντοπισμο μικρών βλαβών (μικρούς πολύποδες και μικρές επίπεδες βλάβες). Όμως η CT colonography έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει αλλοιώσεις έξω από το παχύ έντερο, που θα μπορούσαν να εξηγήσουν τα συμπτώματα και φυσικά η εξέταση μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με το στάδιο του όγκου.

Καρκινικοί δείκτες (Tumor markers)

Μια ποικιλία δεικτών έχουν συσχετιστεί με καρκίνο παχέος εντέρου, με ιδιαίτερα έμφαση στο καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA). Ωστόσο, όλοι αυτοί οι δείκτες, συμπεριλαμβανομένων του CEA και CA 19-9, έχουν χαμηλή διαγνωστική ικανότητα στον εντοπισμό αρχόμενου και μη μεταστατικού καρκίνου παχέος εντέρου λόγω της αύξησης τους και σε μεγάλο αριθμό καλοήθων νοσήματων. Μια μέτα-ανάλυση κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η συνδυασμένη ευαισθησία του CEA για διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου ήταν μόνο 46% (95% CI 0,45-0,47). Επιπλέον, η ειδικότητα του CEA είναι επίσης περιορισμένη (89%, 95% CI 0,88-0,92). Κανένας άλλος καρκινικός δείκτης που αξιολογήθηκε δεν είχε μεγαλύτερη διαγνωστική ευαισθησία από το CEA, συμπεριλαμβανομένου και του CA 19-9, (συνδυασμένη ευαισθησία 0,30, 95% CI 0,32 0,28).

Μη-καρκινικά αίτια που σχετίζονται με αυξημένες τιμές του CEA περιλαμβάνουν την γαστρίτιδα, το πεπτικό έλκος, την εκκολπωματίτιδα, την ηπατική νόσο, την χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, το σακχαρώδη διαβήτη, και οποιαδήποτε οξεία ή χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση. Επιπλέον, τα επίπεδα του CEA είναι σημαντικά υψηλότερα σε καπνιστές από ότι σε μη-καπνιστές.

Από την American Society of Clinical Oncology (ASCO) και την European Group on Tumor Markers συνιστάται ότι ούτε το CEA του ορού του αίματος ούτε οποιοσδήποτε άλλος δείκτης, συμπεριλαμβανομένων του CA 19-9, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ως μέθοδος διαλογής (screening) ή ως διαγνωστικό τεστ για τον ορθοκολικό καρκίνο.

Ωστόσο, τα επίπεδα CEA έχουν αξία στην παρακολούθηση ασθενών με διαγνωσμένο καρκίνο παχέος εντέρου. Οι οδηγίες της ASCO συστήνουν να λαμβάνονται προεγχειρητικά επίπεδα του

CEA στον ορό σε όλους τους ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου για να βοηθήσουν στον σχεδιασμό της χειρουργικής θεραπείας, την παρακολούθησης καθώ και στην αξιολόγηση της πρόγνωσης.

3.5 Σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέως εντέρου

Τρία συστήματα σταδιοποίησης χρησιμοποιούνται για να καθορίσουν την έκταση της νόσου. Αρχικά καθιερώθηκε η σταδιοποίηση κατά Dukes (και η στη συνέχεια η τροποποίησή της κατά Astler-Coller) προκειμένου να επιτευχθεί μια οργανωμένη καταγραφή της έκτασης της τοπικό-περιοχικής νόσου, να καθορισθούν οι θεραπευτικοί χειρισμοί, να εκτιμηθεί η πρόγνωση και να ελεγχθούν τα θεραπευτικά αποτελέσματα. Πιο πρόσφατα αναπτύχθηκε η σταδιοποίηση κατά TNM, η οποία είναι σήμερα η ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος σταδιοποίησης του καρκίνου του παχέως εντέρου.

Στο σύστημα TNM χρησιμοποιούνται τρεις συνιστώσες για την πλήρη σταδιοποίηση του όγκου, οι οποίες είναι το βάθος επέκτασης του πρωτοπαθούς όγκου (T), ο αριθμός των επιχώριων λεμφαδένων (N) και η ύπαρξη ή όχι απομακρυσμένων μεταστάσεων (M). Αναλυτικότερα παρατίθεται πιο κάτω το σύστημα TNM:

Πρωτοπαθής όγκος (T)

- Tx : Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
- T0 : Καμία ένδειξη παρουσίας πρωτοπαθούς όγκου
- Tis: Καρκίνωμα in situ: Ενδοεπιθηλιακός όγκος ή όγκος που διηθεί το χόριο του βλεννογόνου (lamina propria mucosae)

- T1 : Ο όγκος διηθεί την υποβλεννογόνιο μυϊκή στιβάδα
- T2 : Ο όγκος διηθεί τη μυϊκή στιβάδα
- T3 : Ο όγκος διηθεί όλο το πάχος της μυϊκής στιβάδας και εισέρχεται στους περικολικούς ή περιορθικούς ιστούς
- T4a : Ο όγκος διηθεί τον ορογόνο (σπλαχνικό περιτόναιο)
- T4b : Ο όγκος διηθεί ή συμφύεται με άλλα παρακείμενα όργανα ή δομές (π.χ. κόλπος, προστάτης, ουροδόχος κύστη, νεφρός)

Επιχώριοι λεμφαδένες (N)

- Nx : Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν είναι δυνατό να εκτιμηθούν
- N0 : Χωρίς μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες
- N1 : Μετάσταση σε 1 έως 3 επιχωρίους λεμφαδένες
 - N1a : μετάσταση σε ένα επιχώριο λεμφαδένα
 - N1b : μετάσταση σε 2-3 λεμφαδένες
 - N1c : δορυφόρες εναποθέσεις (deposit(s)) του όγκου στον υπορογόνο χιτώνα, η στο μεσεντέριο, ή σε μη ορογονικές επιφάνειες περικολικών ή περιορθικών ιστών χωρίς μεταστάσεις στους περιοχικούς λεμφαδένες
- N2 : Μετάσταση σε 4 ή περισσότερους επιχώριους λεμφαδένες
 - N2a : μετάσταση σε 4-6 επιχωρίους λεμφαδένες

- N2b : μετάσταση σε 7 η περισσότερους λεμφαδένες

Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)

- M0 : Απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
- Mx : Οι απομακρυσμένες μεταστάσεις δεν μπορούν να εκτιμηθούν
- M1 : Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
 - M1a : μεταστάσεις σε ένα μόνο όργανο (π.χ., Ήπαρ, Πνεύμονας, Ωοθήκες, μη επιχώριο λεμφαδένα)
 - M1b : Μεταστάσεις σε περισσότερα από ένα όργανα/περιοχές ή το στο περιτόναιο

Ο συνδυασμός των πιο πάνω στοιχείων του όγκου σταδιοποιεί τη νόσο και αποτελεί βασικό στοιχείο για την πρόγνωση των ασθενών^{5,6}.

Στάδιο 0: Tis, No, Mo : Στο στάδιο αυτό ο καρκίνος είναι πρώιμος. Δεν έχει επεκταθεί πέραν του βλεννογόνου του εντέρου ή του ορθού. Αυτό το στάδιο είναι γνωστό επίσης ως καρκίνος in situ ή ενδοβλεννογόνο καρκίνωμα.

Στάδιο I : T1, No, Mo ή T2, No, Mo : Ο καρκίνος έχει επεκταθεί διαμέσου του βλεννογόνου στον υποβλεννογόνο ή και στο μυϊκό χιτώνα, αλλά δεν έχει επεκταθεί σε επιχώριους λεμφαδένες ή σε απομακρυσμένες περιοχές.

Στάδιο ΙΙΑ : T3, No, Mo : Ο καρκίνος έχει διηθήσει τον ορογόνο χιτώνα. Δεν έχει επεκταθεί σε επιχώριους λεμφαδένες ή σε απομακρυσμένες περιοχές.

Στάδιο ΙΙΒ : T4a, No, Mo: Ο καρκίνος διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο. Δεν έχει ακόμα επεκταθεί σε επιχώριους λεμφαδένες ή σε απομακρυσμένες περιοχές.

Στάδιο ΙΙC: T4b, No, Mo : Ο καρκίνος διηθεί πέραν του τοιχώματος του εντέρου ή του ορθού, παρακείμενους ιστούς ή όργανα. Δεν έχει ακόμα επεκταθεί σε επιχώριους λεμφαδένες ή σε απομακρυσμένες περιοχές.

Στάδιο ΙΙΑ: T1-2, N1,Mo ή T1, N2, M0 :

- Ο καρκίνος έχει επεκταθεί διαμέσου του βλεννογόνου στον υποβλεννογόνιο ή και στο μυϊκό χιτώνα και έχει διηθήσει 1-3 επιχώριους λεμφαδένες αλλά δεν έχει επεκταθεί σε απομακρυσμένες περιοχές ή

- διηθεί τον υποβλεννογόνιο και 4 με 6 επιχώριους λεμφαδένες.

Στάδιο ΙΙΒ : T3-T4a, N1, Mo ή T2-T3, N2a, M0 ή T1-T2, N2b, M0 :

- Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί μέχρι τον ορογόνο ή όπου δεν υπάρχει ορογόνος προς τους περικολικούς ή περιορθικούς ιστούς ή ο όγκος διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο αλλά όχι σε παρακείμενα όργανα. Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε τουλάχιστον ένα αλλά όχι περισσότερους από 3 κοντινούς λεμφαδένες ή

- Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στο μυϊκό χιτώνα του τοιχώματος του παχέος εντέρου ή του ορθού ή μέχρι τον ορογόνο (εξωτερικό στρώμα) του τοιχώματος του παχέος εντέρου ή όπου δεν υπάρχει ορογόνος προς τους περικολικούς ή περιορθικούς ιστούς. Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε τουλάχιστον 4 αλλά όχι περισσότερους από 6 περιοχικούς λεμφαδένες ή

- Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί μέσω του βλεννογόνου (εσωτερικό στρώμα) του τοιχώματος του παχέος εντέρου στον υποβλεννογόνο χιτώνα (το στρώμα ιστού κάτω από το βλεννογόνο) ή έχει εξαπλωθεί στο μυϊκό χιτώνα του τοιχώματος του παχέος εντέρου ή του ορθού. Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε 7 ή περισσότερους κοντινούς λεμφαδένες

Στάδιο IIIc: T4a, N2a, Mo ή T3-T4a, N2b, M0 ή T4b, N1-N2, M0:

- Ο καρκίνος διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο (εξωτερικό στρώμα) του παχέος εντέρου, αλλά δεν έχει εξαπλωθεί στα παρακείμενα όργανα. Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε τουλάχιστον 4 αλλά όχι περισσότερους από 6 περιοχικούς λεμφαδένες ή

- Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί έως τον ορογόνο ή όπου δεν υπάρχει ορογόνος προς τους περικολικούς ή περιορθικούς ιστούς ή ο όγκος διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο αλλά όχι παρακείμενα όργανα. Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε 7 ή περισσότερους κοντινούς λεμφαδένες ή

- Ο καρκίνος διηθεί κατ' επέκταση άλλα όργανα και έχει εξαπλωθεί σε έναν ή περισσότερους κοντινούς λεμφαδένες.

Στάδιο IV: Κάθε T, κάθε N, M1 : Ο καρκίνος μπορεί να είναι οποιοδήποτε T και οποιοδήποτε N αλλά έχει δώσει απομακρυσμένες μεταστάσεις όπως στο ήπαρ, στους πνεύμονες ή άλλα όργανα

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου συμβάλλει στη διαμόρφωση του πλάνου θεραπείας και καθορίζει τη πρόγνωση. Τα ποσοστά 5ετούς επιβίωσης ανάλογα με το στάδιο είναι:

- Το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης για τον καρκίνο του παχέος εντέρου που βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο είναι 80%.

- Το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης για τον τοπικά προχωρημένο καρκίνο του παχέος εντέρου είναι 60%.
- Το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης για τον μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου φτάνει σήμερα έως και το 15%.

3.6 Θεραπεία καρκίνου παχέος εντέρου

Θεραπεία πολύποδα παχέος εντέρου

Η πλειοψηφία των ορθοκολικών καρκίνων αναπτύσσονται σε έδαφος κάποιου πολύποδα. Τα καλοήθη αδενώματα, καθώς και εκείνα με σοβαρή δυσπλασία ή καρκίνωμα *in situ* (δηλ. δεν υπάρχουν στοιχεία διηθητικού καρκίνου), μπορούν να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά με ενδοσκοπική αφαίρεση (πολυποδεκτομή) με την προϋπόθεση ότι αυτό μπορεί να γίνει επί υγιών ορίων. Η λαπαροσκοπική κολεκτομή είναι επίσης μια εναλλακτική λύση της ανοικτής χειρουργικής επέμβασης για επιλεγμένους ασθενείς με τέτοιους πολύποδες ή για ασθενείς με πρώιμο στάδιο ορθοκολικού καρκίνου που προκύπτει σε ένα τέτοιο πολύποδα. Η μέθοδος αυτή προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα όπως την ταχύτερη ανάρρωση και γρηγορότερη επιστροφή στις καθημερινές δραστηριότητες του ασθενή.

Η δυνατότητα κακοήθους εξαλλαγής των αδενωμάτων εξαρτάται από ένα αριθμό παραγόντων οι οποίοι είναι^{6,212}:

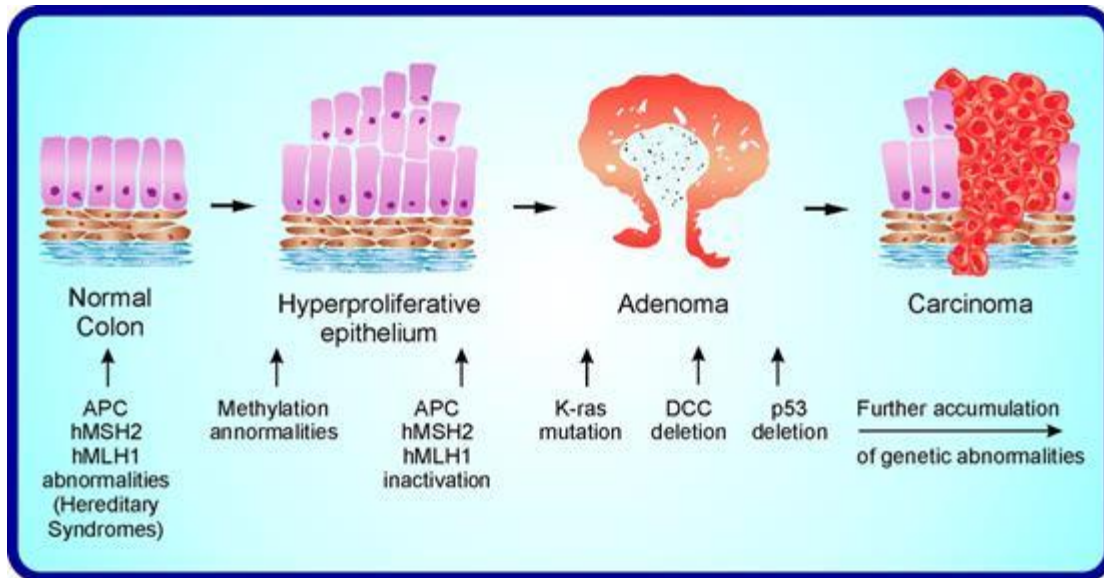
1. το μέγεθος,
2. τον βαθμό δυσπλασίας κατά την ιστολογική εξέταση

- a. Πιστεύεται ότι η μετατροπή από φυσιολογικό βλεννογόνο σε αδένωμα, δυσπλασία, in situ καρκίνο (μη διηθητικός), και στη συνέχεια σε διηθητικό καρκίνο διαρκεί πάρα πολλά χρόνια (>10 χρόνια)
- b. Διηθητικός καρκίνος ορίζεται ως η βλάβη εκείνη κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα διηθούν την υποβλεννογόνια μυϊκή στοιβάδα (muscularis mucosa), και με τον τρόπο αυτό η κακοήθης βλάβη αποκτά δυνατότητα να δίνει μεταστάσεις σε λεμφαδένες και απομακρυσμένα όργανα

Η παρουσία οποιουδήποτε από τους ακόλουθους παράγοντες απαιτεί ριζική επέμβαση (ανοικτή ή λαπαροσκοπική) μια και οι παράγοντες αυτοί είναι δείκτες υψηλού κινδύνου, λόγω ανεπαρκούς εκτομής ή/και λεμφαδενικής διασποράς.

1. Χαμηλή διαφοροποίηση στην ιστολογική εξέταση
2. Λεμφαγγειακή διήθηση
3. Καρκίνος στα όρια εκτομής ή στον μίσχο του πολύποδα
4. Διήθηση του μυϊκού χιτώνα του τοιχώματος του εντέρου (T2 βλάβη)
5. Διηθητικό καρκίνωμα του εντέρου που προκύπτει σε ένα άμισχο πολύποδα (επίπεδο, flat) με δυσμενή χαρακτηριστικά (π.χ. διήθηση των 2/3 του υποβλεννογονίου χιτώνα, λεμφαγγειακή διήθηση, κακή διαφοροποίηση)

Εάν υπάρχει υποψία για διηθητικό καρκίνο κατά την στιγμή της πολυποδεκτομής, η περιοχή μαρκάρεται με τατουάζ (permanent ink) για να ανευρεθεί κατά την επέμβαση



Εικόνα 8 : Η εξέλιξη από αδένωμα σε καρκίνο στο παχύ έντερο

Η εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι να προχωρήσει σε τοπικοπεριοχική επέκταση και απομακρυσμένες μεταστάσεις. Η διαδικασία αυτή είναι ακόμα σε κάποιο βαθμό ασαφής, αν και υπάρχει αποδεκτή συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου, με το βαθμό διήθησης του τοιχώματος του παχέος εντέρου (T) και σε κάποιο βαθμό με το βαθμό διαφοροποίησης και την αγγειακή διήθηση. Κυρίαρχο ρόλο στη θεραπεία σε πολλούς ασθενείς, κατέχει η εκτομή της τοπικής και της μεταστατικής νόσου, όταν και εφόσον αυτή υπάρχει, δηλαδή μια R0 εκτομή. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η πρόληψη της μετάστασης έξω από το αφαιρεθέν τμήμα του εντέρου. Αυτή η μετάσταση (εξάπλωση της νόσου) μπορεί να συμβεί μέσω των λεμφαγγείων, μέσω του αγγειακού συστήματος, μέσω της νευρικής διήθησης και με άμεση προσβολή της περιτοναϊκής επιφάνειας.

Σήμερα μετά από μελέτες της φυσικής ιστορίας αυτής της νόσου, πιστεύεται ότι η όλη διαδικασία της μετάστασης πυροδοτείται στα αρχικά στάδια της εξέλιξης της νόσου μέσω της λεμφικής και αγγειακής οδού, ενώ αργότερα μπορεί να οδηγείται από παράγοντες εκτός του

πρωτοπαθούς όγκου, με μικρό περιθώριο παρέμβασης για την τροποποίηση της διαδικασίας, εκτός βέβαια από την έγκαιρη χειρουργική παρέμβαση με σκοπό την εξαίρεση της τοπικής νόσου. Υπέρ αυτής της θεωρίας είναι και η παρατήρηση ότι οι ασθενείς που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση ήπατος για ηπατικές μεταστάσεις υποτροπιάζουν στο ήπαρ σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα από ότι θα αναμενόταν^{6,212,213}.

Η εξωτοιχωματική αγγειακή διήθηση (Extramural vascular invasion, EMVI) ορίζεται ως η παρουσία καρκινικών κυττάρων στο αγγειακό σύστημα πέρα από το μυϊκό χιτώνα, και υποδηλώνει ότι ο όγκος είναι τοπικά προχωρημένος. Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν χειρότερη πρόγνωση, όπως επίσης ισχύει και όταν υπάρχει περινευρική διήθηση. Οι τελευταίοι δυο αυτοί παράγοντες εξετάζονται πιο σπάνια και είναι δύσκολο ακόμα να ενσωματωθούν με κάποια απτά αποτελέσματα στην κλινική μας πράξη, δηλαδή να υπάρχει κάποια μέθοδος με την οποία να τους τροποποιήσουμε έτσι ώστε να αλλάξει η φυσική πορεία της νόσου. Η χρησιμότητα τους περιορίζεται μόνο στο προγνωστικό τους χαρακτήρα.

Συμπερασματικά, η χειρουργική εκτομή είναι η θεραπεία εκλογής του ορθοκολικού καρκίνου και η σημαντικότητα της ενισχύεται από το γεγονός ότι σε ένα ποσοστό που πλησιάζει το 80% των ασθενών αυτών, η νόσος τους εντοπίζεται μόνο στο τοίχωμα του παχέος εντέρου ή/και των επιχωρίων λεμφαδένων (τοπικοπεριοχική νόσος).

Ο στόχος της χειρουργικής επέμβασης για διηθητικό καρκίνο του παχέος εντέρου είναι η πλήρης αφαίρεση του όγκου με τουλάχιστο 5cm υγιή όρια εκατέρωθεν του όγκου (απόσταση η οποία τροποποιείται στον καρκίνο του ορθού), του αγγειακού του μίσχου, και το σύστημα των λεμφαδένων του τμήματος αυτού του εντέρου που συνοδεύουν τα αγγεία αυτού. Τα τελευταία 4-5 χρόνια μερικές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα 5 cm πρέπει να γίνουν 8 ή και 10 cm, πάντα με

την επιφύλαξη να το επιτρέπει η κατανομή των τροφοφόρων αγγείων, αν και αυτό δεν είναι ακόμα αποδεκτό σε όλο τον κόσμο²¹⁴⁻²¹⁷.

Επικουρική (Μετεγχειρητική) χημειοθεραπεία (Adjuvant chemotherapy)

Για τους ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε δυνητικά θεραπευτική εκτομή του καρκίνου του παχέος εντέρου, ο στόχος της επικουρικής χημειοθεραπείας είναι η εξάλειψη των μικρομεταστάσεων, μειώνοντας έτσι την πιθανότητα υποτροπής της νόσου και αυξάνοντας ταυτόχρονα το ποσοστό θεραπείας. Τα οφέλη από την επικουρική χημειοθεραπεία έχουν αποδειχθεί πιο ξεκάθαρα σε ασθενείς με στάδιο III κατά τη σταδιοποίηση TNM της νόσου (λεμφαδένες θετικοί). Οι ασθενείς αυτοί έχουν περίπου 30% μείωση του κινδύνου υποτροπής της νόσου και 22-32% μείωση της απώτερης θνησιμότητας με τη σύγχρονη χημειοθεραπεία.

Οι περισσότερες θεραπείες περιλαμβάνουν έναν συνδυασμό από διάφορα φάρμακα χημειοθεραπείας, τα οποία δίνονται ενδοφλεβίως, με μια συγκεκριμένη σειρά σε προκαθορισμένες ημέρες. Έτσι για αυτούς τους ασθενείς ένα σύνηθες σχήμα είναι μια εξάμηνη χημειοθεραπεία με φάρμακα που περιέχουν οξαλιπλατίνη που γενικά συνιστάται για τους περισσότερους ασθενείς, αν και τα οφέλη της οξαλιπλατίνης είναι αμφιλεγόμενα στους ηλικιωμένους.

Μεταξύ των ασθενών με νόσο σταδίου II (όλοι είναι N0) κατά TNM, τα οφέλη της χημειοθεραπείας είναι αμφιλεγόμενα. Οι αποφάσεις για την αγωγή τους πρέπει να εξατομικεύονται και πρέπει να συζητούνται και με τους ίδιους τους ασθενείς. Μεταξύ των θεμάτων που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την εκτίμηση του κινδύνου υποτροπής σε σχέση με το όφελος από την χημειοθεραπεία με τα συγκεκριμένα σχήματα είναι:

1. η παρουσία στο παρασκεύασμα χαρακτηριστικών υψηλού κινδύνου όπως:

- a. λιγότεροι από 12 λεμφαδένες στο χειρουργικό παρασκεύασμα,
- b. στάδιο T4,
- c. διάτρηση η απόφραξη του όγκου,
- d. πτωχά διαφοροποιημένος όγκος
- e. λεμφαγγειακή ή περινευρική διήθηση
- f. mismatch repair enzyme (MMR) status
- g. αξιολόγηση συνοσηρότητας
- h. αναμενόμενη υπολογιζόμενη διάρκεια ζωής, κα

Λαμβάνοντας βέβαια πάντα υπόψη μας την σχετικά καλή πρόγνωση της νόσου (στάδιο II κατά TNM) και τους πιθανούς κίνδυνους που συνδέονται με τη θεραπεία.

3.7 Καρκίνος του παχέος εντέρου και ηπατικές μεταστάσεις

Το ήπαρ είναι το πρώτο μείζον όργανο του ανθρώπινου σώματος, που μέσω της πυλαίας φλέβας δέχεται μεγάλη ποσότητα αίματος ανά λεπτό προερχόμενο από το γαστρεντερικό σωλήνα και για το λόγο αυτό αποτελεί την πιο συχνή εστία ανεύρεσης μεταστάσεων από κάθε άλλο όργανο της κοιλίας. Οι μεταστάσεις αυτές αφορούν στην πλειονότητα των περιπτώσεων ορθοκολικό καρκίνο. Το 15-25% από τις μεταστάσεις αυτές ανιχνεύονται κατά τη διάγνωση της πρωτοπαθούς νόσου ή μέσα στους 3 πρώτους μήνες μετά την κολεκτομή και ονομάζονται σύγχρονες, ενώ ένα ποσοστό 70% θα αναπτυχθούν ή ανιχνεύονται μετά τη θεραπεία της πρωτοπαθούς εστίας, συνηθέστερα μέσα στα 3 πρώτα χρόνια από την κολεκτομή, και ονομάζονται μετάχρονες. Χωρίς θεραπεία, η μέση επιβίωση των ασθενών με μεταστατική νόσο

ήπατος από ορθοκολικό καρκίνο είναι 6-9 μήνες, εξαρτώμενη κυρίως από την έκταση της νόσου κατά τη διάγνωση^{24,25}. Η ηπατεκτομή προσφέρει 5ετή επιβίωση 25-44% και πρόσφατα υπάρχουν αναφορές που ανεβάζουν το ποσοστό αυτό στο 58%, με περιεγχειρητική θνητότητα 0-6,6%. Μόνο το 15-20% των ασθενών με μεταστατική νόσο από ορθοκολικό καρκίνο είναι κατάλληλοι για ηπατεκτομή, αν και με την εισαγωγή σύγχρονων θεραπευτικών μεθόδων το ποσοστό αυτό αναμένεται να αυξηθεί²⁴.

Λόγω του ότι η ανάπτυξη συμπτωματολογίας επισυμβαίνει αργά στην πορεία της νόσου, είναι απαραίτητη η πολύ στενή παρακολούθηση των ασθενών μετά από κολεκτομή για θεραπεία καρκίνου του παχέος εντέρου, με βιοχημικές εξετάσεις του ήπατος, καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA), υπερηχογράφημα (US) και αξονική τομογραφία (AT), ώστε να επιτευχθεί πρόωμη ανίχνευση πιθανών μεταστάσεων. Αύξηση του CEA κατά τη διάρκεια της πορείας του ασθενούς μετά από κολεκτομή, υποδεικνύει την ύπαρξη υποτροπής της νόσου. Η ανίχνευση της εστίας της υποτροπής του καρκίνου του παχέος εντέρου θα πρέπει να γίνει με κάθε δυνατό μέσο και παράλληλα να γίνει έγκαιρα. Έτσι, επίπεδα CEA >9 ng/ml σε συνδυασμό με θετικό υπερηχογράφημα κοιλίας ή αξονική τομογραφία ή μαγνητική τομογραφία ήπατος παρέχει διαγνωστική ακρίβεια μέχρι και 98%. Αντίθετα, φυσιολογικό επίπεδο CEA σε συνδυασμό με αρνητικό υπερηχογράφημα, αλλά κυρίως αξονική τομογραφία ή μαγνητική τομογραφία ήπατος, παρέχει ακρίβεια μέχρι και 95% όσον αφορά τον αποκλεισμό μεταστατικής νόσου ήπατος²⁷.

3.8 Θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου και ηπατικές μεταστάσεις

Οι θεραπευτικές επιλογές στη μεταστατική νόσο του ήπατος από ορθοκολικό καρκίνο είναι οι ακόλουθες:

1. Χειρουργική εξαίρεση (ηπατεκτομή)
2. Συστηματική χημειοθεραπεία
3. Περιοχική χημειοθεραπεία (hepatic artery infusion pump, HAI)
4. Προεγχειρητική συστηματική χημειοθεραπεία (neoadjuvant)
5. Μετεγχειρητική συστηματική χημειοθεραπεία (adjuvant)
6. Θερμική καταστροφή
 - RF (radiofrequency ablation)
 - Άλλες μέθοδοι (όπως κρυοθεραπεία, μικροκύματα κ.ά.)
7. Εκλεκτική εσωτερική ακτινοθεραπεία (Selective internal radiotherapy, SIRT)
8. Χημειοεμβολισμός
9. Ανοσοθεραπεία
10. Συνδυασμός θεραπευτικών προσεγγίσεων (π.χ ηπατεκτομή και RFA)

3.8.1 Χειρουργική Θεραπεία μεταστατικής νόσου ήπατος από ορθοκολικό καρκίνο

Είναι σήμερα σαφές ότι η επιλογή των ασθενών προς ηπατεκτομή είναι θεμελιώδους σημασίας για την επίτευξη καλών αποτελεσμάτων. Αν και τα κριτήρια επιλογής ασθενών με μεταστατική νόσο ήπατος από το παχύ έντερο για ηπατεκτομή έχουν επεκταθεί κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων, τα ειδικά κριτήρια για την επιλογή τους παραμένουν ακόμα υπό αμφισβήτηση. Κατά το σχεδιασμό της χειρουργικής επέμβασης σε κάθε ξεχωριστό ασθενή παραμένει πάντα το ερώτημα για το μέγεθος της ηπατεκτομής. Οι παράγοντες που συμβάλλουν

στον καθορισμό του μεγέθους της ηπατεκτομής είναι η εκτίμηση της λειτουργικότητας του ήπατος όπως αυτή εκφράζεται κυρίως από το σύστημα Child-Pugh ή άλλες πιο εξειδικευμένες μεθόδους, το επίπεδο του ικτέρου, και η ογκομέτρηση του ήπατος (CT volumetry).

Με τη βελτίωση των χειρουργικών μεθόδων, οι ενδείξεις για ηπατεκτομή έχουν τα τελευταία χρόνια αλλάξει, ενώ τα κριτήρια του Ekberg που είχαν θεσπισθεί το 1986, έχουν τροποποιηθεί. Η ηπατεκτομή με τα κριτήρια αυτά προσέφερε χαμηλά ποσοστά 5ετούς επιβίωσης τα οποία έφταναν μέχρι το 25%, ενώ ασθενείς χωρίς ηπατεκτομή είχαν 5ετή επιβίωση < 2%. Τα κριτήρια αυτά απεδείχθησαν πολύ αυστηρά, έτσι ώστε σήμερα να ακολουθούνται πιο φιλελεύθερες απόψεις^{25,26}. Ο μεγάλος αριθμός των ηπατικών μεταστάσεων δεν αποτελεί πλέον αντένδειξη, εξακολουθεί όμως να είναι κακό προγνωστικό σημείο. Κατά τον ίδιο τρόπο, η επέκταση της μεταστατικής νόσου ήπατος σε παρακείμενες ανατομικές δομές και η τοπική ή περιοχική υποτροπή του αρχικού καρκίνου δεν συνιστούν αντενδείξεις για ηπατεκτομή.

Η American Hepato-Pancreato-Biliary Association σε Consensus Conference το 2006, συνέστησε ότι η μεταστατική νόσος από ορθοκολικό καρκίνο πρέπει να θεωρείται εξαιρέσιμη αν³⁸:

1. Είναι δυνατή η πλήρης εκτομή (R0).
2. Αν δύο παρακείμενα τμήματα του ήπατος μπορούν να παραμείνουν με πλήρη προσαγωγή και απαγωγή αγγεία και χολαγγεία.
3. Αν ο όγκος του εναπομείναντος ήπατος (Future Liver Remnant-FLR) είναι επαρκής και λειτουργικός (τουλάχιστο >20% του συνολικού όγκου του ήπατος σε φυσιολογικό ήπαρ, το ποσοστό αυτό τροποποιείται σε ασθενείς οι οποίοι έχουν επηρεασμένη ηπατική λειτουργία π.χ λόγω προεγχειρητικής χημειοθεραπείας).

Κατά το σχεδιασμό μιας ηπατεκτομής για μεταστατική νόσο ήπατος από καρκίνο παχέος εντέρου πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα^{39,40}:

1. Η ηπατεκτομή προσφέρει καλύτερα αποτελέσματα συγκρινόμενη με τις τοπικές στρατηγικές καταστροφής του όγκου (RFA, Cryo- ablation κ.λπ.)
2. Η ηπατεκτομή αντενδείκνυται απολύτως, όταν υπάρχει:
 - μη εξαιρέσιμη εξωηπατική νόσος
 - εκτεταμένη συμμετοχή του ήπατος (>70%, περισσότερα από 6 τμήματα, ή συμμετοχή και των τριών ηπατικών φλεβών)
 - σημαντική ηπατική ανεπάρκεια
 - κακή γενική κατάσταση (υψηλό ASA και APACHE).
3. Μετά από ηπατεκτομή πρέπει να ακολουθήσει και μετεγχειρητική χημειοθεραπεία

Αν η μεταστατική νόσος του ήπατος είναι σύγχρονη με τον ορθοκολικό καρκίνο και ειδικά όταν ανευρεθεί κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης για κολεκτομή, τότε όλη η περιτοναϊκή κοιλότητα πρέπει να εξεταστεί πολύ προσεκτικά για άλλες απομακρυσμένες μεταστάσεις. Αν δεν υπάρχει αλλού νόσος και η βλάβη στο ήπαρ μπορεί να εξαιρεθεί με αρνητικά όρια εκτομής και χωρίς ιδιαίτερη νοσηρότητα και θνητότητα, τότε πρέπει με μια μικρή, μη ανατομική εκτομή αυτή να αφαιρεθεί στον ίδιο χειρουργικό χρόνο. Αν μια μεγαλύτερη ηπατεκτομή είναι απαραίτητη, τότε οι περισσότεροι χειρουργοί προχωρούν μόνο στην εκτέλεση κολεκτομής και σε δεύτερο χρόνο σχεδιάζεται η διενέργεια ηπατεκτομής. Στην περίπτωση αυτή, ο ασθενής προετοιμάζεται για ένα διάστημα 3-6 μηνών με χημειοθεραπεία και στη συνέχεια οδηγείται εκ

νέου στο χειρουργείο για ηπατεκτομή. Κάποιες μελέτες διαπίστωσαν, ότι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ηπατεκτομή σε δεύτερο χρόνο και τους χορηγήθηκε προηγουμένως χημειοθεραπεία, είχαν καλύτερη έκβαση από εκείνους που χειρουργήθηκαν με σύγχρονη ηπατεκτομή για τη θεραπεία της μεταστατικής νόσου ήπατος από ορθοκολικό καρκίνο⁴¹.

Τα πιθανά μειονεκτήματα της σύγχρονης ηπατεκτομής περιλαμβάνουν τη διεγχειρητική επιμόλυνση της επιφάνειας διατομής του ήπατος με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό αποστήματος, την πιθανή διάσπαση της αναστόμωσης του παχέος εντέρου λόγω της κακής μετεγχειρητικής λειτουργίας του ήπατος, και την αυξημένη πιθανότητα για υψηλότερα ποσοστά υποτροπής, λόγω διασποράς καρκινικών κυττάρων του όγκου κατά τη χειρουργική επέμβαση. Γενικά, η σύγχρονη ηπατεκτομή δεν συνιστάται σε ηλικιωμένους ασθενείς (>70 έτη), όταν ένα μεγάλο τμήμα του ήπατος πρόκειται να αφαιρεθεί και όταν ο όγκος του παχέος εντέρου δεν είναι καλά διαφοροποιημένος ή πρόκειται περί ενός βλενωδούς αδενοκαρκινώματος. Σήμερα πιστεύεται, ότι αρκετοί ασθενείς με συμπτωματικούς πρωτοπαθείς όγκους του παχέος εντέρου και με εξαιρεσιμες ηπατικές μεταστάσεις, θα μπορούσαν να εξαιρεθούν συγχρόνως και στη συνέχεια να ακολουθήσει χημειοθεραπεία^{40,41}. Οι ασυμπτωματικοί, υψηλού όμως κινδύνου ασθενείς, πρέπει πρώτα να λάβουν προεγχειρητική (neoadjuvant) συστηματική χημειοθεραπεία, ενώ υπάρχουν και νεότερα δεδομένα που τονίζουν την ανάγκη όλοι οι ασθενείς με εξαιρεσιμη ηπατική νόσο θα πρέπει να υποβληθούν πρώτα σε χημειοθεραπεία^{41,42}.

Σε αυτούς τους ασθενείς η χειρουργική εξαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου είναι αμφιλεγόμενη όπως προαναφέρθηκε (δεν υπάρχουν προοπτικές τυφλές μελέτες) και η θεραπεία τους πρέπει να εξατομικεύεται ανάλογα με τα συμπτώματα και τη δυνατότητα εξαίρεσης των μεταστάσεων.

Ένα θέμα διαφωνιών επί πολλά έτη είναι αν πρέπει να γίνεται εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου σε ασυμπτωματικούς ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου όταν ο ασθενής έχει μη χειρουργήσιμο καρκίνο παχέος εντέρου σταδίου IV, λόγω εκτεταμένης νόσου (πχ διάχυτη καρκινωμάτωση με ηπατικές μεταστάσεις ή/και πνευμονικές μεταστάσεις). Τα πράγματα στην αντιμετώπιση των ασθενών αυτών δεν είναι σαφή. Ο κίνδυνος εντερορραγίας είναι μικρός (3%) όπως και ο κίνδυνος απόφραξης/διάτρησης (7-14%), και δεδομένου ότι σε τέτοιους ασθενείς η προεγχειρητική νοσηρότητα και θνητότητα είναι υψηλή, οι ασυμπτωματικοί ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο σταδίου IV μπορεί αρχικά να αντιμετωπισθούν συντηρητικά πχ με χημειοθεραπεία μόνον και η πιθανότητα να χρειασθούν χειρουργική αντιμετώπιση λόγω επιπλοκών από τον πρωτοπαθή όγκο, είναι πολύ μικρή

Πιο κάτω παρατίθεται ένας αλγόριθμος ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον σχεδιασμό της θεραπείας των ασθενών αυτών:

Σύγχρονη δυνητικά εξαιρεσιμη μεταστατική νόσος:

a. Συμπτωματικοί ασθενείς

από τον πρωτοπαθή όγκο (αιμορραγία, απόφραξη διάτρηση) η θεραπεία είναι η εξαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου ακολουθούμενη από χημειοθεραπεία και επανασταδιοποίηση (Grade 2C)

b. Ασυμπτωματικοί ασθενείς

Από τον πρωτοπαθή όγκο, η μόνη θεραπευτική επιλογή είναι η επιθετική αντιμετώπιση. Όμως εδώ τον πρώτο και αρχικό λόγο δεν έχει η χειρουργική αλλά

η χημειοθεραπεία, με σκοπό να επιτρέψει στη φυσική πορεία της νόσου να εκδηλωθεί, με σκοπό να επιλεγθούν στη συνέχεια οι ασθενείς που είναι κατάλληλοι για περαιτέρω θεραπεία, και στη συνέχεια με επανασταδιοποίηση να γίνει διαλογή των κατάλληλων ασθενών για περαιτέρω θεραπεία, που είναι η χειρουργική εξαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου και των μεταστάσεων σε ένα η δύο στάδια (Grade 2C)

2. Για ασθενείς που είναι ή θα γίνουν ανεγχείρητοι, στην πορεία της νόσου ενώ λαμβάνουν χημειοθεραπεία και δεν αναπτύσσουν συμπτώματα από τον πρωτοπαθή όγκο δεν χρειάζεται να γίνουν πολλές θεραπευτικές ενέργειες, παρά μόνο η συνέχιση της χημειοθεραπείας (Grade 2C).

- Σε συμπτωματικούς ασθενείς που δεν είναι υποψήφιοι για χειρουργική εξαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου, άλλες θεραπείες για την παρηγορική θεραπεία της νόσου υπάρχουν όπως έχει ήδη προαναφερθεί.

3. Ασθενείς που παρουσιάζουν δυνητικά εξαιρεσιμη μεταστατική νόσος σε ήπαρ, ή πνεύμονα, ή ωοθήκες, ή στους οπισθοπεριτοναϊκούς λεμφαδένες, ή στα επινεφρίδια και καθώς και συνδυασμό τους. Στους ασθενείς αυτούς η χειρουργική θεραπεία έχει ουσιώδη σημασία και παρουσιάζει συνολική επιβίωση στην πενταετία > 50% σε συνδυασμό πάντοτε με χημειοθεραπεία.

-Για τους οπισθοπεριτοναϊκούς λεμφαδένες οι συστάσεις διαφέρουν, με την επιλογή του χειρουργείου να διατίθεται σε επιλεγμένους ασθενείς με μόνο αυτή την εστία λόγω του γεγονότος ότι οι υποτροπές στους ασθενείς αυτούς είναι πολύ συχνές.

- Οι ίδιες συστάσεις ισχύουν για ασθενείς με μεταστάσεις στα επινεφρίδια.
- Η ωοθηκεκτομή είναι επιθυμητή σε ασθενείς με συμπτωματικές μεταστάσεις στις ωοθήκες ανεξαρτήτως μεγέθους ακόμα και όταν υπάρχουν και αλλού μεταστάσεις, μια και η εκτομή προσφέρει παρηγορική βελτίωση.

3.8.2 Χημειοθεραπεία μεταστατικής νόσου ήπατος από καρκίνο παχέος εντέρου

Είναι πλέον σήμερα γεγονός ότι οι σημαντικές εξελίξεις στη συστηματική χημειοθεραπεία έχουν επεκτείνει τις θεραπευτικές επιλογές για τους ασθενείς με μεταστατική νόσο με συνέπεια τη βελτίωση της διάμεσης επιβίωσης από λιγότερο από ένα χρόνο σε περισσότερους από 20 μήνες. Παρά το γεγονός αυτό λιγότερο από το 10% των ασθενών σε θεραπεία με χημειοθεραπεία, είναι ακόμα ζωντανοί στην πενταετία, και ουσιαστικά κανένας δεν είναι απαλλαγμένος από την νόσο, αν δεν έχει πραγματοποιηθεί χειρουργική επέμβαση ή τουλάχιστο ablation στις μεταστάσεις. Συνεπώς σε αυτούς τους ασθενείς η χειρουργική έχει τον κυρίαρχο ρόλο μια και σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία μας δίνει 5ετη επιβίωση περίπου στο 55% και 10 έτη περίπου στο 20- 25% ειδικά για ασθενείς με μεταστατική νόσο ήπατος από ορθοκολικό καρκίνο. Το συμπέρασμα το οποίο εξάγεται από αυτές τις παρατηρήσεις είναι ότι η μεταστατική νόσος (και ειδικά του ήπατος) είναι μια χρόνια νόσος, και οι εξελίξεις στη χημειοθεραπεία και λιγότερο στην χειρουργική είναι ραγδαίες. Άρα κάθε ασθενής με μεταστατική νόσο ήπατος από ορθοκολικό καρκίνο θα πρέπει αν αντιμετωπίζεται ως ασθενής χρόνιας νόσου και πρέπει να δίνεται η ίδια σημασία τόσο στην ίαση όσο και στην επίτευξη μεγαλύτερης επιβίωσης, που είναι και το πραγματικό νόημα της Ιατρικής και ακόμα περισσότερο της χειρουργικής. Δηλαδή η ιατρική βοήθεια που μπορεί να προσφερθεί στους ασθενείς, που πρωτίστως είναι η ίαση κατά δεύτερο

λόγο πρέπει να επικεντρώνεται στη δυνατότητα των ασθενών αυτών να διαχειριστούν τη νόσο τους και να αποτελούν λειτουργικά μέλη της κοινωνίας.

4. Προγνωστικοί παράγοντες στον καρκίνο του παχέως εντέρου

Οι διάφοροι παράμετροι που αξιολογήθηκαν για τη σημασία τους στη πρόγνωση του καρκίνου του παχέως εντέρου ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες από I έως IV. Η πρώτη κατηγορία I, περιλαμβάνει εκείνους τους παράγοντες που έχουν αποδεδειγμένη προγνωστική αξία όπως αυτή έχει αποδειχθεί σε μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες και έχουν πλέον ευρεία κλινική εφαρμογή. Η κατηγορία IIΑ περιλαμβάνει εκείνους τους προγνωστικούς παράγοντες που ερευνώνται εντατικά στην κλινική πράξη ή στα βιολογικά εργαστήρια και έχουν δείξει επανειλημμένα ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καθορίσουν την πρόγνωση ή και να προβλέψουν την ανταπόκριση σε μια συγκεκριμένη θεραπεία, χωρίς όμως να υπάρχουν στατιστικά ισχυρές αποδείξεις που να το τεκμηριώνουν. Στην κατηγορία IIΒ περιλαμβάνονται οι παράγοντες που φαίνεται να έχουν προγνωστική αξία αλλά τα στοιχεία που υπάρχουν μέχρι σήμερα είναι ανεπαρκή για να συμπεριληφθούν στην προηγούμενη κατηγορία. Η κατηγορία III περιλαμβάνει τους παράγοντες για τους οποίους υπάρχουν υποθέσεις ότι ενδέχεται να έχουν προγνωστική αξία αλλά δεν έχουν μελετηθεί διεξοδικά ακόμη, ενώ η κατηγορία IV περιλαμβάνει τους παράγοντες εκείνους που έχουν μελετηθεί διεξοδικά και έχει αποδειχθεί ότι δεν διαθέτουν κάποιο προγνωστικό ρόλο.

(Πίνακας 1)

Προγνωστικοί παράγοντες στον καρκίνο του παχέως εντέρου	
Κατηγορία I Συνολικός αριθμός εξαιρεθέντων λεμφαδένων Μικροσκοπικές λεμφαδενικές μεταστάσεις Ανάλυση του φρουρού λεμφαδένα Υπολειπόμενη νόσος Προεγχειρητικά επίπεδα CEA Αγγειακή και λεμφαγγειακή διήθηση	Κατηγορία IIΑ Ιστολογική διαφοροποίηση Όρια εκτομής
	Κατηγορία IIΒ Ιστολογικός τύπος Μικροδορυφορική και Χρωμοσωμική αστάθεια Απάλειψη 18Q Διαμόρφωση του όγκου
Κατηγορία III Μοριακοί προγνωστικοί δείκτες Ki-RAS Θυμιδική συνθάση Φωσφορυλάση της θυμιδίνης Δευδρογενάση της Διυδροπυριμιδίνης TP53 Φλεγμονώδης διήθηση του όγκου και ινοβλαστική αντίδραση Παράγοντες που συνδέονται με το χειρουργό Περινευρική διήθηση Πλοειδία του DNA	Κατηγορία IV Μέγεθος και μορφολογία του όγκου Αιματοχесία από το ορθό Μεταγγίσεις αίματος

Πίνακας 1: Προγνωστικοί παράγοντες στον καρκίνο του παχέως εντέρου

Συνολικός αριθμός εξαιρεθέντων λεμφαδένων: Αποτελεί προϋπόθεση για τη σωστή σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέως εντέρου και ο συνολικός αριθμός των εξαιρεθέντων λεμφαδένων κατά τη χειρουργική επέμβαση συνδέεται με την επιβίωση των ασθενών αυτών. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει τόσο ο χειρουργός, ο οποίος με σωστή χειρουργική τεχνική οφείλει να αφαιρέσει τις απαραίτητες λεμφαδενικές ομάδες, όσο και ο παθολογοανατόμος ο οποίος θα εξετάσει το παρασκευάσμα^{32,33}. Μεταστατικές εστίες κάτω από 5mm μπορεί να είναι δύσκολο να εντοπιστούν κατά την παθολογοανατομική εξέταση. Υπάρχει αριθμός μελετών οι οποίες προσπάθησαν να καθορίσουν τον απαραίτητο αριθμό λεμφαδένων οι οποίο πρέπει εξαιρεθούν κατά τη χειρουργική επέμβαση για να μπορεί να πραγματοποιηθεί μια επαρκής σταδιοποίηση της νόσου. Την τελευταία δεκαετία αρκετές μελέτες έχουν καταλήξει ότι πρέπει να εξετασθούν τουλάχιστο δώδεκα λεμφαδένες για να μπορεί να σταδιοποιηθεί επαρκώς ο καρκίνος του παχέως εντέρου και ο αριθμός αυτός χρησιμοποιείται και ως ένδειξη της χειρουργικής τεχνικής^{33,34}. Ο συνολικός αριθμός των λεμφαδένων συνδέεται με την επιβίωση και τον χρόνο υποτροπής.

Παρουσία μικρομεταστάσεων στους αφαιρεθέντες λεμφαδένες: Οι σύγχρονες μέθοδοι εξέτασης των παθολογοανατομικών παρασκευασμάτων επιτρέπουν με την χρήση της ανοσοϊστοχημείας και με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) την ανίχνευση πολύ μικρών μεταστατικών εστιών στους λεμφαδένες. Η χρησιμότητα της διάγνωσης αυτής δεν έχει ακόμα αποσαφηνισθεί και δεν έχει τεκμηριωθεί η συμβολή της στην πρόγνωση της επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο παχέως εντέρου. Η 6^η έκδοση της AJCC (American Joint Committee on Cancer) ορίζει ως μικρομεταστάσεις την ύπαρξη μεταστάσεων από 0,2mm μέχρι 2mm και απομονωμένα καρκινικά κύτταρα (ITCs) τις μεταστάσεις εκείνες που έχουν μέγεθος < 0,2mm. Με βάση το γεγονός ότι στα στάδια I και II καρκίνου παχέως εντέρου υπάρχει υποτροπή σε ένα

ποσοστό που φτάνει το 25% οι Park et al μελέτησαν τις μικρομεταστάσεις στους λεμφαδένες σε ένα δείγμα 160 ασθενών και κατέληξαν ότι ένα ποσοστό 5% των ασθενών αυτών υποσταδιοποιείται αλλά δεν μπόρεσαν να το συσχετίσουν με τη συνολική επιβίωση ή με το διάστημα ελεύθερο νόσου³⁵.

Καρκινοεμβρικό αντιγόνο (CEA): είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που ανευρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη πολλών ιστών ανάμεσα τους και τα καρκινικά κύτταρα όγκων του παχέως εντέρου. Μετράται στον ορό του αίματος (ορολογικός δείκτης) με ραδιο-ανοσοϊστοχημική μέθοδο. Ανευρίσκεται και σε άλλα υγρά του οργανισμού, όπως στα ούρα και στα κόπρανα. Αυξημένες τιμές CEA, δεν σημαίνουν και την ύπαρξη καρκίνου παχέως εντέρου. Παθολογικά αυξημένες τιμές ανευρίσκονται και σε άλλους καρκίνους του γαστρεντερικού συστήματος ή μη (π.χ. μαστού, ήπατος, στομάχου, πνεύμονα), σε καλοήθεις νόσους (π.χ. πεπτικό έλκος, φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου, κίρρωση του ήπατος, παγκρεατίτιδα, ουραιμία.), αλλά και σε (βαρείς) καπνιστές. Είναι αυξημένο στο 70% των ασθενών με καρκίνο παχέως εντέρου, αλλά λιγότεροι από τους μισούς ασθενείς με αρχόμενο καρκίνο παχέως εντέρου έχουν αυξημένο CEA. Αυξημένα προεγχειρητικά επίπεδα CEA, είναι συνήθως ευθέως ανάλογα με το στάδιο των περισσότερων καρκίνων παχέως εντέρου και/ή δηλωτικά σύγχρονης μεταστατικής νόσου (ακόμα και για περιπτώσεις με αρνητικούς λεμφαδένες – N0) και συσχετίζονται με πτωχή πρόγνωση. Να σημειωθεί ιδιαίτερα ότι το CEA, δεν αποτελεί αξιόπιστο δείκτη για τα νεοπλάσματα χαμηλής διαφοροποίησης τα οποία συνήθως δεν παράγουν CEA και έτσι δίνουν ψευδώς αρνητικές (δηλ. φυσιολογικές) τιμές. Από την άλλη πλευρά, αυξημένα προεγχειρητικά επίπεδα CEA, που μειώνονται στο φυσιολογικό μέσα στους επόμενους 3 μήνες μετεγχειρητικά, δηλώνουν θεραπευτική εξαίρεση του όγκου. Αντίθετα, παραμονή υψηλών τιμών CEA μετεγχειρητικά, είναι ενδεικτικό υπολειπόμενης νόσου. Η μέτρηση λοιπόν του CEA, χρησιμεύει κατά βάση, σαν

μετεγχειρητικός προγνωστικός δείκτης υποτροπής καρκίνου παχέος εντέρου μετά από θεραπευτική εκτομή²⁷.

Λεμφαδένας φρουρός: Η χρήση του λεμφαδένα φρουρού είναι ευρέως αποδεκτή στη θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου του μαστού και του μελανώματος. Η χρήση του κατά τη θεραπευτική προσέγγιση των καταστάσεων αυτών τροποποιεί και την τελική χειρουργική επέμβαση πράγμα τα οποίο δεν ισχύει για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Με βάση αυτά τα γεγονότα η χρησιμότητα του λεμφαδένα φρουρού στον καρκίνο του παχέος εντέρου παραμένει αμφιλεγόμενη. Τα υψηλά ποσοστά υποτροπής στα στάδια I και II του καρκίνου του παχέος εντέρου οδήγησαν στην πραγματοποίηση αρκετών μελετών που προσπάθησαν να αποδείξουν με την χρήση του λεμφαδένα φρουρού την ύπαρξη υποσταδιοποίησης της νόσου. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών ήταν αντιφατικά με κάποιες από αυτές να καταδεικνύουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα που έφταναν μέχρι και 60%. Οι Bembenek et al σε ένα δείγμα 315 ασθενών κατέγραψαν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε ποσοστό 46% ενώ σε ένα 25% των λεμφαδένων φρουρών αναδείχθηκαν μικρομεταστάσεις ή απομονωμένα καρκινικά κύτταρα. Στην έρευνα τους άλλοι παράγοντες όπως η παχυσαρκία βρέθηκε να σχετίζεται με τη διάγνωση του λεμφαδένα φρουρού και με τον τρόπο αυτό αναδείχθηκε η πολυπλοκότητα στη διερεύνηση της χρησιμότητας του στην σταδιοποίηση των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου³⁶.

Υπολειπόμενη Νόσος: η υπολειπόμενη νόσος μετά από χειρουργική επέμβαση για καρκίνο παχέος εντέρου αποτελεί κακό προγνωστικό παράγοντα. Η ύπαρξη τόσο μακρομεταστάσεων (R2) όσο και μικρομεταστάσεων (R1) επιβαρύνει τη πρόγνωση των ασθενών αυτών. Σημαντικός είναι ο ρόλος της προεγχειρητικής χημειοθεραπείας στους ασθενείς με εκτεταμένη τοπική νόσο, ώστε κατά τον χρόνο της χειρουργικής επέμβασης να μπορεί να επιτευχθεί εκτομή χωρίς υπολειπόμενη νόσο (R0). Μελέτες έχουν δημοσιεύσει αποτελέσματα στα οποία κατά την

αντιμετώπιση ασθενών με εκτεταμένη τοπική νόσο η R0 εκτομή οδήγησε σε 5ετή επιβίωση που έφτανε το 45% σε αντίθεση με τη R1 και R2 εκτομή κατά την οποία η 5ετής επιβίωση ήταν σχεδόν 0%^{30,31}.

Αγγειακή και Λεμφαγγειακή διήθηση: Σε αρκετές μελέτες έχει καταδειχθεί, με πολυπαραγοντική ανάλυση, ότι η συγκεκριμένη παράμετρος αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα αρνητικής πρόγνωσης. Οι περισσότερες από αυτές ανέδειξαν ότι η αγγειακή διήθηση ήταν στατιστικά σημαντική ανεξάρτητα από τον τύπο του διηθούμενου αγγείου (δηλαδή φλέβα, αρτηρία ή λεμφαγγείο)⁴⁵. Το Αμερικάνικο Κολλέγιο Παθολογοανατομίας (College of American Pathologists) συνιστά να εξετάζονται 3 με 5 τμήματα από το εν τω βάθει τμήμα του όγκου προς καθορισμό της λεμφαγγειακής διήθησης⁴⁵.

Βαθμός διαφοροποίησης (tumor grade): Ο βαθμός διαφοροποίησης είναι ένα χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων το οποίο επηρεάζει σημαντικά την επιβίωση, ακόμα και ανεξάρτητα από το στάδιο της νόσου. Οι ασθενείς με καλώς διαφοροποιημένα καρκινώματα (βαθμού 1 και 2) έχουν υψηλότερα ποσοστά 5ετούς επιβίωσης σε σχέση με τους ασθενείς με κακοήθειες χαμηλής διαφοροποίησης (βαθμού 3)^{45,46}.

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες διαφοροποίησης: βαθμού 1 (χαμηλής κακοήθειας-υψηλής διαφοροποίησης), βαθμού 2 (ενδιάμεσης κακοήθειας) και βαθμού 3 (υψηλής κακοήθειας-χαμηλής διαφοροποίησης). Οι χαμηλού βαθμού κακοήθειας – υψηλής διαφοροποίησης όγκοι, παρουσιάζουν καρκινικά κύτταρα τα οποία μοιάζουν με τα φυσιολογικά κύτταρα του εντέρου και συνήθως παρουσιάζουν αργή ανάπτυξη και έχουν λιγότερες πιθανότητες να εξαπλωθούν σε άλλα όργανα. Οι υψηλού βαθμού κακοήθειας – χαμηλής διαφοροποίησης όγκοι παρουσιάζουν κύτταρα «ανώμαλα», τα οποία μοιάζουν ελάχιστα με εκείνα του φυσιολογικού ιστού,

πολλαπλασιάζονται ταχύτατα και είναι πιο πιθανό να εξαπλωθούν σε άλλα όργανα. Οι μέτριοι βαθμού καρκίνοι έχουν χαρακτηριστικά ενδιάμεσα των προηγούμενων δύο κατηγοριών ως προς τη μορφολογία τους, το ρυθμό ανάπτυξης και την ικανότητα τους να εξαπλώνονται σε άλλα όργανα. Μερικές φορές περιγράφονται ως καρκίνοι μέτριας διαφοροποίησης.

Μικροδορυφορική Αστάθεια (MSI microsatellite instability): Η Μικροδορυφορική Αστάθεια (Microsatellite instability, MSI) είναι ένα μοριακό χαρακτηριστικό, μια γενετική ανωμαλία η οποία οφείλεται στην έλλειψη συγκεκριμένων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA επιτρέποντας έτσι τη συσσώρευση γενετικών μεταλλάξεων στα κύτταρα του βλεννογόνου του εντέρου οι οποίες και προδιαθέτουν στην ανάπτυξη καρκίνου^{47,49}. Η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) είναι χαρακτηριστική του κληρονομούμενου συνδρόμου Lynch (HNPCC) αλλά παρουσιάζεται και στο 10 με 15% των σποραδικών καρκίνων του παχέος εντέρου. Ανάλογα με το βαθμό που έχει επηρεαστεί η ικανότητα επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) διαχωρίζεται σε υψηλού βαθμού (MSI-high) και χαμηλού βαθμού μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-low), ενώ καμία μεταβολή δηλωτική αστάθειας λογίζεται ως μικροδορυφορική σταθερότητα (MSS).

Κλινική Χρησιμότητα:

- Καθορισμός πρόγνωσης (εξέλιξης) σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου.
- Επιλογή ασθενών με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης κληρονομούμενου μη-πολυποδιασικού καρκίνου παχέος εντέρου (HNPCC) ή αλλιώς συνδρόμου Lynch.
- Πρόβλεψη ανταπόκρισης σε θεραπεία με 5-FU σε ασθενείς σταδίου II και βάση ορισμένων μελετών ίσως και σταδίου III.

Ερμηνεία Αποτελεσμάτων:

Οι ασθενείς με όγκους που έχουν υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H) έχουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

1. Είναι λιγότερο επιθετικοί από τους όγκους με χαμηλή (MSI-L) ή καθόλου (MSS).
2. Έχουν μικρότερο από 5% κίνδυνο υποτροπής όταν είναι Σταδίου II.
3. Έχουν ελάχιστο όφελος από τη χημειοθεραπεία με 5-FU σε ασθενείς σταδίου II.
4. Έχουν μικρότερη πιθανότητα να δημιουργήσουν μεταστάσεις.
5. Το 90% των όγκων με MSI-H προέρχονται από ασθενείς που έχουν κληρονομούμενο σύνδρομο Lynch (HNPCC) και έτσι οι MSI-H ασθενείς προτείνεται να προχωρούν σε πλήρη γονιδιακό έλεγχο για σύνδρομο Lynch (HNPCC).
6. Έλεγχος μικροδορυφορικής αστάθειας πρέπει να γίνεται και σε όλους τους ασθενείς που παρουσιάζουν καρκίνο παχέος εντέρου σε ηλικία μικρότερη των 50 ετών.

Μοριακοί δείκτες: Παρά την αδιαμφισβήτητη προγνωστική ισχύ της ανατομικής έκτασης της νόσου κατά τη διάγνωση του καρκίνου παχέος εντέρου, παρατηρούνται συχνά αποκλίσεις στην κλινική έκβαση ασθενών ιδίου σταδίου. Στα πλαίσια εξατομίκευσης της πρόγνωσης για κάθε ασθενή και σχεδιασμού της κατάλληλης θεραπείας (ιδίως σε περιπτώσεις σταδίου II), έχει μελετηθεί μεγάλος αριθμός μοριακών παραγόντων ως προς τη δυνητική προγνωστική τους αξία⁴⁷.

Πλοειδικότητα DNA: Η πλοειδικότητα του DNA ως προγνωστικός δείκτης για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, έχει αποτελέσει το αντικείμενο πολλών μελετών. Φαίνεται ότι ο DNA δείκτης

σχετίζεται με την πρόγνωση και ότι οι ασθενείς με ανευπλοειδικούς όγκους παρουσιάζουν μικρότερη 5-ετή επιβίωση^{28,47}.

K-RAS: Η προγνωστική σημασία των KRAS μεταλλάξεων στον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι αντιφατική. Σύμφωνα με νεότερη μελέτη, οι μεταλλάξεις των KRAS δε θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως μοριακοί δείκτες απάντησης στη συμβατική χημειοθεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου. Φαίνεται, πάντως, ότι οι μεταλλάξεις στα KRAS προσδίδουν ανθεκτικότητα σε θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν τον EGFR^{29,47}.

Θυμιδυλική Συνθετάση (thymidylate synthase-TS): Ένζυμο το οποίο μετατρέπει τη μονοφωσφορική δεσοξουριδίνη (dUMP) σε μονοφωσφορική δεσοξυθυμιδίνη (dTMP), απαραίτητο στάδιο της σύνθεσης του DNA στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η θυμιδυλική συνθετάση αποτελεί τον κύριο ενδοκυττάριο στόχο της 5-φθοριοουρακίλης (5-FU), του βασικότερου χημειοθεραπευτικού παράγοντα στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Υψηλά επίπεδα θυμιδυλικής συνθετάσης σχετίζονται με πτωχή ανταπόκριση στη θεραπεία, ενώ σε ασθενείς σταδίου II φαίνεται να συνδέονται και με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής της νόσου, ανεξάρτητα από τη μετεγχειρητική (adjuvant) χημειοθεραπεία⁴⁹.

5. Προγνωστικοί παράγοντες σε ασθενείς με μεταστατική νόσο ήπατος από ορθοκολικό καρκίνο που υποβάλλονται σε ηπατεκτομή

Μέχρι από μερικά χρόνια οι παράγοντες που συνδέονταν με πτωχή έκβαση μετά από ηπατεκτομή για μεταστατική νόσο από το παχύ έντερο ήταν τα θετικά όρια εκτομής και η εξωηπατική νόσος κατά την ηπατεκτομή. Στην πορεία του χρόνου και στην προσπάθεια επίτευξης ενός πιο ακριβούς προγνωστικού συστήματος προεγχειρητικής αξιολόγησης και επιλογής των ασθενών για ηπατεκτομή, διάφοροι προγνωστικοί παράγοντες ερευνήθηκαν και

αξιολογήθηκαν σε μεγάλες σειρές ασθενών με μεταστατική νόσο ήπατος⁵⁰. Αξιολογήθηκε μεγάλος αριθμός παραγόντων οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι κατά σειρά σημαντικότητας οι ακόλουθοι:

1. Εξωηπατική νόσος
2. Τα θετικά ιστολογικά όρια εκτομής (όριο εκτομής >1 cm)
3. Μετάγγιση αίματος περιεγχειρητικά
4. Θετικοί λεμφαδένες στον ηπατοδωδεκαδακτυλικό σύνδεσμο
5. >1 όζος και γενικά ο αριθμός των ηπατικών μεταστάσεων, όπως και η κατανομή
6. Επίπεδο CEA >200 ng/ml κατά την ηπατεκτομή
7. Μέγεθος του όγκου >5 cm
8. Διάστημα ελεύθερο νόσου, μετά κολεκτομή <12 μήνες
9. Πρωτοπαθής όγκος με θετικούς λεμφαδένες
10. Διαφοροποίηση του πρωτοπαθούς όγκου
11. Ηλικία >70 έτη
12. Κακή γενική κατάσταση του ασθενούς

Η 5ετής επιβίωση σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο και μεταστάσεις τόσο στο ήπαρ όσο και σε άλλα όργανα είναι χειρότερη από τους ασθενείς οι οποίοι έχουν μόνο μεταστατική νόσο στο ήπαρ. Διάφορες μελέτες προσπάθησαν να αξιολογήσουν τη σημασία της εξαίρεσης της μεταστατικής νόσου στο ήπαρ, στην ταυτόχρονη παρουσία εξωηπατικών μεταστάσεων^{50,51}. Τα

αποτελέσματα τους δεν ήταν ενθαρρυντικά αφού δεν κατάφεραν να αποδείξουν με στατιστικά σημαντικό τρόπο την ωφελιμότητα της ηπατεκτομής με ταυτόχρονη εξωηπατική νόσο. Αν η εξωηπατική νόσος δεν μπορεί να εξαιρεθεί τότε αντενδείκνυται και η ηπατεκτομή^{52,53}.

Παρόλα τα συστήματα αξιολόγησης, που με την χρήση διαφόρων παραγόντων είναι επιστημονικά τεκμηριωμένα, η γενική εφαρμογή και χρησιμότητά τους σε ευρεία βάση, πέραν των μεγάλων κέντρων αναφοράς δεν έχει επιβεβαιωθεί από άλλες μελέτες σε άλλα μεγάλα κέντρα⁵⁰. Έτσι, σήμερα δεν υπάρχει κανένα απόλυτα αξιόπιστο σύστημα για την επιλογή ασθενών με μεταστατική νόσο ήπατος οι οποίοι είναι υποψήφιοι προς ηπατεκτομή, του οποίου η εφαρμογή να προτείνεται ανεπιφύλακτα και να αποτελεί το βασικό κανόνα προεπιλογής.

Πιθανότατα η μελλοντική ανάπτυξη άλλων προγνωστικών συστημάτων που θα περιλαμβάνουν ακόμα πιο πολλά στοιχεία, όπως μεγαλύτερες ομάδες ασθενών, γενετικούς δείκτες κ.λπ. να βοηθήσουν περισσότερο. Τα στοιχεία αυτά χρησιμεύουν κυρίως για να υπογραμμίσουν ότι οι παραδοσιακοί προεγχειρητικοί κλινικοπαθολογικοί προγνωστικοί παράγοντες μπορούν να θεωρούνται γενικά ωφέλιμοι, αλλά παράλληλα είναι και ανεπαρκείς στο να καθορίσουν την αληθινή βιολογική συμπεριφορά των ορθοκολικών μεταστάσεων. Συμπερασματικά οι παράγοντες αυτοί δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για να αποκλείσουν ασθενείς από τη χειρουργική εκτίμηση.

Τα όρια εκτομής κατά τον σχεδιασμό και τη διενέργεια της ηπατεκτομής διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Θετικά όρια εκτομής (R1 ή R2 εκτομή), έχει αποδειχθεί από σειρά μελετών, ότι συνιστούν ένα πολύ κακό προγνωστικό παράγοντα^{53,54}. Η R0 εκτομή (ιστολογικά αρνητικά όρια εκτομής) μειώνει την τοπική υποτροπή και βελτιώνει τη διάμεση επιβίωση σχεδόν στο διπλάσιο (24 έναντι 46 μηνών). Η επίτευξη ενός αρνητικού ορίου εκτομής είναι σημαντική, η έκταση του

όμως αυτή είναι υπό αμφισβήτηση. Διάφορες προηγούμενες σειρές συνιστούν το όριο αυτό εκτομής να είναι στο 1 cm, και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η δυνατότητα μή επίτευξης του πρέπει να αποτελεί σχετική αντένδειξη ηπατεκτομής. Εντούτοις, βασισμένοι στο σύνολο των στοιχείων, ένα χειρουργικό όριο τουλάχιστον 1 mm δεν θέτει τον ασθενή σε κίνδυνο υποτροπής ή σε χειρότερη πρόγνωση. Επομένως, το όριο εκτομής <1 cm δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ως κριτήριο αποκλεισμού εκτέλεσης της ηπατεκτομής⁵³.

Οι μεταστάσεις στους λεμφαδένες της πύλης του ήπατος αναγνωρίζονται ως σημαντικός προγνωστικός παράγοντας, μιας και θεωρούνται «μεταστάσεις των μεταστάσεων» και συνδέονται με πτωχή έκβαση. Άλλες μελέτες, εντούτοις, έχουν δείξει ότι και στους ασθενείς αυτούς μπορεί να επιτευχθεί μακρά επιβίωση μετά από ηπατεκτομή, η οποία μπορεί να φθάσει και στο 41,7%. Με βάση τα στοιχεία αυτά η παρουσία μεταστατικών λεμφαδένων στην πύλη του ήπατος, ενώ συνδέεται βεβαίως με χειρότερη έκβαση, δεν πρέπει να αποτελέσει κριτήριο αποκλεισμού των ασθενών από την ηπατεκτομή. Μερικοί συγγραφείς συνιστούν το λεμφαδενικό καθαρισμό του ηπατοδωδεκαδακτυλικού συνδέσμου, ως απαραίτητο τμήμα κάθε ηπατεκτομής. Η προσθήκη όμως της διαδικασίας αυτής ως ρουτίνας στην ηπατεκτομή για μεταστατική νόσο από ορθοκολικό καρκίνο παραμένει αμφισβητούμενη

Το περιτόναιο συνιστά την αρχική εστία υποτροπής μετά από θεραπευτική κολεκτομή στο 10-20%, συμμετέχει δε στο 40-70% των περιπτώσεων που παρουσιάζονται με προχωρημένη νόσο και οι οποίοι εμφανίζουν κακή πρόγνωση (διάμεση επιβίωση 5-9 μήνες)⁵⁴.

Για την πλειονότητα των χειρουργών η διάχυτη καρκινωμάτωση είναι ανάλογη των απομακρυσμένων μεταστάσεων. Ο Sugarbaker όμως πρώτος πρότεινε ότι η κατάσταση αυτή συνιστά περιοχική νόσο και πρότεινε την αντιμετώπισή της με κυτταρομειωτική θεραπεία

(cytoreductive surgery, CS) σε συνδυασμό με ενδοπεριτοναϊκή υπερθερμική χημειοθεραπεία (hyperthermic intraperitoneal chemotherapy, HIPEC), για την εξάλειψη της μικροσκοπικής υπολειπόμενης νόσου^{43,44,54}. Ο Elias et al επίσης δημοσίευσε μελέτη ασθενών, που η ηπατεκτομή σε συνδυασμό με λεμφαδενικό καθαρισμό της πύλης του ήπατος, χημειοθεραπεία και CS-HIPEC οδήγησε σε διάμεση επιβίωση 38 μηνών, 5ετή επιβίωση 32%, καθώς και με θνητότητα και νοσηρότητα 3% και 18%, αντίστοιχα. Αν και ασθενείς με εξωηπατική νόσο εμφάνισαν μικρότερη 5ετή επιβίωση (28%), αυτή ήταν καλύτερη από την επιβίωση της απλής χημειοθεραπείας (διάμεση επιβίωση 22-24 μήνες)^{43,44}. Συνεπώς, επεμβάσεις όπως και αυτές, θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν στις θεραπευτικές επιλογές των ασθενών αυτών.

6. Κυτταρικός μεταβολισμός και καρκίνος

6.1 Το μικροπεριβάλλον των όγκων

Κάθε νεοπλασματική εξεργασία θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ένα «οικοσύστημα» το οποίο ευνοεί την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση των νεοπλασματικών κυττάρων. Όπως ένα οικοσύστημα αποτελείται από πολλές συνιστώσες, έτσι και κάθε νεοπλασματικός όγκος αποτελείται από πολλούς τύπους κυττάρων, επικρατεί όμως ο πληθυσμός των νεοπλασματικών κυττάρων. Τα μη νεοπλασματικά κύτταρα που συμμετέχουν στη δημιουργία ενός όγκου αποτελούν το μικροπεριβάλλον του εν λόγω όγκου^{55,56}. Το μικροπεριβάλλον των όγκων αποτελείται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, κύτταρα του στρώματος, αιμοφόρα αγγεία, λεμφαγγεία, εξωκυττάρια θεμέλια ουσία καθώς και άλλα εξωκυττάρια μόρια⁵⁵. Αν και τις προηγούμενες δεκαετίες η έρευνα όσον αφορά τον καρκίνο περιοριζόταν στη μελέτη των καρκινικών κυττάρων, τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερη έμφαση δίνεται

στην αποκωδικοποίηση του ρόλου που διαδραματίζει το μικροπεριβάλλον στην εξέλιξη του όγκου και κατά συνέπεια στη θεραπευτική προσέγγιση και πρόγνωση των ασθενών.

Οι ινοβλάστες αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι του στρώματος κάθε καρκίνου, και σε πολλούς από αυτούς τους όγκους αποτελούν το σημαντικότερο κυτταρικό πληθυσμό του στρώματος^{57,58}.

Αν και για το σύνολο των ινοβλαστών που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον ενός όγκου χρησιμοποιείται συχνά ο όρος «Σχετιζόμενοι με τον καρκίνο ινοβλάστες» (cancer-associated fibroblast-CAF), μπορούμε να ξεχωρίσουμε δύο διακριτούς πληθυσμούς, τους ινοβλάστες που παρατηρούνται και στους υγιείς ιστούς και τους μυοϊνοβλάστες κύριο χαρακτηριστικό των οποίων είναι η έκφραση της α - ακτίνης λείων μυϊκών ινών (α-smooth muscle actin -SMA)^{59,60}.

Σε αυτή την δεύτερη ομάδα ινοβλαστών, στους μυοϊνοβλάστες, πρέπει να αποδίδεται ο όρος CAFs. Τέτοιοι μυοϊνοβλάστες παρατηρούνται σε μεγάλο αριθμό παθολογικών καταστάσεων με κύριο χαρακτηριστικό την εκτεταμένη ίνωση, όπως για παράδειγμα η συστηματική σκλήρυνση, η διάμεση πνευμονική ίνωση κ.α όσο και κατά τη φυσιολογική αντίδραση του οργανισμού στη διαδικασία επούλωσης ενός τραύματος. Η παρουσία αυτών των τροποποιημένων ινοβλαστών τόσο στο καρκινικό στρώμα όσο και στη φυσιολογική διαδικασία επούλωσης δικαιολογεί το χαρακτηρισμό που αποδίδεται στους καρκινικούς όγκους ως «τραύματα που δεν επουλώνονται»^{61,62}.

Εκτός όμως από τις παθολογικές καταστάσεις μυοϊνοβλάστες παρατηρούνται και σε φυσιολογικούς ιστούς όπως π.χ στο βλεννογόνο του γαστρεντερικού σωλήνα των θηλαστικών^{63,64}. Πιο συγκεκριμένα τα κύτταρα αυτά αποτελούν συστατικά του χορίου (lamina propria) το οποίο βρίσκεται μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων της βασικής μεμβράνης του εντέρου και της υποβλεννογόνιας μυϊκής στιβάδας. Τα κύτταρα αυτά έχει δειχθεί ότι

διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην ανάπτυξη όσο και την επιδιόρθωση του εντερικού επιθηλίου⁶⁴. Στο έντερο του εντόμου *Drosophila* δεν υπάρχουν μυοϊνοβλάστες αλλά τα επιθηλιακά κύτταρα είναι σε στενή συνάφεια με τα μυϊκά κύτταρα που απαρτίζουν το μυϊκό χιτώνα του εντέρου. Αυτά τα τελευταία κύτταρα έχειδειχθεί ότι μέσω διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών προάγουν τον πολλαπλασιασμό των intestinal stem cells και κατ' επέκταση την παραγωγή επιθηλιακών κυττάρων⁶⁵. Τα πιο πάνω στοιχεία συνηγορούν για το σημαντικό ρόλο που θα μπορούσαν να διαδραματίζουν οι μυοϊνοβλάστες που συναντώνται στο μικροπεριβάλλον των καρκίνων, δηλαδή οι CAFs, στην ανάπτυξη των κακοηθειών⁶⁶.

Η προέλευση των CAFs παραμένει άγνωστη. Τελική απάντηση σε αυτό το ερώτημα δεν έχει δοθεί καθώς διαφορετικές μελέτες υποστηρίζουν την προέλευση τους από προγονικά αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών ή από ήδη διαφοροποιημένα κύτταρα όπως ινοβλάστες που προϋπήρχαν στην περιοχή ανάπτυξης του καρκίνου, λεία μυϊκά κύτταρα ακόμα και προ-λιποκύτταρα⁵⁹.

Η μελέτη των CAFs αποτελεί ένα σημαντικό πεδίο έρευνας στο ευρύτερο πλαίσιο μελέτης της παθογένειας των νεοπλασμάτων καθώς όλο και περισσότερες μελέτες αποδίδουν σε αυτά τα κύτταρα λειτουργίες που ευνοούν την ανάπτυξη, εξέλιξη και μετάσταση του καρκίνου ενώ συγχρόνως έχει αποδοθεί προγνωστική σημασία στην έκφραση ή μη κάποιων δεικτών αυτών των κυττάρων.

6.2 Το «Warburg Effect»

Αρκετά χρόνια πριν, 1924 ο μετέπειτα βραβευμένος με Νόμπελ Otto Warburg, υποστήριξε ότι όλα τα καρκινικά κύτταρα μοιράζονται ένα κοινό χαρακτηριστικό το οποίο είναι η αυξημένη μετατροπή γλυκόζης μέσω της γλυκόλυσης σε γαλακτικό οξύ παρά την παρουσία επαρκούς

οξυγόνου⁶⁹. Αυτή η διαπίστωση ερχόταν σε αντίθεση με την ανακάλυψη σε ακόμα προγενέστερο χρόνο, το 1861, από τον Louis Pasteur, ότι η παρουσία οξυγόνου καταστέλλει την γλυκόλυση. Μάλιστα η ενεργοποίηση της γλυκόλυσης εν απουσία οξυγόνου αναφέρεται και ως «Pasteur effect»⁷⁰. Η αερόβια γλυκόλυση όπως είχε περιγραφεί από τον Warburg, έγινε γνωστή ως «Warburg Effect» και αποτέλεσε παράδοξο για αρκετές δεκαετίες.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο μεταβολισμός της γλυκόζης για την παραγωγή ενέργειας, που είναι απαραίτητη για τη συνέχιση των κυτταρικών λειτουργιών, με την μορφή ATP ξεκινάει με την προοδευτική μετατροπή της σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέως. Αυτό το ενδιάμεσο παράγωγο στην απουσία οξυγόνου μετατρέπεται με τη δράση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) σε γαλακτικό οξύ το οποίο αποβάλλεται στον εξωκυττάριο χώρο όπου επίσης αποβάλλονται και ποσότητες πυροσταφυλικού οξέος⁷¹. Το πιο πάνω μεταβολικό μονοπάτι, που ονομάζεται αναερόβια γλυκόλυση, οδηγεί στην παραγωγή από κάθε μόριο γλυκόζης 2 μορίων ATP. Ο μηχανισμός αυτός παραγωγής ενέργειας δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός αν συγκριθεί με την αερόβιο μεταβολισμό κατά τον οποία από κάθε μόριο γλυκόζης παράγονται 36 μόρια ATP. Κατά τη διαδικασία του αερόβιου μεταβολισμού του κυττάρου τα μόρια πυροσταφυλικού οξέως τα οποία παράχθηκαν κατά τον μεταβολισμό της γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια όπου η δεϋδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος (pyruvate dehydrogenase -PDH) τα μετατρέπει σε ακετυλ-συνένζυμο Α (acetyl-CoA), CO₂ και NADH. Το ακετυλ-συνένζυμο Α (acetyl-CoA) εν συνεχεία εισέρχεται στον κύκλο του Krebs's ή κύκλο του κιτρικού οξέος και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η δεϋδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος κατέχει καθοριστικό ρόλο για την οξειδωτική φωσφορυλίωση καθώς η απενεργοποίησή της αναστέλλει την μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε ακετυλ-συνένζυμο Α (acetyl-CoA), στερώντας έτσι από τα μιτοχόνδρια το βασικό υπόστρωμα για την

οξειδωτική φωσφορυλίωση^{71,72}. Η δράση του συγκεκριμένου ενζύμου ρυθμίζεται από δύο άλλα ένζυμα, από την κινάση της δεϋδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος (PDH kinase -PDHK) η οποία φωσφορυλιώνοντας την PDH την απενεργοποιεί, και την φωσφατάση της δεϋδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος (PDH phosphatase –PDHP) η οποία απόφωσφορυλιώνοντας την PDH την ενεργοποιεί^{71,72}.

Ο Warburg απέδωσε το φαινόμενο της αερόβιας γλυκόλυσης που επισυμβαίνει στα καρκινικά κύτταρα σε δυσλειτουργία στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και εν γένει των μιτοχονδρίων. Παρά όμως την εκτενή έρευνα που ακολούθησε δεκαετίες μετά, κάτι τέτοιο δεν κατάφερε να αποδείχθει^{73,74}. Η μη επαλήθευση της υπόθεσης του Warburg σχετικά με την αιτία της αερόβιας γλυκόλυσης στα καρκινικά κύτταρα, η διχογνωμία στην επιστημονική κοινότητα σχετικά με το αν η αερόβια γλυκόλυση και εν γένει η αλλαγή του μεταβολικού προφίλ των καρκινικών κυττάρων αποτελούν αίτιο ή επακόλουθο της καρκινογένεσης. Με την πάροδο του χρόνου οι πρόοδοι στη μοριακή βιολογία που κατεύθυναν την έρευνα σχετικά με τον καρκίνο προς την αναζήτηση του γονιδιακών και γενετικών αλλαγών που οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου, περιθωριοποίησαν για αρκετά χρόνια την έρευνα σχετικά με το “Warburg Effect”.

Το ενδιαφέρον για το φαινόμενο αυτό επανήλθε στην επιστημονική κοινότητα κατά τη δεκαετία του 90, εξήντα και πλέον χρόνια μετά την αρχική παρουσίαση του από τον Warburg. Αφορμή για αυτή την αναζωπύρωση του επιστημονικού ενδιαφέροντος όσον αφορά την αερόβια γλυκόλυση στα καρκινικά κύτταρα αποτέλεσε η ανακάλυψη και στη συνέχεια η εφαρμογή της διαγνωστικής εξέτασης ‘Τομογραφία Εκπομπής Ποζιτρονίων’ (Positron Emission Tomography-PET) στη διάγνωση των κακοηθειών⁷⁵. Κατά την εξέταση αυτή, η οποία αποτελεί μια από τις εξετάσεις με την μεγαλύτερη ευαισθησία στον εντοπισμό κακοηθειών και των μεταστάσεων τους, εκμεταλλευόμαστε την αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης από τον όγκο χορηγώντας στον

ασθενή ραδιοσημασμένη γλυκόζη (18FDG) την οποία προσλαμβάνουν τα καρκινικά κύτταρα δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό την απεικόνιση του όγκου. Αν και ακόμα υπάρχουν αρκετά αναπάντητα ερωτήματα που αφορούν τους μοριακούς μηχανισμούς οι οποίοι οδηγούν στην υιοθέτηση της αερόβιας γλυκόλυσης από τα καρκινικά κύτταρα, έρευνες κυρίως των τελευταίων χρόνων άρχισαν να αποκρυπτογραφούν την αλληλουχία των μοριακών γεγονότων που δίνουν γένεση σε αυτή τη μεταβολική προσαρμογή. Η λεπτομερής παράθεση αυτών των στοιχείων υπερβαίνουν τους σκοπούς της συγκεκριμένης ανασκόπησης, ωστόσο επιγραμματικά μπορεί να αναφερθεί ότι σε αυτή την αλλαγή του μεταγραφικού προφίλ των καρκινικών κυττάρων φαίνεται ότι συμβάλουν το μικροπεριβάλλον των όγκων, μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο HIF-1 και ο NF-κB, η ενεργοποίηση ογκογονιδίων και η απώλεια της λειτουργίας ογκοκατασταλτικών γονιδίων, μεταλλάξεις του πυρηνικού DNA, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, επιγενετικές τροποποιήσεις καθώς και διάφορα microRNAs^{76,77}.

Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 ο οποίος θα αναπτυχθεί με περισσότερη λεπτομέρεια στη συνέχεια διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προαγωγή της γλυκόλυσης μέσω της προαγωγής της μεταγραφής πλειάδας γλυκολυτικών ενζύμων. Ένας από τους κύριους ενεργοποιητές του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα αποτελεί η υποξία, κατάσταση που χαρακτηρίζει το μικροπεριβάλλον πολλών όγκων. Παράλληλα πλειάδα πρόσφατων ερευνών ανέδειξαν ότι ο HIF-1 στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να ενεργοποιηθεί και παρουσία οξυγόνου οδηγώντας τελικά σε αερόβια γλυκόλυση στα κύτταρα αυτά. Οι Sakamoto T και συνεργάτες μελετώντας καρκινικές κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι στα κύτταρα που εκφράζουν την membrane type-1 matrix metalloproteinase εμφάνιζαν ενεργοποίηση του HIF-1 παρά την παρουσία οξυγόνου και κατ' επέκταση αερόβια γλυκόλυση⁷⁷. Επίσης η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του mTOR, όπως αυτή παρατηρείται σε μερικά καρκινικά κύτταρα οφειλόμενη σε μεταλλάξεις,

αποτελεί ένα ακόμα μηχανισμό προαγωγής της αερόβιας γλυκόλυσης μέσω της ενεργοποίησης του HIF-1^{78,79}. Μεταλλάξεις οι οποίες οδηγούν σε απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου VHL (von Hippel–Lindau), το οποίο είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση μιας λιγάσης υπεύθυνης για την αποδόμηση του υδροξυλιωμένου HIF-1a μέσω του συστήματος της ουμπικουιτίνης, οδηγούν τελικά στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 σε συνθήκες φυσιολογικής μερικής τάσης οξυγόνου. Μεταλλάξεις του VHL παρατηρούνται κυρίως σε γλοιοβλαστώματα και κακοήθειες των νεφρών. Τέλος αρκετοί από τους ενδιάμεσους μεταβολίτες του κύκλου του Kreb's, οι οποίοι παραμένουν εντός του κύτταρου αν δυσλειτουργήσει κάποιο από τα ένζυμα του εν λόγω μεταβολικού μονοπατιού, οδηγούν και αυτοί με τη σειρά τους στην ενεργοποίηση του HIF-1. Δυσλειτουργία τέτοιων ενζύμων έχουν παρατηρηθεί σε αρκετές κακοήθειες όπως παραγαγγλιώματα, φαιοχρωμοκυτώματα, λειομυοσαρκώματα κ.α.^{80,81,82}.

Το ογκογονίδιο c-Myc παρατηρήθηκε ότι υπερεκφράζεται στο 70% των κακοηθειών. Η υπερέκφραση του ογκογονιδίου αυτού οδηγεί στην προαγωγή της μεταγραφής πλειάδας γλυκολυτικών ενζύμων οδηγώντας με αυτό τον τρόπο στην προαγωγή της γλυκόλυσης στα καρκινικά κύτταρα⁸³. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, το οποίο βρίσκεται μεταλλαγμένο σε μεγάλο αριθμό νεοπλασιών είναι ίσως από τα περισσότερο μελετημένα ογκοκατασταλτικά γονίδια σε σχέση με την δράση του στην εμφάνιση αερόβιας γλυκόλυσης στα καρκινικά κύτταρα. Το γονίδιο TIGAR η έκφραση του οποίου ελέγχεται από το p53, αποτελεί ένα από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων η απώλεια της έκφρασης του p53 οδηγεί τελικά σε αερόβιο γλυκόλυση στα καρκινικά κύτταρα. Το TIGAR μεταγράφεται στην παρουσία της ενεργού μορφής του p53 και μεταξύ άλλων καταστέλλει την γλυκόλυση^{84,85}. Βάση των πιο πάνω η απώλεια της λειτουργίας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 οδηγεί στην προαγωγή της

αερόβιας γλυκόλυσης στα καρκινικά κύτταρα μέσω της καταστολής που προκαλεί στην έκφραση ενός από τους αναστολείς της που είναι το TIGAR⁸⁸. Η απώλεια της έκφρασης του p53 οδηγεί επίσης στην υπερέκφραση των διαμεμβρανικών μεταφορέων της γλυκόζης GLUT1 και GLUT4 γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη είσοδο γλυκόζης εντός των καρκινικών κυττάρων^{86,87}. Ακόμα απώλεια έκφρασης του p53 οδηγεί σε αύξηση της λειτουργικότητας του συμπλέγματος IKK οδηγώντας με τον τρόπο αυτό στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB με αποτέλεσμα την υπερέκφραση του διαμεμβρανικού μεταφορέα GLUT 3 και την ενίσχυση της γλυκόλυσης^{88,89,90}. Επιπρόσθετα το p53 προάγει την παραγωγή μιας από τις υπομονάδες του συμπλέγματος IV της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (cytochrome c oxidase -SCO2). Κατά συνέπεια η απώλεια της λειτουργίας του συγκεκριμένου ογκοκατασταλτικού γονιδίου σε ένα καρκινικό κύτταρο οδηγεί σε δυσλειτουργία της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας και μέσω αυτού του μηχανισμού προάγει την παραγωγή ATP μέσω της γλυκόλυσης. Πρόσφατα έχει ανακαλυφθεί ακόμα ένας μηχανισμός μέσω του οποίου η απώλεια της έκφρασης του p53 προάγει την αερόβια γλυκόλυση στα καρκινικά κύτταρα. Η απώλεια έκφρασης αυτού του ογκοκατασταλτικού γονιδίου οδηγεί στην μη μεταγραφή του γονιδίου Parkin. Η μη έκφραση του Parkin προάγει την γλυκόλυση^{88,89}.

Όπως έχει αναφερθεί πιο πάνω η επιλογή από τα καρκινικά κύτταρα της αερόβιας γλυκόλυσης έναντι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι οικονομικά ασύμφορη όσον αφορά την παραγωγή μορίων ATP. Από ένα μόριο γλυκόζης η γλυκόλυση οδηγεί στην παραγωγή 2 μορίων ATP σε αντίθεση με την παραγωγή 36 μορίων ATP όταν ένα μόριο γλυκόζης χρησιμοποιηθεί μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Για την εξήγηση της ασύμφορης ενεργειακής επιλογής από τα καρκινικά κύτταρα προτάθηκαν διάφορες θεωρίες με επικρατούσες κυρίως δύο:

1) Η απόδοση ενέργειας ανά μόριο γλυκόζης είναι μεγαλύτερη όταν αυτό μεταβολίζεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, ωστόσο ο ρυθμός παραγωγής ATP από ένα κύτταρο είναι μεγαλύτερος όταν η γλυκόζη υφίσταται γλυκόλυση. Η θεωρία αυτή υποστηρίζει ότι η επιλογή από τα καρκινικά κύτταρα της αερόβιας γλυκόλυσης τους επιτρέπει την παραγωγή ενέργειας σε υψηλούς ρυθμούς, γεγονός που τους επιτρέπει να καλύψουν τις αυξημένες ενεργειακές τους απαιτήσεις. Υπέρ αυτής της θεωρίας έρχονται και κάποιες άλλες μελέτες οι οποίες αποκαλύπτουν ότι σε καταστάσεις υποξίας η γλυκόλυση δεν αναστέλλει την χρήση της γλουταμίνης στον κύκλο του Krebs's γεγονός που οδηγεί στην περαιτέρω παραγωγή ενέργειας από το κύτταρο^{91,92,93}.

2) Εκτός όμως από ενέργεια τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα απαιτούν και την άφθονη παρουσία άλλων μορίων τα οποία είναι απαραίτητα για την σύνθεση της αναγκαίας για τον πολλαπλασιασμό κυτταρικής μάζας. Η γλυκόλυση συμβάλει στην παραγωγή αυτών των απαραίτητων για τον πολλαπλασιασμό μορίων καθώς οδηγεί στον σχηματισμό των απαραίτητων ενώσεων άνθρακα που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την παραγωγή νουκλεϊνικών οξέων, φωσφολιπιδίων, λιπαρών οξέων και αμινοξέων. Π.χ τα νουκλεϊνικά οξέα τα οποία είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων παράγονται από την 5-φωσφορική ριβόζη η οποία με τη σειρά της παράγεται από την 6-φωσφορική γλυκόζη με την τελευταία να αποτελεί ένα από τους μεταβολίτες της γλυκόλυσης. Επίσης άλλοι μεταβολίτες της γλυκόλυσης όπως το πυροσταφυλικό οξύ και το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ χρησιμοποιούνται ως πρόδρομα μόρια για την παραγωγή των αμινοξέων που με τη σειρά τους θα χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση πρωτεϊνών^{94,95,96}.

Πολλές από τις μοριακές αλλαγές που προάγουν την αερόβια γλυκόλυση στα καρκινικά κύτταρα, προάγουν συγχρόνως και την ενεργοποίηση αναβολικών μονοπατιών σε μια

προσπάθεια των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων καρκινικών κυττάρων να συνθέσουν την απαιτούμενη για την κυτταρική διαίρεση βιομάζα⁹⁷. Η ενεργοποίηση της αερόβιας γλυκόλυσης με στόχο όχι την παραγωγή ενέργειας αλλά την παραγωγή απαραίτητων για την ανάπτυξη μεταβολιτών παρατηρείται και σε φυσιολογικές συνθήκες σε περιόδους έντονης ανάπτυξης ενός οργανισμού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Δροσόφιλα όταν αυτή βρίσκεται στο στάδιο της προνύμφης, ένα στάδιο που χαρακτηρίζεται από αύξηση της μάζας του εντόμου κατά 200 φορές. Αυτή η αύξηση της σωματικής μάζας εξαρτάται από την αλλαγή του μεταβολικού προφίλ του εντόμου στο στάδιο αυτό. Πιο συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι στο στάδιο αυτό υπάρχει σημαντική αύξηση της αερόβιας γλυκόλυσης και γενικότερα του μεταβολισμού των υδατανθράκων η οποία αποσκοπεί στην παραγωγή των απαραίτητων για την ανάπτυξη μεταβολιτών. Η ενεργοποίηση της αερόβιας γλυκόλυσης σε αυτό το στάδιο της ανάπτυξης του συγκεκριμένου εντόμου αποδόθηκε στην ενεργοποίηση του πυρηνικού υποδοχέα των οιστρογόνων (Estrogen-Related Receptors). Μεταλλάξεις σε αυτό το μεταγραφικό παράγοντα έχουν ως αποτέλεσμα το θάνατο του εντόμου στο στάδιο της προνύμφης. Τα έντομα που πεθαίνουν δεν εμφανίζουν οποιαδήποτε ανατομική ανωμαλία αλλά παρουσιάζουν σημαντική αύξηση των κυκλοφορούντων σακχάρων σε συνδυασμό με σημαντική μείωση των επιπέδων του ATP^{98,99,100}. Η περαιτέρω μελέτη αυτών των μεταλλαγμένων εντόμων αποκάλυψε ότι η ενεργοποίηση του Estrogen-Related Receptor είναι απαραίτητη στο στάδιο της προνύμφης καθώς οδηγεί στην προαγωγή της μεταγραφής του συνόλου σχεδόν των ενζύμων που εμπλέκονται τόσο στην γλυκόλυση όσο και σε άλλα μεταβολικά μονοπάτια μεταβολισμού των υδατανθράκων. Έτσι εν απουσία ενεργότητας του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα η προνύμφη αδυνατεί να αναπτυχθεί και πεθαίνει καθώς στερείται μεταβολιτών οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη και οι οποίοι παράγονται μέσω του μεταβολισμού των

υδατανθράκων. Το γεγονός ότι οι Estrogen-Related Receptors έχουν συσχετιστεί με διάφορες πτυχές της ανάπτυξης και προόδου ανθρώπινων κακοηθειών αφήνει ανοικτό το ενδεχόμενο οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες, σε συσχέτιση με τα όσα αναφέρθηκαν πιο πάνω για την δροσόφιλα, να προάγουν την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης της αερόβιας γλυκόλυσης (Warburg Effect)^{99,100}.

6.3 Αυτοφαγία/Μιτοχονδριοφαγία

Με τον όρο αυτοφαγία αναφερόμαστε στην πέψη και καταβολισμό από το κύτταρο, δομικών συστατικών του. Προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Thomas P. Ashford και Keith R. Porter το 1962 και πρόκειται για μία συντηρημένη κατά την εξέλιξη καταβολική διεργασία κατά την οποία δομικά συστατικά του κυττάρου αποδομούνται στα λυσοσώματα^{100,101}. Η συντήρηση της αυτοφαγίας κατά την εξέλιξη καταδεικνύει και την σπουδαιότητα της στην κυτταρική λειτουργία. Γονίδια που σχετίζονται με την αυτοφαγία εντοπίζονται από τους μονοκύτταρους οργανισμούς και την δροσόφιλα μέχρι και τα σπονδυλωτά ζώα^{101,102}.

Η διαδικασία αυτή μπορεί να είναι μη εκλεκτική και να οδηγεί στην αποδόμηση στα λυσοσώματα κυτταροπλασματικών συστατικών ανεξαρτήτως λειτουργίας ή μπορεί να είναι στοχευμένη και να έχουμε την αποδόμηση ριβοσωμάτων (ριβοφαγία), μιτοχονδρίων (μιτοχονδριοφαγία) και λιπών (λιποφαγία)¹⁰³. Η αυτοφαγία αποτελεί ένα σημαντικό ομοιοστατικό μηχανισμό ρυθμίζοντας την απομάκρυνση-αποδόμηση οργανιδίων που έχουν υποστεί βλάβη και επαναχρησιμοποίηση των μορίων (σάκχαρα, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, λιπαρά οξέα) τα οποία αποτελούν το τελικό προϊόν αυτής της καταβολικής διαδικασίας για τις αναβολικές ανάγκες του κυττάρου. Αποτελεί μηχανισμό ανάλογο με την ελεγχόμενη από την ουμπικουιτίνη αποδόμηση των πρωτεϊνών που είτε έχουν υποστεί βλάβη είτε δεν έχουν

διαμορφωθεί σωστά αλλά σε επίπεδο κυτταροπλασματικών οργανιδίων, γι αυτό και ο όρος μακροαυτοφαγία. Επιπλέον η αυτοφαγία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της παραγωγής της απαραίτητης για το κύτταρο ενέργειας σε συνθήκες μειωμένης παροχής θρεπτικών ουσιών. Σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες η αυτοφαγία και πιο ειδικά η μιτοχονδριοφαγία οδηγεί στην λύση των μιτοχονδρίων που είτε λόγω βλαβών είτε λόγω των επικρατούντων συνθηκών υπερ-παράγουν ενεργές μορφές οξυγόνου^{104,105}.

Ένα αναπόσπαστο κομμάτι της διεργασίας της αυτοφαγίας είναι η δημιουργία των αυτοφαγοσωμάτων τα οποία είναι ενδοπλασματικά κυστίδια τα οποία περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη και τα οποία περικλείουν στο εσωτερικό τους τα οργανίδια/μόρια τα οποία θα αποδομηθούν. Τα κυστίδια αυτά στη συνέχεια συνενώνονται με τα λυσοσώματα με αποτέλεσμα το περιεχόμενο τους καθώς και η εσωτερική τους μεμβράνη να αποδομούνται με την δράση των λυσοσωμικών ενζύμων. Τα παραγόμενα κατά την αποδόμηση των μακρομορίων σάκχαρα, νουκλεοτίδια, λιπαρά οξέα και αμινοξέα επιστρέφουν στο κυτταρόπλασμα για να επαναχρησιμοποιηθούν^{103,104}.

Η δημιουργία των αυτοφαγοσωμάτων βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του σηματοδοτικού μονοπατιού του mTOR¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Η λειτουργικότητα του mTOR ρυθμίζεται από την δράση διαφόρων αυξητικών παραγόντων οι οποίοι σχετίζονται με την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου και τέλος από την κατάσταση οξυγόνωσης του κυττάρου. Η ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών, η υποξία και το οξειδωτικό στρες απενεργοποιούν το mTOR. Αυτή η απενεργοποίηση επιτρέπει την ενεργοποίηση του συμπλέγματος ULK (ULK1/2-Atg13-FIP200-Atg101complex (ULK complex)). Το ενεργοποιημένο σύμπλεγμα ULK ενεργοποιεί το σύμπλεγμα PI3KC3 το οποίο οδηγεί στην παραγωγή φωσφατιδυλο ινοσιτόλης 3- PI(3)P. Τα

μόρια αυτά στρατολογούν εξειδικευμένες πρωτεΐνες (Atg) οι οποίες σε συνεργασία με δύο ubiquitin-like συστήματα σύζευξης οδηγού στην δημιουργία των αυτοφαγοσωμάτων¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Στη διεργασία της αυτοφαγίας έχει αποδοθεί ένας διπλός αντιφατικός ρόλος. Αφενός ο καταβολισμός των κυτταροπλασματικών συστατικών μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο, αφετέρου δε ο ίδιος μηχανισμός σε κύτταρα που υφίστανται μεταβολικό στρες μπορεί να τα βοηθήσει να παραμείνουν ζωντανά¹¹⁰⁻¹¹². Αυτός ο διπλός και άκρως αντικρουόμενος ρόλος της αυτοφαγίας φαίνεται ότι ισχύει και για τα καρκινικά κύτταρα, στα οποία ανάλογα με τον τύπο του όγκου, το στάδιο της νόσου, την γενετική σύσταση των καρκινικών κυττάρων, το μικροπεριβάλλον του όγκου και την χορηγούμενη θεραπεία άλλοτε προάγει την επιβίωση τους και άλλοτε δρα ως μηχανισμός αυτοκτονίας. Έχει προταθεί η θεωρία ότι κατά τα αρχικά στάδια ενός καρκίνου η αυτοφαγία στα καρκινικά κύτταρα αναστέλλει την διεργασία της καρκινογένεσης με μηχανισμούς όπως ο περιορισμός του οξειδωτικού στρες το οποίο αποτελεί διεγέρτη της καρκινογένεσης, τον περιορισμό της χρωμοσωμικής αστάθειας και την πρόληψη της προκαλούμενης από το μεταβολικό στρες νέκρωσης και της επακόλουθης φλεγμονώδους αντίδρασης¹¹³⁻¹¹⁵. Ωστόσο σε πιο προχωρημένα στάδια καρκίνου πιθανότατα η αυτοφαγία προάγει την ανάπτυξη του όγκου και την εμφάνιση απομακρυσμένων μεταστάσεων, καθώς τα καρκινικά κύτταρα σε αυτές τις συνθήκες πρέπει να αναπτυχθούν κάτω από συνθήκες υποξίας, μειωμένης προσφοράς θρεπτικών ουσιών και οξειδωτικού στρες. Όλα τα πιο πάνω αποτελούν διεγέρτες της αυτοφαγίας η οποία ανακυκλώνοντας κυτταροπλασματικά συστατικά παρέχει στο καρκινικό κύτταρο την ενέργεια που απαιτείται για την επιβίωση του^{116,117}.

Εδώ και καιρό έχει προταθεί ότι ο έλεγχος της αυτοφαγίας των καρκινικών κυττάρων μέσω χημειοθεραπευτικών σχημάτων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στα διάφορα θεραπευτικά πρωτόκολλα αντιμετώπισης του καρκίνου. Παρά τις πολλές μελέτες δεν έχει ακόμα

αποσαφηνισθεί κατά πόσο η αυτοφαγία στα καρκινικά κύτταρα αποτελεί μηχανισμό αντίστασης στη θεραπεία ή εάν τελικά συμβάλλει στον προκαλούμενο από κυτταροτοξικά φάρμακα κυτταρικό θάνατο¹¹⁷⁻¹¹⁹.

6.4. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που δρουν ως διεγέρτες της αυτοφαγίας

Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1), εμπλέκεται στην προσαρμογή του κυττάρου σε συνθήκες υποξίας. Πρόκειται για ένα ετεροδιμερές μόριο αποτελούμενο από δύο υποομάδες, την α-υποομάδα (HIF-1α) και την β-υποομάδα (HIF-1β)¹²⁰. Η ενεργότητα του HIF-1 εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την σταθερότητα της α-υποομάδας. Σε συνθήκες φυσιολογικής μερικής τάσης οξυγόνου υδροξυλάσες που περιέχουν το τμήμα προπυλ-υδροξυλάση (Prolyl Hydroxylase Domain-containing proteins – PHD) υδροξυλιώνουν συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα του HIF-1α, γεγονός που οδηγεί στην ταχεία αποδόμηση του μέσω του συστήματος της ουμπικουιτίνης^{121,122}. Σε συνθήκες υποξίας ή παρουσίας ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) οι πιο πάνω υδροξυλάσες απενεργοποιούνται, γεγονός που σταθεροποιεί τον HIF-1α^{122,123}. Αυτό επιτρέπει στον HIF-1α να διμεριστεί με τον HIF-1β και πλέον ο HIF-1 ως ετεροδιμερές να προσδεθεί στην κατάλληλη θέση (hypoxia-responsive element -HRE) στο DNA ενεργοποιώντας την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του¹²⁴. Μεταξύ των γονιδίων στόχων του HIF-1 συγκαταλέγεται και ο VEGF (Vascular endothelial growth factor) ο οποίος προάγει τη νέο-αγγειογένεση με απώτερο στόχο την αντιρρόπηση της υποξίας που ήταν και το αρχικό ερέθισμα που οδήγησε στην ενεργοποίηση του HIF-1. Επίπρόσθετα η ενεργοποίηση του HIF-1 οδηγεί στην προσαρμογή του κυττάρου στην παραγωγή ενέργειας σε συνθήκες μειωμένου οξυγόνου. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως διαμέσου δύο αλλαγών που συμβαίνουν στο κύτταρο, οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή ενέργειας μέσω γλυκόλυσης και όχι μέσω οξειδωτικής φωσφορύλιωσης στα μιτοχόνδρια. Αναλυτικότερα η ενεργοποίηση του

HIF-1 αφενός ενεργοποιεί την μεταγραφή ενζύμων που συμμετέχουν στην γλυκόλυση και αφετέρου αυξάνει την δράση της κινάσης της δευδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος (PDH kinase -PDHK) η οποία με τη σειρά της φωσφοριλιώνει και έτσι απενεργοποιεί την PDH. Όπως έχει ήδη περιγραφεί η απενεργοποίηση της PDH στερεί από τα μιτοχόνδρια το βασικό υπόστρωμα του κύκλου του Kreb's (δεν μετατρέπει το πυροσταφυλικό οξύ σε ακετυλ-συνένζυμο A (acetyl-CoA) με τελικό αποτέλεσμα αποτέλεσμα την αναστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και της χρήσης οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια^{124,125}. Τα πιο πάνω οδηγούν στην αυξημένη συγκέντρωση πυροσταφυλικού οξέως στο κυτταρόπλασμα, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται με την δράση της γαλακτικής δευδρογονάσης (LDH) σε γαλακτικό οξύ για να αποβληθεί τελικά από το κύτταρο προς τον εξωκυττάριο χώρο μέσω του διαμεμβρανικού μεταφορέα MCT4 (monocarboxylate transporter 4)^{126,127}.

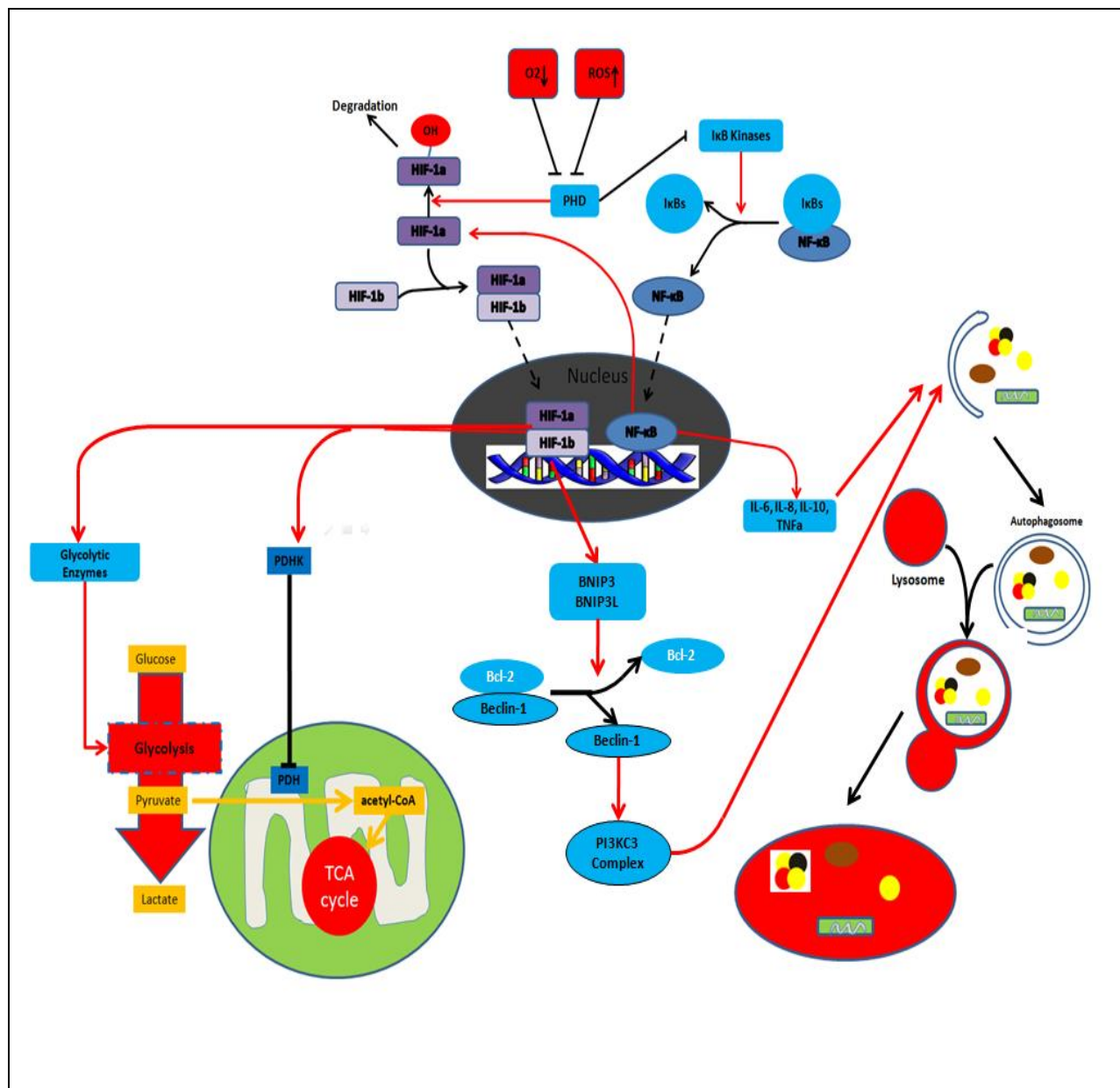
Γονίδια στόχοι του HIF-1 είναι και τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες BNIP3 και BNIP3L¹²⁷. Αυτές με τη σειρά τους μέσω του BH3-like domain που διαθέτουν ανταγωνίζονται την πρωτεΐνη Beclin-1, η οποία περιέχει το ίδιο domain, στην αλληλεπίδραση της με την πρωτεΐνη Bcl-2¹²⁷⁻¹²⁹. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της Beclin-1 από την Bcl-2, και έτσι η Beclin-1 είναι ελεύθερη να συμβάλει στη συναρμολόγηση του συμπλέγματος PI3KC3 το οποίο είναι απαραίτητο στη διεργασία της αυτοφαγίας και μιτοχονδριοφαγίας^{129,130}. Μέσω κυρίως αυτού του μηχανισμού, ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1, αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της ενεργοποίησης της αυτοφαγίας/μιτοχονδριοφαγίας.

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB, ένας από τους πλέον διαδεδομένους μεταγραφικούς παράγοντες, μεταξύ των υπόλοιπων λειτουργιών του παίζει σημαντικό ρόλο και στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας. Η αδρανοποιημένη μορφή του NF-κB παραμένει παγιδευμένη στο κυτταρόπλασμα προσδεμένη σε πρωτεΐνες αναστολές, τις IκBs (IκBa, IκBβ, IκBε, Bcl-3).

Η ενεργοποίηση του επιτυγχάνεται μέσω της δράσης του ενεργοποιημένου πρωτεϊνικού συμπλέγματος IκB Kinases (IκBK- complex), το οποίο έχει δράση κινάσης και επιδρώντας πάνω στις IκBs οδηγεί στην απελευθέρωση του NF-κB, ο οποίος με τη σειρά του εισέρχεται στον πυρήνα και μπορεί να ασκήσει τις δράσεις του, οι οποίες συνίστανται στην επαγωγή της μεταγραφής αρκετών γονιδίων¹³¹⁻¹³³. Τα γονίδια στόχοι του ρυθμίζουν πλειάδα κυτταρικών διεργασιών, όπως η ανοσολογική απόκριση, η φλεγμονή, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική μετανάστευση και η απόπτωση. Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι τόσο η υποξία όσο και η ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) οδηγούν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Οι Cummins και συνεργάτες απέδειξαν ότι οι υδροξυλάσες που περιέχουν το τμήμα προπυλ- υδροξυλάση, που όπως έχουμε αναφέρει ρυθμίζουν την ενεργότητα του HIF-1, υδροξυλιώνουν συγκεκριμένα κατάλοιπα επί του συμπλέγματος IκB Kinases οδηγώντας στη μειωμένη λειτουργικότητα του με αποτέλεσμα την μη αποδέσμευση του NF-κB από τους κυτταροπλασματικούς του αναστολείς. Σε συνθήκες υποξίας οι συγκεκριμένες υδροξυλάσες χάνουν τη λειτουργικότητα τους με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η υδροξυλίωση του συμπλέγματος IκB Kinases, το οποίο πλέον έχοντας πλήρη λειτουργικότητα φωσφοριλιώνει τις IκBs, το οποίο τις καθιστά στόχο για αποδόμηση. Η αποδόμηση αυτών των ανασταλτικών πρωτεϊνών οδηγεί στην απελευθέρωση του NF-κB ο οποίος πλέον μεταφέρεται στον πυρήνα για να ασκήσει τις δράσεις του. Έτσι συνοπτικά η μελέτη αυτή απέδειξε ότι η υποξία οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB.

Η αλληλουχία γεγονότων η οποία τελικά προάγει την αυτοφαγία διαμέσου του NF-κB δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί, αλλά τα περισσότερα πειραματικά δεδομένα συνηγορούν για την ύπαρξη αυτής της συνέργειας. Πιθανότατα ο NF-κB ασκεί την δράση του διαμέσου του HIF-1, αν και η ανεξάρτητη από τον HIF-1 δράση του επί της αυτοφαγίας δεν μπορεί πλήρως να αποκλειστεί.

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα καταδεικνύουν την αλληλεπίδραση του NF-κB και του HIF-1^{141,142}. Ο NF-κB έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί μεταγραφικό ενεργοποιητή του HIF-1. Μάλιστα οι Jung και συνεργάτες απέδειξαν ότι σε καταστάσεις με φυσιολογική μερική πίεση οξυγόνου, η μεταγραφή του HIF-1 εξαρτάται από τον NF-κB, και μάλιστα επί απουσίας της receptor-interacting protein η οποία απαιτείται για την πρόσδεση και δράση του NFκB επί του DNA, η μεταγραφή του HIF-1 αναστέλλεται¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Σε μια άλλη εργασία οι Rius και συνεργάτες, χρησιμοποιώντας κύτταρα τα οποία δεν έκφραζαν IKKb και επομένως ο NF-κB βρισκόταν διαρκώς σε κατάσταση απενεργοποίησης, απέδειξαν ότι σε συνθήκες υποξίας η μεταγραφή του HIF-1 ρυθμίζεται από τον NF-κB^{145,146}. Αντιστρόφως έχει αποδειχθεί ότι ο HIF-1 προάγει την λειτουργία του NF-κB. Ακόμα έχει αποδειχθεί ότι μεταγραφικά εξαρτώμενες από την δράση του NF-κB κυτοκίνες όπως οι IL-6, IL-8, IL-10, TNFα προκαλούν ενεργοποίηση της διεργασίας της αυτοφαγίας¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.



HIF-1 και NF-κB ως διεγέρτες της αυτοφαγίας. Η υποξία και το οξειδωτικό στρες αναστέλουν την δράση των υδροξυλασών που περιέχουν το domain προπυλ-υδροξυλάση (Prolyl Hydroxylase Domain-containing proteins –PHD) και οι οποίες υδροξυλιώνουν αφενός μεν την υπομονάδα HIF-1α οδηγώντας έτσι στην αποδόμηση μέσω του συστήματος της συμπικουιτίνης και αφετέρου δε τις IκB Kinases προκαλώντας μείωση της λειτουργικότητάς τους.

Η διάσωση της υπομονάδας HIF-1a επιτρέπει τη συναρμολόγηση του HIF (ετεροδιμερές αποτελούμενο από HIF-1a και HIF-1b) ο οποίος μεταφερόμενος στον πυρήνα του κυττάρου ασκεί την δράση του επί των γονιδίων στόχων του. Προάγει τη μεταγραφή γλυκολυτικών ενζύμων επάγοντας έτσι την γλυκόλυση ενώ συγχρόνως καταστέλλει την οξειδωτική φωσφορυλίωση αυξάνοντας την ενεργότητα της κινάσης της δευδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος (PDHK) η οποία φωσφορυλιώνοντας και με αυτό τον τρόπο απενεργοποιώντας τη δευδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος (PDH) αναστέλλει τη μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε ακετυλ-συνένζυμο A(acetyl-CoA) για να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Γονίδια στόχοι του HIF αποτελούν και τα BNIP3 και BNIP3L τα οποία ανταγωνίζονται την πρωτεΐνη Beclin στην αλληλεπίδραση της με την Bcl-2. Η περίσσεια ελεύθερης Beclin-1 συμβάλει στη συναρμολόγηση του συμπλέγματος PI3KC3 το οποίο είναι απαραίτητο για τη διεργασία της αυτοφαγίας. Η διατήρηση της λειτουργικότητας των IκB Kinases επιτρέπει την απελευθέρωση του NF-κB από τις πρωτεΐνες αναστολείς του (IκBs) στο κυτταρόπλασμα και έτσι την είσοδο του στον πυρήνα για να ασκήσει την δράση του επί των γονιδίων στόχων του. Ο NF-κB προάγει την αυτοφαγία τόσο προάγοντας την μεταγραφή του HIF όσο και μέσω της προαγωγής της μεταγραφής των κυτοκινών IL-6, IL-8, IL-10 και TNF-α.

Εικόνα 9: HIF-1 και NF-κB ως διεγέρτες της αυτοφαγίας

6.5 Αυτοφαγία στα κύτταρα του καρκινικού στρώματος

Το καρκινικό στρώμα αποτελείται από μεγάλο αριθμό κυττάρων με κυρίαρχο πληθυσμό όπως έχει αναφερθεί πιο πάνω τους σχετιζόμενους με τον καρκίνο ινοβλάστες (CAF), οι οποίοι αποτελούν βασικό συστατικό στοιχείο στην ανάπτυξη και επέκταση του όγκου. Η ταχεία

ανάπτυξη του όγκου υπερτερεί της νεοαγγειογένεσης που αποσκοπεί στην αύξηση της οξυγόνωσης για να επιτευχθεί η θρέψη του συνεχώς αυξανόμενου αριθμού των καρκινικών κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τόσο τα καρκινικά κύτταρα όσο και οι CAFs να λειτουργούν σε συνθήκες υποξίας και μειωμένης παροχής ενεργειακών προϊόντων. Τόσο η υποξία όσο και η ανεπαρκής παροχή θρεπτικών ουσιών σε ένα κύτταρο αποτελούν δυνητικούς διεγέρτες της διεργασίας της αυτοφαγίας. Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι οι συνθήκες αυτές σε συνέργεια με το οξειδωτικό στρες που χαρακτηρίζει τους CAFs (βλέπε πιο κάτω) πυροδοτούν την αυτοφαγία στους CAFs. Η κατάσταση αυτή έχει χαρακτηριστεί ως «autophagic tumor stroma»¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Το γεγονός ότι οι CAFs υφίστανται αυτοφαγία έχει δειχθεί με την χρώση ταυτόχρονης καλλιέργειας ινοβλαστών και καρκινικών κυττάρων με αντίσωμα έναντι του LC3A/B που αποτελεί δείκτη αυτοφαγίας. Σε αντίθεση με τους ινοβλάστες οι οποίοι βρίσκονταν σε καλλιέργεια μόνοι τους (χωρίς προσθήκη καρκινικών κυττάρων) και οι οποίοι δεν εμφάνιζαν χρώση με το συγκεκριμένο αντίσωμα, η μετατροπή τους σε CAFs στην συν-καλλιέργεια οδηγούσε στην αυξημένη έκφραση αυτού του δείκτη της αυτοφαγίας. Πιο άμεση απόδειξη για την αυτοφαγία στους CAFs μπορεί να θεωρηθεί η απεικόνιση, με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, αυτοφαγοσωμάτων σε CAFs, σαν αποτέλεσμα συν-καλλιέργειας¹³⁸.

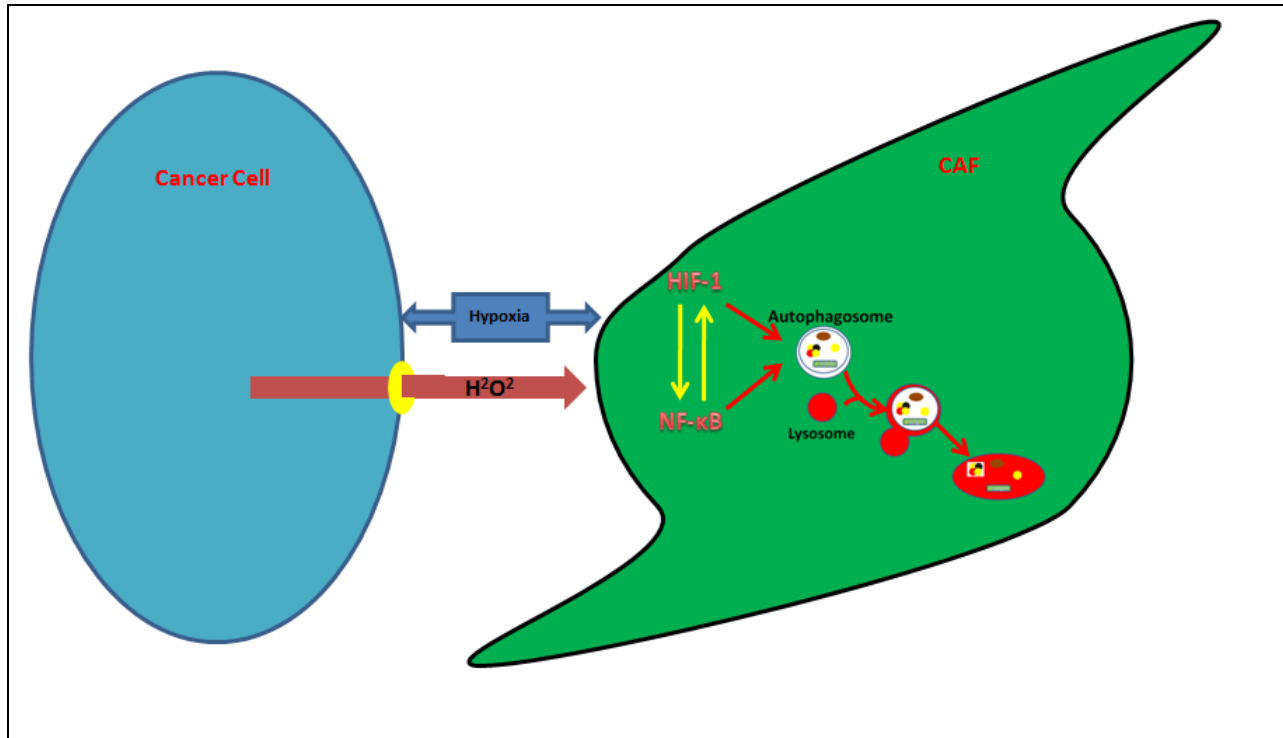
Οι Martinez και συνεργάτες χρησιμοποιώντας σύστημα συν-καλλιέργειας αθάνατων ανθρώπινων ινοβλαστών με καρκινικά κύτταρα καρκίνου του μαστού (MCF7) έδειξαν ότι η υποξία προάγει στην αυτοφαγία στους σχετιζόμενους με τον καρκίνο ινοβλάστες του καρκινικού στρώματος¹³⁸. Πιο συγκεκριμένα έδειξαν ότι τόσο οι ινοβλάστες της συν-καλλιέργειας όσο και οι ινοβλάστες οι οποίοι καλλιεργούνταν μεμονωμένα, όταν υποβάλλονταν σε έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, εμφάνιζαν δείκτες που χαρακτηρίζουν τόσο την αυτοφαγία (LC3A/B and ATG16L) όσο και την μιτοχονδριοφαγία (Bnip 3L). Η συνέχιση της μελέτης αυτής ανέδειξε

ότι η υποξία διεγείρει αυτές τις διεργασίες στους CAFs διαμέσου της ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1 και NF-κB. Μάλιστα για την εμφάνιση αυτών των κυτταρικών διεργασιών ήταν απαραίτητη η ενεργοποίηση και των δύο αυτών μεταγραφικών παραγόντων καθώς η φαρμακευτική απενεργοποίηση οποιουδήποτε τους δύο προκαλούσε διακοπή των διεργασιών αυτών^{148,150,151}. Στην ίδια εργασία δείχτηκε ότι τα αποτελέσματα που προκαλεί η υποξία στο καρκινικό στρώμα είναι ανάλογα και με το οξειδωτικό στρες, το οποίο ενεργοποιεί και αυτό τους μεταγραφικούς παράγοντες HIF1 και NF-κB και οδηγεί σε αυτοφαγία και μιτοχονδριοφαγία στους CAFs. Μάλιστα η έκθεση ινοβλαστών που βρίσκονται σε μονοκαλλιέργεια στην προ-οξειδωτική ουσία buthionine sulfoximine (BSO) δείχθηκε ότι είναι από μόνη της επαρκής για την πρόκληση αυτοφαγίας σε αυτά τα κύτταρα τα οποία πλέον έκφραζαν LC3B-II, που αποτελεί δείκτη αυτοφαγίας. Μια άλλη έρευνα από τους Lisanti και συνεργάτες επιβεβαίωσε ότι το οξειδωτικό στρες προάγει την αυτοφαγία στο στρώμα και πρόσθεσε ακόμα ότι το οξειδωτικό στρες που παρατηρείται στους CAFs προκαλείται από την δράση των καρκινικών κυττάρων¹⁵². Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε και πάλι συν-καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων και ινοβλαστών και παρατηρήθηκε ότι στο πρώτο 48ώρο της καλλιέργειας αυτής, ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) παράγονται πρωτίστως από τα καρκινικά κύτταρα και κατά την πέμπτη μέρα της καλλιέργειας οι ενεργές μορφές οξυγόνου και το επακόλουθο οξειδωτικό στρες περιορίζεται στους CAFs. Πιο συγκεκριμένα τα καρκινικά κύτταρα παράγουν υπεροξειδίο του υδρογόνου και η προσθήκη στην καλλιέργεια καταλάσης η οποία απενεργοποιεί το υπεροξειδίο του υδρογόνου αναστέλλει την εμφάνιση οξειδωτικού στρες στους CAFs. Η παρουσία οξειδωτικού στρες με τελικό αποτέλεσμα την αυτοφαγία στους CAFs καταδεικνύεται και από την έρευνα των Pavlides και συνεργατών¹⁵³. Στην έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκε ως υποκατάστατο των CAFs, κύτταρα τα οποία προέρχονταν από ποντίκια που

στερούνταν και τα δύο αλληλία του γονιδίου της caveolin-1 (τα κύτταρα αυτά εμφανίζαν πολλά από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των μυοϊνοβλαστών και κατά συνέπεια θεωρήθηκαν ανάλογα με τους CAFs, βλέπε πιο κάτω). Μελετώντας το μεταβολικό προφίλ αυτών των κυττάρων και συγκρίνοντας το με αυτό ανάλογων κυττάρων που προέρχονταν από φυσιολογικά ποντίκια προέκυψε ότι οι 'CAFs' που βρίσκονταν σε οξειδωτικό στρες, υφίστανται αυτοφαγία και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων τους. Ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο προέκυψε κατά τη σύγκριση των παραγόμενων microRNA από κύτταρα που στερούνταν την έκφραση της caveolin-1 σε αντιδιαστολή με φυσιολογικά κύτταρα. Η σύγκριση αυτή έδειξε σημαντική αύξηση στην παραγωγή δύο microRNA, των miR-31 και miR-34c, τα οποία είχε αποδειχθεί στο παρελθόν ότι εμπλέκονται στην πολύπλοκη διεργασία της καρκινογένεσης¹⁵³. Η αυξημένη έκφραση του miR-34c συμφωνεί με τα όσα αναφέρθηκαν περί οξειδωτικού στρες στα κύτταρα αυτά καθώς η έκφραση του συγκεκριμένου microRNA αυξάνει σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες. Όσον αφορά το miR-31, η αυξημένη έκφραση του πιθανό καταδεικνύει ένα από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων το οξειδωτικό στρες διεγείρει την αυτοφαγία. Το συγκεκριμένο microRNA στοχεύοντας το mRNA της πρωτεΐνης FIH (factor inhibiting HIF) οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή της FIH και κατά συνέπεια σε μειωμένη β-υδροξυλίωση του HIF-1 γεγονός που ισοδυναμεί με αυξημένη λειτουργικότητα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1, του κύριου διεγέρτη της αυτοφαγίας¹⁵⁴.

Έχουμε ήδη αναφέρει ότι τόσο η υποξία όσο και το οξειδωτικό στρες προάγουν την αυτοφαγία στο καρκινικό στρώμα διαμέσου της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Είναι επίσης γνωστό ότι ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB, αποτελεί ένα από τους κύριους μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στις διεργασίες της φλεγμονής καθώς πολλά από

τα παράγωγα των γονιδίων στόχων του π.χ κυτοκίνες είναι καθοριστικά σημεία της φλεγμονώδους απάντησης του οργανισμού.



Αυτοφαγία στους CAFs. Η υποξία η οποία χαρακτηρίζει το μικροπεριβάλλον των όγκων σε συνδυασμό με το οξειδωτικό στρες που τα καρκινικά κύτταρα επάγουν στους CAFs μέσω της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου, οδηγούν στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1 και NF-κB στους CAFs. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους οδηγούν στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας στους CAFs. Αριστερά: καρκινικό κύτταρο Δεξιά: σχετιζόμενος με τον καρκίνο ινοβλάστης.

H^2O^2 , υπεροξειδίο του υδρογόνου

Εικόνα 10: Αυτοφαγία στους CAFs

Υπάρχει κάποια σχέση φλεγμονής και αυτοφαγίας στο καρκινικό στρώμα; Απάντηση σε αυτό το ερώτημα έδωσε η εργασία των Martinez-Outschoorn και συνεργατών. Οι ερευνητές αυτοί μελετώντας συν-καλλιέργεια αθάνατων ανθρώπινων ινοβλαστών με καρκινικά κύτταρα καρκίνου του μαστού (MCF7) παρατήρησαν ότι στην καλλιέργεια αυτή οι παραγόμενοι

διαμεσολαβητές της φλεγμονής IL-6, IL-8, IL-10, MIP1a, IFN γ , RANTES and GM-CSF υπερ-παράγονταν σε σχέση με τους παραγόμενους σε μονοκαλλιέργειες ινοβλαστών ή MCF7. Με τον τρόπο αυτό επιβεβαίωσαν ότι στο μικροπεριβάλλον του όγκου επισυμβαίνουν φλεγμονώδεις διεργασίες. Στη συνέχεια έκθεσαν μονοκαλλιέργειες ινοβλαστών στις ουσίες αυτές ενώ συγχρόνως παρατηρούσαν την έκφραση από τους ινοβλάστες ενός δείκτη αυτοφαγίας, του LC3B-II. Με αυτή την πειραματική διάταξη απόδειξαν ότι κυτοκίνες όπως οι IL-6, IL-8, IL-10 μπορούν από μόνες τους να ενεργοποιήσουν τις διεργασίες της αυτοφαγίας στους CAFs του καρκινικού στρώματος¹³⁸.

Συνοψίζοντας τα πιο πάνω όσον αφορά την αυτοφαγία στους CAFs εξάγονται τα εξής συμπεράσματα: 1) στους CAFs συντελείται αυτοφαγία 2) βασικοί διεγέρτες αυτής της διεργασίας είναι η υποξία και το οξειδωτικό στρες 3) το οξειδωτικό στρες που παρατηρείται στους CAFs, τουλάχιστο εν μέρει, οφείλεται στην δράση των καρκινικών κυττάρων τα οποία παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου.

7. Διαμεμβρανικοί μεταφορείς MCTs και γαλακτικό οξύ

Οι μεταφορείς των μονοκαρβοξυλασών του γαλακτικού και του πυρουβικού οξέως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό καθώς επίσης και στη μεταβολική επικοινωνία των διαφόρων ιστών του ανθρώπινου σώματος. Η λειτουργία τους έγκειται στη μεταφορά μορίων τα οποία διαθέτουν μονοκαρβοξυλικό άκρο (μονοκαρβοξυλάσες) κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης.

Το γαλακτικό οξύ, προέρχεται από τη διάσπαση της γλυκόζης διαμέσου της γλυκόλυσης κατά τη διάρκεια του αναερόβιου μεταβολισμού των κυττάρων. Η γλυκόλυση απαιτεί την παρουσία του συνεχόμενου NAD⁺ το οποίο τελικά μετατρέπεται σε NADH. Η γαλακτική δεϋδρογενάση

καταλύει τη μετατροπή του γαλακτικού οξέως σε πυρουβικό οξύ στα κυτοσόλια οξειδώνοντας με τη σειρά της το NADH σε NAD⁺ έτσι ώστε το συνένζυμο αυτό να ανακυκλώνεται για να μπορεί η γλυκόλυση να συνεχίζεται. Το γαλακτικό οξύ στη συνέχεια μεταφέρεται από τους διάφορους ιστούς προς το ήπαρ, όπου μετατρέπεται σε πυρουβικό οξύ και τελικά σε γλυκόζη η οποία μεταφέρεται τελικά πίσω στους περιφερικούς ιστούς. Ολόκληρη αυτή η διαδικασία καλείται ο κύκλος του Cori¹⁵⁵.

Στο ήπαρ το γαλακτικό οξύ όπως έχει αναφερθεί μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό με την δράση της LDH. Το 80% του παραγόμενου πυροσταφυλικού οξέως εισέρχεται στα μιτοχόνδρια και με την καταλυτική δράση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDK) μετατρέπεται σε ακέτυλο-CoA το οποίο στη συνέχεια εισέρχεται στο κύκλο του Krebs. Το υπόλοιπο πυροσταφυλικό οξύ χρησιμοποιείται για παραγωγή γλυκόζης με το μηχανισμό της γλυκογένεσης (καταλυτική δράση του ενζύμου πυροσταφυλική καρβοξυλάση, PK)¹⁵⁵.

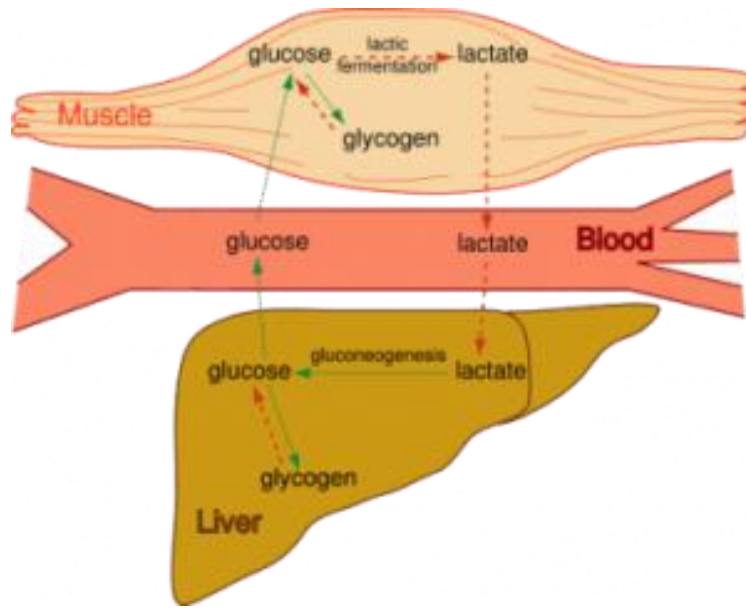
Η νεφρική συμμετοχή στο μεταβολισμό του γαλακτικού οξέως είναι μικρή και περιλαμβάνει την οξείδωση (κύκλος του Krebs), τη γλυκογένεση και τη νεφρική αποβολή. Ειδικότερα η νεφρική αποβολή του παραγόμενου γαλακτικού οξέως είναι πολύ περιορισμένη και μόνο το 0,4% του συνολικού γαλακτικού οξέως τελικά αποβάλλεται από τους νεφρούς. Η μικρή αυτή αποβολή του γαλακτικού οξέως οφείλεται στη μεγάλη απορροφητική ικανότητα των νεφρικών σωληναρίων για τα ανιόντα του γαλακτικού οξέως.

Η φυσιολογική παραγωγή γαλακτικού οξέως ανέρχεται σε 15-20mEq/kg βάρους σώματος με κύρια πηγή προέλευσης τους γραμμωτούς μύες, τα ερυθρά αιμοσφαίρια, το δέρμα και το γαστρεντερικό βλεννογόνο. Η παραγωγή του γαλακτικού οξέως ρυθμίζεται από τρεις παράγοντες οι οποίοι είναι η συγκέντρωση του πυροσταφυλικού οξέως, ο λόγος

[NADH]/[NAD⁺] (δηλαδή το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων) και η συγκέντρωση των κατιόντων H⁺ (pH).

Οι κυριότερες συνθήκες οι οποίες προκαλούν άθροιση του γαλακτικού οξέως στον οργανισμό σε κυτταρικό επίπεδο είναι η εξάντληση των αποθεμάτων σε ATP και η διαταραχή των μιτοχονδριακών οξειδωτικών λειτουργιών λόγω μειωμένης παροχής οξυγόνου. Η αναπλήρωση των ενεργειακών αποθεμάτων του κυττάρου υπό αυτές τις συνθήκες στρέφεται αναγκαστικά στην αναερόβια γλυκόλυση, η απόδοση της οποίας όμως σε σύγκριση με την οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι πολύ περιορισμένη. Στην προσπάθεια τους τα κύτταρα να εξασφαλίσουν έστω και τις στοιχειώδεις ενεργειακές τους ανάγκες χρησιμοποιούν σε υπερβολικό βαθμό την αναερόβια γλυκόλυση με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων πυροσταφυλικού οξέως και NADH τα οποία δεν μπορούν να οξειδωθούν στα μιτοχόνδρια. Τελικά η περίσσεια του πυροσταφυλικού οξέως μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ. Ταυτόχρονα όμως μειώνεται και ο μεταβολισμός του γαλακτικού οξέως στο ήπαρ λόγω της αναστολής της λειτουργίας του κύκλου του Krebs στο ηπατοκύτταρο (συνθήκες υποξίας) και της αναστολής της γλυκογένεσης. Ο συνδυασμός της αυξημένης παραγωγής και του μειωμένου αυτού μεταβολισμού οδηγεί τελικά την ανάπτυξη μεταβολικής γαλακτικής οξέωσης στον οργανισμό.

Γλυκολυτικά κύτταρα, όπως αυτά στις λευκές μυικές ίνες πρέπει άμεσα να αποβάλουν το γαλακτικό οξύ από τον ενδοκυττάριο τους χώρο, σε αντίθεση με άλλους ιστούς όπως ο εγκέφαλος, οι ερυθρές μυικές ίνες και η καρδιά, που χρειάζονται να προσλάβουν γαλακτικό οξύ για τη συνέχιση των μεταβολικών τους λειτουργιών. Όλες αυτές οι λειτουργίες τονίζουν το σημαντικό ρόλο της μεταφοράς του γαλακτικού οξέως εντός και εκτός των κυττάρων.



Εικόνα 11: Ο μεταβολισμός του γαλακτικού οξέως

Ο αναβαθμισμένος ρόλος των μονοκαρβοξυλασών (γαλακτικού οξέως, πυρουβικού οξέως) ολοκληρώνεται από την ταχεία μεταφορά τους διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, από μία ομάδα συνδεδεμένων με πρωτόνια μεμβρανικών πρωτεϊνών, οι οποίες βρίσκονται στην πλασματική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και ονομάζονται μεμβρανικοί μεταφορείς των μονοκαρβοξυλασών (MCTs). Έχουν μέχρι σήμερα περιγραφεί δεκατέσσερα διαφορετικά είδη MCTs από τα οποία μόνο έξι έχουν ταυτοποιηθεί, το καθένα από τα οποία έχει ξεχωριστή ιστική κατανομή. Όλα τα μέλη της οικογένειας των MCTs (η οποία καλείται και SLC16 solute carrier family) έχουν κοινά χαρακτηριστικά στην δομή τους. Διαθέτουν ένα διαμεμβρανικό τμήμα που αποτελείται από 12 έλικες (TMs) που καταλήγουν σε τελικά N και C κυτταροπλασματικά μέρη. Διαθέτουν επίσης μεγάλο κυτοσολικό μέρος σε σχήμα αγκύλης μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων (TMs) 6 και 7.

Οι μεταφορείς των μονοκαρβοξυλασών είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά του γαλακτικού οξέως που παράγεται στους μύες σε ένα ποσοστό 70-90%. Αν και το κοινό χαρακτηριστικό ανάμεσα

στην οικογένεια αυτή των μεταφορέων είναι η μεταφορά των μονοκαρβοξυλασών (γαλακτικού οξέως, πυρουβικού οξέως, βουτυρικού οξέως και προπιονικού οξέως) έχει περιγραφεί ότι ορισμένα μέλη από αυτή την οικογένεια μπορούν να μεταφέρουν μια ποικιλία υποστρωμάτων όπως κετονικά σώματα, αρωματικά αμινοξέα και ορισμένους φαρμακευτικούς παράγοντες όπως το γ-υδροξυβουτυρικό και τις στατίνες. Επιπρόσθετα οι MCT6, MCT8 και MCT10 μπορούν να μεταφέρουν διουρητικά, θυροειδικές ορμόνες και κάποια αμινοξέα²⁴²⁻²⁴⁴.

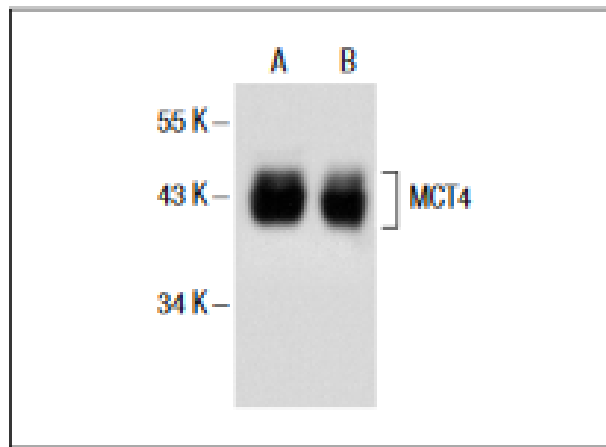
Μια αξιοσημείωτη παρατήρηση η οποία μπορεί να αποτελέσει αντικείμενο έρευνας είναι η ανάγκη σύνδεσης των μονοκαρβοξυλασών (MCT) με κάποιο άλλο μεταφορέα εντός του κυτταροπλάσματος (συγκεκριμένα μία πρωτεΐνη η οποία ανήκει στις immunoglobulin-family single-membrane pass proteins) για να μπορέσουν να μεταφερθούν στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης όπου επιτελούν και τη λειτουργία τους που είναι η μεταφορά του γαλακτικού οξέως. Ειδικότερα οι MCT1, MCT3, και MCT4 προσδένονται στο CD147, το οποίο είναι απαραίτητο για την έκφραση τους στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ η MCT2 συνδέεται με την εμπικίνη για την επίτευξη του ίδιου αποτελέσματος. Αξιοσημείωτο επίσης είναι το γεγονός ότι η έκφραση του CD147 στην κυτταρική επιφάνεια προϋποθέτει και την συν-έκφραση μιας MCT πρωτεΐνης, μια αλληλεπίδραση η οποία φαίνεται να σταθεροποιεί τις δομές και των δύο συμβαλλόμενων μερών²³⁴⁻²³⁶.

Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι οι MCT1, MCT3 και MCT4 εξαρτώνται από την ώριμη γλυκοζυλιωμένη μορφή του CD147 για να μπορέσουν να επιτελέσουν τις κυτταρικές τους λειτουργίες. Το αντίστροφο φαινόμενο επίσης έχει αποδειχθεί. Σε πειράματα απόλειψης της MCT1 σε καλλιέργειες Caco-2 κυττάρων, υπήρχε επίσης απουσία της ώριμης γλυκοζυλιωμένης μορφής του CD147 με φυσιολογική όμως παραγωγή του mRNA²⁴⁵.

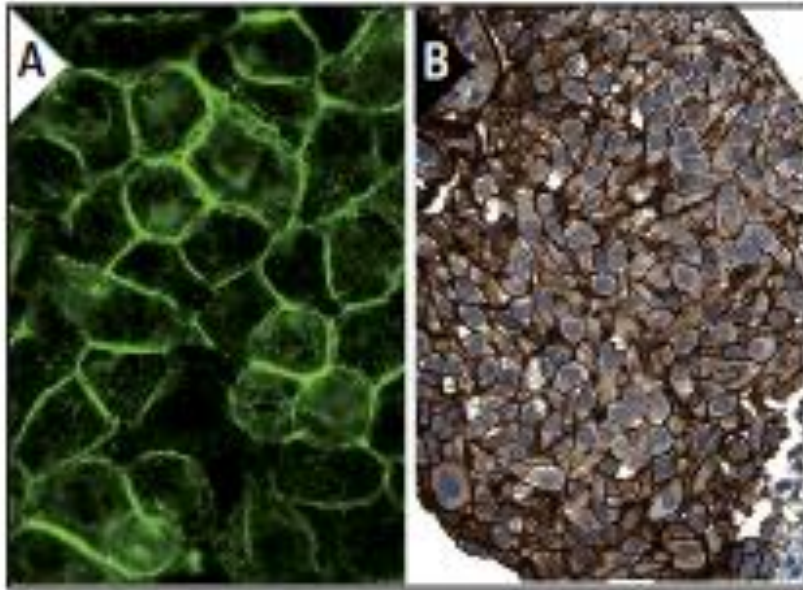
Η MCT1 κωδικοποιείται από το γονίδιο SLC16A1 και έχει μια θέση για πρόσδεση υποστρώματος στην εξωκυττάρια πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Στη θέση αυτή προσδένεται αρχικά ένα πρωτόνιο και στη συνέχεια το γαλακτικό οξύ. Μετά τη σύνδεση αυτή, η MCT1 υπόκειται μια σχηματική μετατροπή κατά την οποία μετατρέπεται στην «κλειστή» μορφή της και το τελικό αποτέλεσμα της μετατροπής αυτής είναι η μεταφορά του πρωτονίου και του γαλακτικού ανιόντος στην απέναντι πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Ο ρυθμός μεταφοράς διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης περιορίζεται από τον χρόνο που χρειάζεται η MCT1 να μετατραπεί από τη «κλειστή» μορφή της στην «ανοικτή», το οποίο όμως δεν προϋποθέτει και την πρόσδεση υποστρώματος. Λόγω αυτού είναι οικονομικά συμφέρουσα η ανταλλαγή μιας μονοκαρβοξυλάσης εντός του κυττάρου με μία άλλη η οποία βρίσκεται εκτός του κυττάρου. Η MCT1 εκφράζεται σε μεγάλο αριθμό ιστών, ιδιαίτερα όμως στην καρδιά και στους μύες, όπου αυξάνεται με την αύξηση του έργου στους ιστούς αυτούς, σημείο το οποίο αποδεικνύει τη συνεισφορά της κατά τις διεργασίες οξειδωσης του γαλακτικού οξέως¹⁵⁶.

Σε έρευνες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν, αποδείχθηκε πως η έκφραση της MCT1 σε αντίθεση με την MCT4, δεν αυξάνεται σε συνθήκες υποξίας. Ειδικότερα η έκθεση κυττάρων από ποντίκια σε συνθήκες 1% O₂ και στη συνέχεια η καλλιέργεια τους, απέδειξε αύξηση της MCT4 τρεις φορές περισσότερο από την αύξηση της MCT1. Στην ίδια έρευνα η έκθεση των κυττάρων αυτών σε CoCl₂, παρήγαγε το ίδιο φαινόμενο το οποίο συνηγορεί υπέρ της ρύθμισης της έκφρασης της MCT4 από το μεταγραφικό παράγοντα HIF1a ο οποίος αυξάνεται σε συνθήκες υποξίας¹⁵⁷. Οι προσαρμοστικές αυτές συνθήκες των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας και η αυξημένη παραγωγή γαλακτικού οξέως απαιτεί την ταχεία μεταφορά του έξω από τα κύτταρα το οποίο πραγματοποιείται με την αύξηση της έκφρασης της MCT4.

Η MCT4 κωδικοποιείται από το γονίδιο *SLC16A3*. Όπως αναλύεται με τις μεθόδους Western και Northern blot, καθώς και από τα δεδομένα των βάσεων δεδομένων EST (Expressed Sequence Tag) η έκφραση της MCT4 παρουσιάζεται σε γλυκολυτικούς ιστούς, όπως είναι οι λευκές μυικές ίνες, τα αστροκύτταρα, τα λευκά αιμοσφαίρια, τα χονδροκύτταρα καθώς και άλλες κυτταρικές σειρές που απαντώνται στα θηλαστικά. Λόγω της συγκεκριμένης κατανομής της ο ρόλος της MCT4 έχει ταυτοποιηθεί στη μεταφορά του γαλακτικού οξέως εκτός του κυτταροπλάσματος σε κύτταρα στα οποία το γαλακτικό οξύ παράγεται σε μεγάλες ποσότητες. Το μοριακό βάρος της MCT4 είναι 43 kDa.



Εικόνα 12: Ανάλυση με τη μέθοδο Western Blot της έκφρασης της MCT4 σε HCT-116 (A) και HeLA (B) κύτταρα σε πλήρη λύση



Εικόνα 13: Ανοσοϊστοχημική χρώση κυττάρων HeLA στα οποία αναδुकνεύεται μεμβρανική έκφραση της MCT4 (A) και χρώση ανοσοϋπεροξειδάσης σε κύτταρα ενδομητρίου όπου παρουσιάζεται και πάλι μεμβρανική έκφραση της MCT4 (B)

Η MCT2 εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και στους όρχεις ενώ οι MCT3 – MCT4 εκφράζονται κατά κύριο λόγο στους σκελετικούς μύες.

8. «Reverse Warburg Effect»

Όπως έχει αναφερθεί σε άλλο σημείο της ανασκόπησης αυτής, το 1926 ο Warburg εισηγήθηκε ότι τα καρκινικά κύτταρα επί παρουσίας οξυγόνου παράγουν ενέργεια μέσω της γλυκόλυσης (αερόβια γλυκόλυση- Warburg Effect). Αρκετά χρόνια μετά, οι Vincent και συνεργάτες παρατήρησαν ότι ινοβλάστες προερχόμενοι από χηλοειδή (δερματικές υπερπλασίες που αναπτύσσονται σε θέσεις τραυματισμού του δέρματος) εμφανίζουν μια τέτοια συμπεριφορά κατά την παραγωγή της απαιτούμενης ενέργειας που χρειάζονται για την επιτέλεση των λειτουργιών τους¹⁵⁸. Συγκρίνοντας αυτούς τους ‘ανώμαλους’ ινοβλάστες με φυσιολογικούς

ινοβλάστες απέδειξαν ότι οι πρώτοι εξαρτώνται κυρίως από τη γλυκόλυση για την παραγωγή του ATP σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ινοβλάστες που κυρίως παράγουν ATP στα μιτοχόνδρια μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Υπέρ της πιο πάνω διαπίστωσης συνηγορούσαν τα πιο κάτω πειραματικά δεδομένα:

1) οι ινοβλάστες των χηλοειδών παρήγαγαν μεγαλύτερες ποσότητες γαλακτικού οξέος το οποίο ως γνωστό παράγεται από την δράση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) επί του πυροσταφυλικού οξέος το οποίο αποτελεί προϊόν την γλυκόλυσης

2) υπερ-έκφραζαν τα ένζυμα *εξοκινάση* (hexokinase), *αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδη* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) και γαλακτική αφυδρογονάση (lactate dehydrogenase) τα οποία εμπλέκονται στη διεργασία της γλυκόλυσης

3) εμφάνιζαν σημαντική μείωση στην παραγωγή ATP όταν υποβάλλονταν σε φαρμακευτική καταστολή της γλυκόλυσης, σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ινοβλάστες των οποίων η παραγωγή ATP μειωνόταν κυρίως μετά από φαρμακευτική καταστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Την ίδια χρονική περίοδο, οι Christofk και συνεργάτες μελετώντας το 'Warburg Effect' σε καρκινικά κύτταρα απέδειξαν ότι η M2 ισομορφή του γλυκολυτικού ενζύμου πυροσταφυλική κινάση είναι απαραίτητη για την αερόβια γλυκόλυση¹⁵⁹. Το ένζυμο αυτό συναντάται σε δύο ισομορφές, τις M1 και M2, οι οποίες αποτελούν παράγωγα της μεταγραφής του ίδιου γονιδίου αλλά τα προϊόντα της μεταγραφής αυτής παρουσιάζουν στη συνέχεια διαφορετική επεξεργασία. Η ισομορφή M1 εκφράζεται στα κύτταρα των ενήλικων οργανισμών ενώ η ισομορφή M2 στα έμβρυα. Οι ερευνητές γνωρίζοντας ότι τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν αποκλειστικά την ισομορφή M2 έλεγξαν πειραματικά τις συνέπειες της καταστολής της έκφρασης αυτής της

ισομορφής και την αντικατάσταση της με την M1 ισομορφή στο μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων υπό φυσιολογική μερική τάση οξυγόνου. Η καταστολή της έκφρασης της ισομορφής M2 οδηγούσε σε μείωση του παραγόμενου γαλακτικού οξέος και αύξηση της κατανάλωσης οξυγόνου. Οι δύο αυτές παρατηρήσεις οδηγούσαν αβίαστα στο συμπέρασμα ότι η ισομορφή M2 διαδραματίζει σημαντικότατο ρόλο στην αερόβια γλυκόλυση και ότι η μη έκφραση της οδηγεί στην παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Ο όρος ‘Reverse Warburg Effect’ εμφανίσθηκε για πρώτη φορά από τους Pavlides και συνεργάτες¹⁶⁰. Κατά τη διάρκεια των ερευνών τους, έκαναν πρωτεομική ανάλυση σε στρωματικά κύτταρα προερχόμενα από γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που δεν έκφραζαν caveolin-1 (όπως έχει αναφερθεί οι ινοβλάστες του συγκεκριμένου πειραματόζωου εμφανίζουν τους χαρακτήρες των μυοϊνοβλαστών και κατ’ επέκταση των CAFs) παρατήρησαν ότι 8 από τις 22 πρωτεΐνες που έκφραζαν σε υψηλό βαθμό, σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα από φυσιολογικά ποντίκια, ήταν γλυκολυτικά ένζυμα. Την υπερέκφραση των ενζύμων αυτών επιβεβαίωσαν στη συνέχεια και σε μεταγραφικό επίπεδο. Ειδικότερα προς επιβεβαίωση της παρατήρησης ότι τα ένζυμα αυτά υπερεκφράζονται και στους ανθρώπινους CAFs, προχώρησαν σε ανοσοϊστοχημική μελέτη παρασκευασμάτων καρκίνου μαστού που ήταν γνωστό ότι οι CAFs τους δεν έκφραζαν την πρωτεΐνη caveolin-1. Η εξέταση αυτών των παρασκευασμάτων επιβεβαίωσε την υπερέκφραση των 8 γλυκολυτικών ενζύμων στους CAFs που δεν έκφραζαν caveolin-1. Αυτή η αυξημένη έκφραση γλυκολυτικών ενζύμων από τους CAFs ήταν προφανές ότι σήμαινε ότι στα εν λόγω κύτταρα λαμβάνει χώρα γλυκόλυση με αυξημένους ρυθμούς. Αυτό όμως που ταυτοποιούσε ότι επρόκειτο για αερόβια γλυκόλυση ήταν η αυξημένη έκφραση της ισομορφής M2 του γλυκολυτικού ενζύμου πυροσταφυλική κινάση το οποίο όπως αποδείχθηκε από άλλες έρευνες είναι ένζυμο κλειδί σε αυτό το μεταβολικό μονοπάτι. Υπέρ της αυξημένης

χρήσης γλυκόζης από τα συγκεκριμένα κύτταρα συνηγορούσε και η παρουσία αυξημένων ποσοτήτων μεταγραφημάτων μεταφορέων γλυκόζης στο μεταγραφικό τους προφίλ. Επίσης η παρουσία σε αυξημένες ποσότητες των μεταγραφημάτων των μεμβρανικών μεταφορέων γαλακτικού οξέος, MCT4 και MCT1 (mono-carboxylate transporters 1 και 4), συμφωνούσε με τη διαπίστωση ότι στα κύτταρα αυτά λάμβανε χώρα γλυκόλυση σε αυξημένους ρυθμούς καθώς το παραγόμενο από την γλυκόλυση γαλακτικό οξύ με τους μεταφορείς αυτούς θα μπορούσε να αποβληθεί από τα κύτταρα. Έχοντας επομένως αρκετά στοιχεία που υποστήριζαν ότι οι CAFs παράγουν τουλάχιστο μέρος της ενέργειας που απαιτείται για τη διατήρηση των λειτουργιών τους διαμέσου της αερόβιας γλυκόλυσης, οι ερευνητές αυτοί πρότειναν τον όρο ‘Reverse Warburg Effect’ σε αντιδιαστολή με τον όρο ‘Warburg Effect’ ο οποίος αναφερόταν στην αερόβια γλυκόλυση των καρκινικών κυττάρων και όχι των κυττάρων του καρκινικού στρώματος.

Η θεωρία του ‘Reverse Warburg Effect’ επιβεβαιώθηκε από πολλές εργασίες που ακολούθησαν και οι οποίες επιβεβαίωσαν τόσο σε μεταβολικό όσο και σε μεταγραφικό επίπεδο ότι στους CAFs λαμβάνει χώρα αερόβια γλυκόλυση¹⁶¹⁻¹⁶⁴.

Η μελέτη του μεταγραφικού προφίλ κυττάρων CAFs απομονωμένων από ανθρώπινο καρκίνο μαστού επιβεβαίωσε ότι στα κύτταρα αυτά λαμβάνει χώρα σε αυξημένους ρυθμούς γλυκόλυση¹⁶¹. Ακόμα η εξάρτηση των CAFs από την γλυκόλυση για την παράγωγή ενέργειας καταδεικνύεται και από την αυξημένη έκφραση σε αυτά τα κύτταρα του MCT4 και του BNIP3L¹⁶⁵. Το MCT4 αποτελεί δείκτη της παραγωγής και έκκρισης γαλακτικού οξέος, προϊόντος της γλυκόλυσης, ενώ το BNIP3L αποτελεί δείκτη της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων καθώς επίσης και της μιτοχονδριοφαγίας. Επίσης η εξάρτηση των CAFs από την

γλυκόλυση αποδεικνύεται και από εργασίες που δείχνουν ότι τα μιτοχόνδρια των κυττάρων που δεν εκφράζουν caveolin-1 δυσλειτουργούν¹⁶⁶⁻¹⁶⁸.

Στηριζόμενοι στα όσο έχουν περιγραφεί πιο πάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι CAFs παράγουν ενέργεια με αερόβια γλυκόλυση. Έχει επίσης παρουσιασθεί ότι στους CAFs υπάρχει υπερέκφραση της MCT4 η οποία αυξάνεται σε συνθήκες που απαιτούν μεγαλύτερη μεταφορά γαλακτικού οξέως από τα κύτταρα.

9. ‘Μεταβολικός συνεταιρισμός CAFs/καρκινικών κυττάρων’ - "Stromal-Epithelial Metabolic Coupling"

Η αερόβια γλυκόλυση στους CAFs οδηγεί στην παραγωγή δύο τελικών προϊόντων, του πυροσταφυλικού οξέως και του γαλακτικού οξέος. Το πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα μιτοχόνδρια των CAFs λόγω της δυσλειτουργίας τους, αθροίζεται στο κυτταρόπλασμα. Μέρος του μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ από την δράση της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος (LDH), η οποία αποτελεί ένζυμο το οποίο έχει αμφίδρομη δράση, δηλαδή μπορεί να μετατρέψει τόσο το πυροσταφυλικό οξύ σε γαλακτικό οξύ όσο και το γαλακτικό σε πυροσταφυλικό.

Το ερώτημα που τίθεται τώρα και χρειάζεται να απαντηθεί είναι πως χειρίζονται στη συνέχεια τους αυξημένους αυτούς μεταβολίτες οι CAFs με δεδομένο ότι δεν μπορούν να τους χρησιμοποιήσουν ως υποστρώματα για την οξειδωτική φωσφορυλίωση καθώς τα μιτοχόνδρια τους δυσλειτουργούν.

Είναι γνωστό ότι τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις το παραγόμενο σε ένα κύτταρο γαλακτικό οξύ μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί από κάποιο άλλο κύτταρο είτε στη διεργασία της γλυκονεογένεσης είτε ως υπόστρωμα (αφού μετατραπεί με τη δράση της

LDH σε πυροσταφυλικό οξύ) για την οξειδωτική φωσφορυλίωση¹⁶⁹. Αυτή η διεργασία της μετακίνησης του γαλακτικού οξέος από κύτταρο σε κύτταρο είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο για την ρύθμιση του pH όσο και για τον μεταβολισμό των κυττάρων. Η πιο πάνω διεργασία απαιτεί αφενός μεν την έξοδο του γαλακτικού οξέος από το κύτταρο στο οποίο παράχθηκε και αφετέρου την πρόσληψη του από το κύτταρο στο οποίο θα χρησιμοποιηθεί. Τόσο η έξοδος όσο και η είσοδος του γαλακτικού οξέος στα κύτταρα διαμεσολαβείται από διαμεμβρανικούς μεταφορείς, οι οποίοι ονομάζονται μεταφορείς των μονοκαρβοξυλικών (mono-carboxylate transporters-MCT).

Η είσοδος ή έξοδος μονοκαρβοξυλικών ουσιών από ένα κύτταρο, εξαρτάται εν μέρει από τον τύπο της MCT που το κύτταρο αυτό εκφράζει. Έτσι ο μεταφορέας MCT4 έχει συσχετιστεί κυρίως με την έξοδο των ουσιών αυτών από το κύτταρο ενώ ο μεταφορέας MCT1 με την είσοδο αυτών των ουσιών στο κύτταρο¹⁷⁰⁻¹⁷².

Αυτή η μεταφορά μονοκαρβοξυλικών ενώσεων συμβαίνει και στους CAFs; Και αν ναι πια κύτταρα προσλαμβάνουν και χρησιμοποιούν αυτά τα μόρια;

Η μελέτη του μεταγραφικού προφίλ CAFs απομονωμένων από ανθρώπινο καρκίνο μαστού επιβεβαίωσε ότι στα κύτταρα αυτά λαμβάνει χώρα σε αυξημένους ρυθμούς γλυκόλυση¹⁶¹. Το συγκεκριμένο μεταγραφικό προφίλ όμως παράλληλα παρουσίαζε ομοιότητες με το μεταγραφικό προφίλ της ανάλυσης κυττάρων εγκεφάλου από άτομα με νόσο Alzheimer. Αυτή η παρατήρηση προσανατόλιζε στη θεωρία ότι υπάρχει ομοιότητα μεταξύ της μεταβολικής σχέσης CAFs-καρκινικών κυττάρων και της φυσιολογικής μεταβολικής σχέσης νευρώνων-αστροκυττάρων¹⁶¹. Τα αστροκύτταρα προσαρμόζονται όσον αφορά την παραγωγή ενέργειας στην αερόβια γλυκόλυση, εκκρίνοντας στο περιβάλλον τους τα τελικά προϊόντα της γλυκόλυσης, δηλαδή

γαλακτικό και πυροσταφυλικό οξύ¹⁷³⁻¹⁷⁷. Οι δύο αυτοί πλούσιοι σε ενέργεια μεταβολίτες στη συνέχεια προσλαμβάνονται από τους παρακείμενους νευρώνες οι οποίοι τους χρησιμοποιούν για την παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Με τον πολύπλοκο αυτό μηχανισμό, τα αστροκύτταρα χρησιμοποιώντας για την παραγωγή ενέργειας την αερόβια γλυκόλυση, τροφοδοτούν με τα κατάλληλα υποστρώματα τη διαδικασία παραγωγής ενέργειας στους νευρώνες που δεν είναι άλλη από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Βασιζόμενοι σε αυτή τη παρατήρηση θα μπορούσαμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι οι CAFs μέσω της αερόβιας γλυκόλυσης τροφοδοτούν τα παρακείμενα καρκινικά κύτταρα με γαλακτικό και πυροσταφυλικό οξύ τα οποία θα χρησιμοποιηθούν από τα τελευταία για την παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Περισσότερα αποδεικτικά στοιχεία για τη μεταβολική σχέση CAFs/καρκινικών κυττάρων και της τροφοδότησης των καρκινικών κυττάρων με γαλακτικό και πυροσταφυλικό οξύ το οποίο παράγεται στους CAFs για την κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, παρουσιάστηκαν από την έρευνα των Whitaker-Menezes και συνεργατών¹⁶⁵. Στη μελέτη τους, καλλιεργήθηκαν ταυτόχρονα ινοβλάστες και καρκινικά κύτταρα (μια πειραματική διάταξη που όπως έχει αναφερθεί πιο πάνω οδηγεί στη μετατροπή των ινοβλαστών σε CAFs μέσω του οξειδωτικού στρες) παρατήρησαν ότι και οι δύο τύποι κυττάρων έκφραζαν MCT μεταφορείς, με τη διαφορά ότι οι CAFs έκφραζαν τον μεταφορέα MCT4 ενώ τα καρκινικά κύτταρα την MCT1. Η διακριτή αυτή έκφραση των δύο ισομορφών του μεταφορέα στους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς επιβεβαιώθηκε και με ανοσοσοιστοχημική χρώση παρασκευασμάτων ανθρώπινου καρκίνου μαστού, όπου δείχθηκε ότι οι CAFs εκφράζαν μόνο την MCT4 ενώ τα νεοπλασματικά κύτταρα μόνο την MCT1. Στα ίδια αποτελέσματα κατέληξε ακόμα μια

ιστοπαθολογική μελέτη η οποία κατέδειξε την παρουσία στα καρκινικά κύτταρα προστάτη του μεταφορέα MCT1 ενώ στους CAFs του μεταφορέα MCT4¹⁷⁸.

Οι Whitaker-Menezes και συνεργάτες έδειξαν ακόμα ότι η έκφραση των μεταφορέων MCT4 στους CAFs προκαλείται λόγω του οξειδωτικού στρες που υφίστανται και το οποίο όπως έχει αναλυθεί πιο πάνω το προκαλούν, τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα. Έτσι ενώ οι ινοβλάστες σε μονοκαλλιέργεια δεν έκφραζαν MCT4, άρχιζαν να την εκφράζουν μετά την επαφή τους στα πλαίσια της συν-καλλιέργειας με τα καρκινικά κύτταρα. Αν τώρα στην συν-καλλιέργεια προστίθετο η αντιοξειδωτική ουσία N-ακετυλοκυστεΐνη (N-acetylcysteine -NAC) τότε η έκφραση MCT4 από τους CAFs τερματιζόταν.

Τα πιο πάνω δεδομένα συνηγορούν με την υπόθεση ότι οι CAFs οι οποίοι βρίσκονται σε κατάσταση αερόβιας γλυκόλυσης παράγουν σε μεγάλες ποσότητες πυροσταφυλικό και γαλακτικό οξύ τα οποία στη συνέχεια εκκρίνονται από τα κύτταρα αυτά (διαμέσου των μεταφορέων MCT4 που φέρουν στην κυτταροπλασματική τους μεμβράνη) για να προσληφθούν τελικά από τα καρκινικά κύτταρα (διαμέσου των μεταφορέων MCT1 που φέρουν στην κυτταροπλασματική τους μεμβράνη) τα οποία θα χρησιμοποιήσουν τελικά τους μεταβολίτες αυτούς για την παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορλίωσης. Μια απαραίτητη προϋπόθεση για να ισχύει ο πιο πάνω περιγραφόμενος «μεταβολικός συνεταιρισμός» μεταξύ CAFs και καρκινικών κυττάρων είναι τα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων να λειτουργούν φυσιολογικά (σε αντίθεση με την υπόθεση του Warburg) ούτως ώστε να μπορούν να χρησιμοποιήσουν το πυροσταφυλικό οξύ ως υπόστρωμα στον κύκλο του Krebs για την παραγωγή ενέργειας.

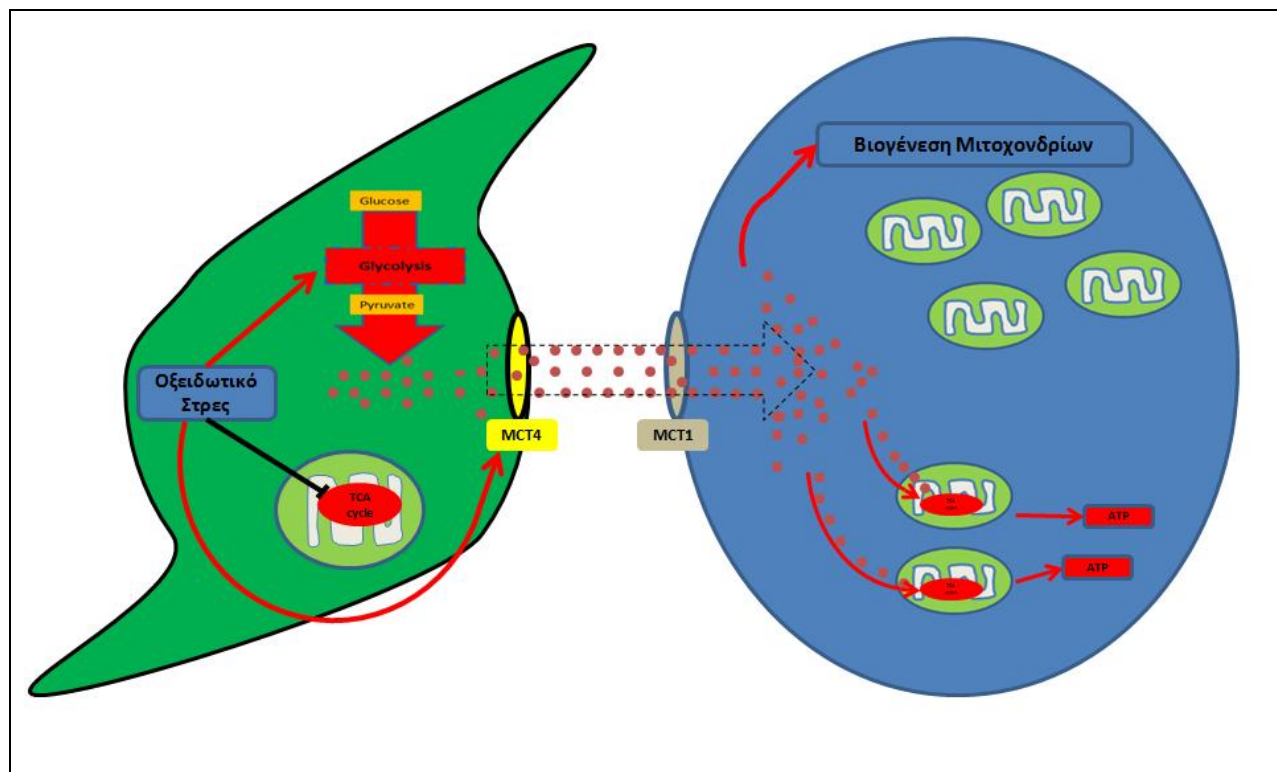
Υπέρ της ύπαρξης της πιο πάνω προϋπόθεσης συνηγορεί η απεικόνιση με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου μεγάλου αριθμού μιτοχονδρίων στα καρκινικά κύτταρα που βρίσκονται σε συν-καλλιέργεια με ινοβλάστες (CAFs)¹³⁸. Επιπρόσθετα έχει δειχθεί πειραματικά σε συν-καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων και ινοβλαστών ότι σε αντίθεση με τα μιτοχόνδρια των CAFs τα οποία δυσλειτουργούν, τα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων όχι μόνο παραμένουν λειτουργικά αλλά συγχρόνως αυξάνουν τόσο την μάζα τους όσο και τη λειτουργία τους¹⁴². Έτσι, ενώ σε μονοκαλλιέργειες ινοβλαστών και καρκινικών κυττάρων, τα καρκινικά κύτταρα εμφάνιζαν μικρότερο αριθμό μιτοχονδρίων από ότι οι ινοβλάστες, το αντίθετο παρατηρείται σε συν-καλλιέργειες ινοβλαστών/καρκινικών κυττάρων.

Σε αυτή την αλλαγή συνέβαλαν δύο ουσιαστικά στοιχεία: 1) ο αυξανόμενος αριθμός των μιτοχονδρίων των καρκινικών κυττάρων σε σχέση με τον αριθμό των μιτοχονδρίων των αντίστοιχων κυττάρων σε μονοκαλλιέργειες. 2) η μείωση του αριθμού των μιτοχονδρίων των ινοβλαστών, οι οποίοι λόγω της συν-καλλιέργειας πλέον συμπεριφέρονταν ως CAFs. Ειδικότερα η μείωση του αριθμού των μιτοχονδρίων των CAFs αποδόθηκε σε αποδόμηση μιτοχονδρίων μέσω της διεργασίας της αυτοφαγίας/μιτοχονδριοφαγίας, καθώς τα κύτταρα αυτά έκφραζαν δείκτες αυτής της διεργασίας. Όσον αφορά την αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων στα καρκινικά κύτταρα αυτή αποδόθηκε ευθέως στο γαλακτικό οξύ που απελευθερώνεται από τους CAFs καθώς παρόμοιες με τις πιο πάνω αλλαγές των μιτοχονδρίων των καρκινικών κυττάρων παρατηρήθηκαν και σε μονοκαλλιέργειες καρκινικών κυττάρων όταν σε αυτές προστέθηκε γαλακτικό οξύ.

Αυτά τα πειραματικά δεδομένα όχι μόνο συμφωνούν με τη θεωρία ότι το παραγόμενο στους CAFs, μέσω της επιτελούμενης γλυκόλυσης, γαλακτικό οξύ χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενέργειας από τα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων, αλλά ακόμα ότι το ίδιο το γαλακτικό

οξύ προάγει την βιογένεση μιτοχονδρίων στα καρκινικά κύτταρα εξασφαλίζοντας την αποδοτική του χρησιμοποίηση. Ακόμα γίνεται προφανές ότι για άλλη μια φορά η γενεσιουργός αιτία για αυτό το μεταβολικό συνεταιρισμό CAFs/καρκινικών κυττάρων είναι το οξειδωτικό στρες των CAFs το οποίο εκτός από την προαγωγή της αερόβιας γλυκόλυσης, προάγει και την έκφραση των διαμεμβρανικών μεταφορέων MCT4 στους CAFs «ανοίγοντας» έτσι την έξοδο από τους CAFs των τελικών προϊόντων της γλυκόλυσης (πυροσταφυλικό και γαλακτικό οξύ) τα οποία όταν βρεθούν στον εξωκυττάριο χώρο θα προσληφθούν από τα καρκινικά κύτταρα μέσω των MCT1 που τα κύτταρα αυτά εκφράζουν.

Οι Martinez-Outschoorn και συνεργάτες μελετώντας το αποτέλεσμα της δράση των CAFs στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων έδειξαν ότι οι CAFs προκαλούν στα καρκινικά κύτταρα την έκφραση του ενζύμου TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator) το οποίο χαρακτηρίζεται από τις τρεις ανασταλτικές του ιδιότητες. Αναστέλλει την απόπτωση, την αυτοφαγία και την γλυκόλυση¹³⁸.

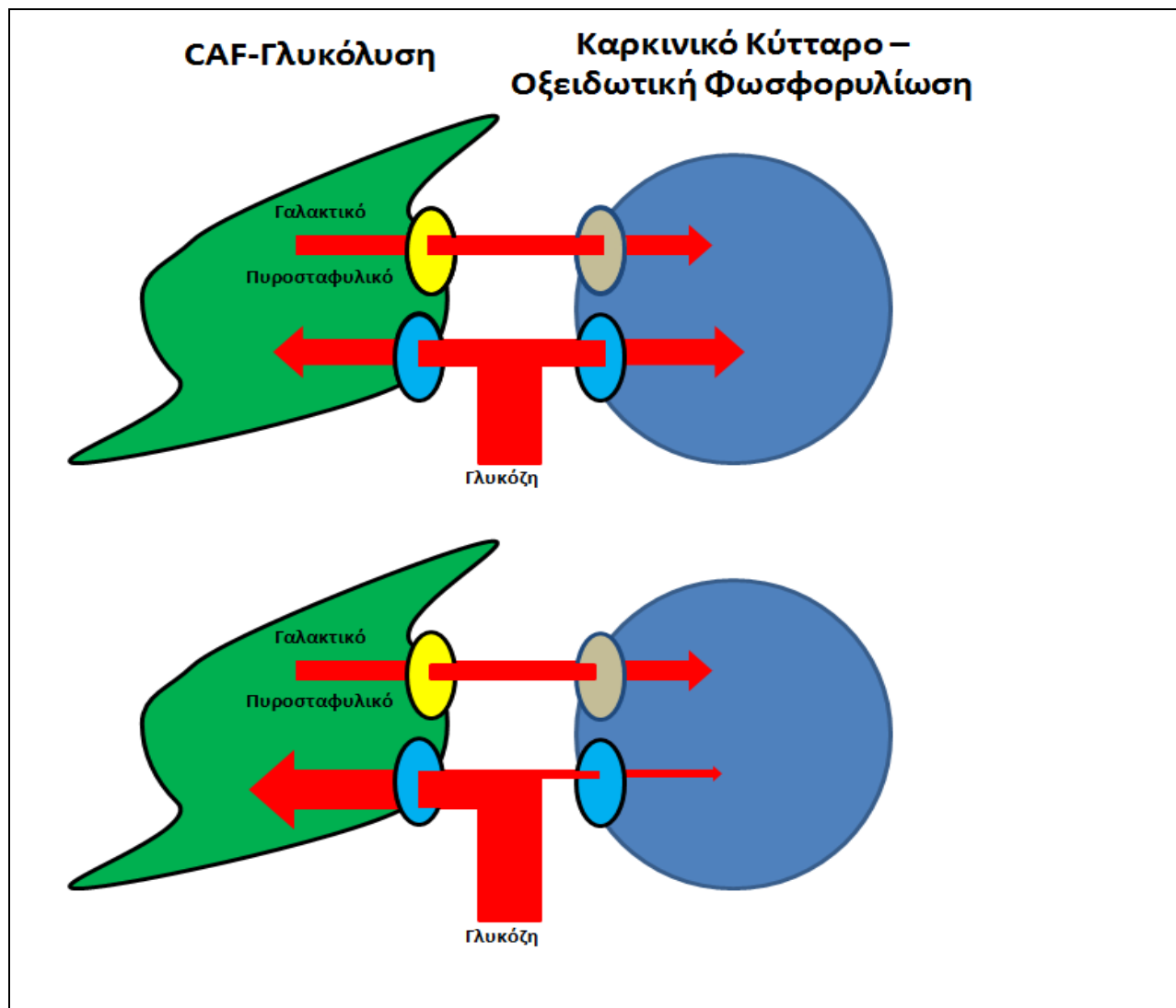


Το οξειδωτικό στρες στους CAFs οδηγεί στην αερόβια γλυκόλυση και τη δυσλειτουργία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Οι δύο αυτές αλλαγές οδηγούν σε συσσώρευση γαλακτικού/πυροσταφυλικού οξέος στους CAFs. Η περίσσεια γαλακτικού/πυροσταφυλικού οξέος εξέρχεται στον εξωκυττάριο χώρο διαμέσου των MCT4 των οποίων την έκφραση επίσης προάγει τα οξειδωτικό στρες. Από τον εξωκυττάριο χώρο το γαλακτικό/πυροσταφυλικό εισέρχεται στα καρκινικά κύτταρα διαμέσου των μεταφορέων MCT1. Στα κύτταρα αυτά ασκεί διπλή δράση: 1) προάγει την βιογένεση των μιτοχονδρίων 2) αποτελεί το καύσιμο για την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια. Αποτέλεσμα όλων των πιο πάνω κυτταρικών διεργασιών είναι το οξειδωτικό στρες των CAFs να προάγει την οξειδωτική φωσφορυλίωση των καρκινικών κυττάρων.

Εικόνα 14: Οξειδωτικό στρες στους CAFs

Αναλογιζόμενοι αυτές τις ιδιότητες του TIGAR θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι το ένζυμο αυτό διαδραματίζει ένα ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στο «μεταβολικό συνεταιρισμό» CAFs/καρκινικών κυττάρων. Όπως έχει αναλυθεί πιο πάνω οι CAFs υφίστανται αυτοφαγία και αερόβια γλυκόλυση, τροφοδοτώντας με αυτό τον τρόπο τα καρκινικά κύτταρα με μεταβολίτες τους οποίους αυτά θα χρησιμοποιήσουν για την παραγωγή ενέργειας διαμέσου του κύκλου του Krebs's. Έχουμε επίσης παρουσιάσει τον κυρίαρχο ρόλο της υποξία και του οξειδωτικό στρες στην επαγωγή των διεργασιών αυτών. Ωστόσο τόσο οι CAFs όσο και τα καρκινικά κύτταρα βρίσκονται στο ίδιο μικροπεριβάλλον με τις ίδιες εξωκυττάρια συνθήκες να επιδρούν ταυτόχρονα και στα δύο αυτά είδη κυττάρων. Επομένως τίθεται το ερώτημα γιατί οι CAFs τροφοδοτούν με μεταβολίτες τα καρκινικά κύτταρα και δεν συμβαίνει το αντίθετο, δηλαδή τα καρκινικά κύτταρα να τροφοδοτούν με μεταβολίτες τους CAFs. Το TIGAR θα μπορούσε να είναι το «ένζυμο κλειδί» για αυτή τη μονόπλευρη μεταφορά μεταβολιτών, καθώς η πιο πάνω μελέτη έχει δείξει ότι το συγκεκριμένο ένζυμο εκφράζεται μόνο στα καρκινικά κύτταρα αλλά όχι στους CAFs. Αν υποθέσουμε ότι το εξωκυττάριο περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων και των CAFs ωθεί και τους δύο κυτταρικούς τύπους προς την αυτοφαγία/μιτοχονδριοφαγία και γλυκόλυση, τότε το TIGAR επιτρέπει μόνο στους CAFs στους οποίους δεν εκφράζεται να ακολουθήσουν αυτοί τον δρόμο της αερόβιας γλυκόλυσης. Αυτό οδηγεί σε μια ανισορροπία μεταξύ CAFs και καρκινικών κυττάρων όσον αφορά τις μεταβολικές τους ανάγκες. Στη μια άκρη του φάσματος υπάρχουν οι CAFs οι οποίοι εμφανίζουν μειωμένο τόσο τον αριθμό (μέσω της μιτοχονδριοφαγίας) όσο και την λειτουργικότητα (όσα έχουν παρουσιαστεί πιο πάνω) των μιτοχονδρίων τους και επομένως μειωμένη ικανότητα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επιπρόσθετα τα κύτταρα αυτά ακολουθώντας τις «προσταγές» του εξωκυττάρια περιβάλλοντος εμφανίζουν αυξημένη γλυκόλυση και επομένως χρειάζονται αυξημένες ποσότητες γλυκόζης για

την παραγωγή της απαιτούμενης ενέργειας για την επιβίωση τους. Οι πιο πάνω συνθήκες όμως όπως διαμορφώνονται δεν επιτρέπουν στους CAFs να χρησιμοποιήσουν τα τελικά προϊόντα της γλυκόλυσης (πυροσταφυλικό και γαλακτικό οξύ) για την παραγωγή ενέργειας καθώς τα μιτοχόνδρια τους δυσλειτουργούν. Στην άλλη άκρη υπάρχουν τα καρκινικά κύτταρα στα οποία η έκφραση του TIGAR έχει αναστείλει την γλυκόλυση, υπάρχει εξάρτηση για την παραγωγή ενέργειας από την οξειδωτική φωσφορυλίωση και μεταβολίτες όπως το πυροσταφυλικό και γαλακτικό οξύ είναι απαραίτητοι για τη διεκπεραίωση των μεταβολικών τους λειτουργιών. Κάτω από αυτά τα δεδομένα μπορεί να αναλυθεί η μεταβολική σχέση CAFs/καρκινικών κυττάρων ως ένας υπαρκτός «συνεταιρισμός» διαμέσου του οποίου επωφελούνται όχι μόνο τα καρκινικά κύτταρα αλλά και οι CAFs οι οποίοι ναι μεν προσφέρουν στα καρκινικά κύτταρα πυροσταφυλικό και γαλακτικό οξύ, αλλά ταυτόχρονα με τον τρόπο αυτό μειώνουν τις ανάγκες των καρκινικών κυττάρων σε γλυκόζη. Με αυτό τον τρόπο οι CAFs, οι οποίοι εξαρτώνται απόλυτα από την γλυκόζη για να διατηρηθούν στη ζωή, μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη μεγαλύτερη ποσότητα της γλυκόζης που φτάνει στον όγκο (Εικόνα 6).



Στις σχέσεις «ξενιστή- παρασίτου» δημιουργείται μια καινούρια ισορροπία. Κάτι ανάλογο πιθανός να συμβαίνει και κατά το "Stromal-Epithelial Metabolic Coupling". Άνω ένα φαινόμενο παρασιτισμού: Το καρκινικό κύτταρο «κλέβει» μεταβολίτες από τον CAF, ενώ ο CAF δεν έχει κάποιο όφελος από αυτόν τον μεταβολικό συνεταιρισμό. Κάτω ένα φαινόμενο συμβίωσης: Στην καινούρια ισορροπία που δημιουργείται, αφενός μεν το καρκινικό κύτταρο επωφελείται των μεταβολιτών που του παρέχει ο CAF, αφετέρου ο CAF καλύπτοντας τις ενεργειακές ανάγκες του καρκινικού κυττάρου με τους μεταβολίτες που του προσφέρει μπορεί να χρησιμοποιήσει τη μεγαλύτερη ποσότητα γλυκόζης που φτάνει δια της κυκλοφορίας στον όγκο προ δικό του όφελος.

Εικόνα 15: Συμβίωση CAFs και καρκινικών κυττάρων

10. Το 'Reverse Warburg Effect' και το "Stromal-Epithelial Metabolic Coupling" προάγουν τις διεργασίες της καρκινογένεσης.

Σημαντικό στην κλινική πράκτική είναι η αποσαφήνιση της σημασίας που έχει αυτός ο μεταβολικός συνεταιρισμός CAFs και καρκινικών κυττάρων, ή όπως αλλιώς έχει αναφερθεί «Stromal-Epithelial Metabolic Coupling» και πως τα πιο πάνω δεδομένα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία των διαφόρων μορφών καρκίνου. Τα αποτελέσματα της έρευνας των Bonucci και συνεργατών έδωσαν πολύτιμες πληροφορίες όσον αφορά την σπουδαιότητα αυτού του συνεταιρισμού στην ανάπτυξη του όγκου¹⁸⁰. Οι ερευνητές εμφύτευσαν σε κατάλληλο πειραματόζωο ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού (MDA-MB-231 cells) σε συνδυασμό με ινοβλάστες που προέρχονταν από φυσιολογικά ποντίκια ή από γενετικά τροποποιημένα ποντίκια τα οποία δεν έκφραζαν caveolin-1. Στο τέλος της περιόδου παρακολούθησης οι προκαλούμενοι όγκοι που περιείχαν τους ινοβλάστες που δεν έκφραζαν caveolin-1 ήταν κατά 2.5 φορές μεγαλύτεροι από αυτούς που περιείχαν ινοβλάστες από φυσιολογικά ποντίκια. Οι ινοβλάστες που δεν εκφράζουν caveolin-1 συμπεριφέρονται σαν CAFs, παράλληλα οι CAFs έχει δειχθεί ότι προάγουν την ανάπτυξη του όγκου διαμέσου διάφορων μηχανισμών π.χ αυξάνοντας την νεοαγγειογένεση στον όγκο γεγονός που παρατηρήθηκε και κατά τη διάρκεια αυτής της πειραματικής διάταξης. Για να διευκρινιστεί κατά πόσο το «Reverse Warburg Effect» και ο «μεταβολικός συνεταιρισμός» που δημιουργείται μεταξύ CAFs και καρκινικών κυττάρων συμμετέχει στην ανάπτυξη του όγκου χορήγησαν στα πειραματόζωα, στα οποία έγινε η εμφύτευση των καρκινικών κυττάρων συνοδευόμενων με CAFs, δύο αναστολείς της γλυκόλυσης (2-deoxy-D-glucose και dichloro-acetate). Τα αποτελέσματα ήταν θεαματικά καθώς οι αναστολείς αυτοί οδήγησαν σε μείωση του μεγέθους των αναπτυσσόμενων όγκων κατά 4.5 φορές σε σχέση με τους όγκους που αναπτύχθηκαν στα αντίστοιχα πειραματόζωα χωρίς την

χορήγηση των αναστολέων. Καθώς οι αναστολείς αυτοί ανέστελλαν την γλυκόλυση στους CAFs, τερμάτιζαν το μεταβολικό συνεταιρισμό CAFs/καρκινικών κυττάρων, στερώντας από τα καρκινικά κύτταρα χρήσιμους μεταβολίτες (γαλακτικό/πυροσταφυλικό) με τελική συνέπεια την βραδύτερη ανάπτυξη του όγκου.

Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και από μια παρόμοια πειραματική διάταξη, κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα εμφυτεύθηκαν σε κατάλληλο πειραματόζωο σε συνδυασμό με ένα από δύο διαφορετικούς τύπους ινοβλαστών. Ο πρώτος τύπος ινοβλαστών αφορούσε ινοβλάστες με μεγάλη μιτοχονδριακή μάζα και προτίμηση στην παραγωγή ενέργειας μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης ενώ ο δεύτερος τύπος ινοβλαστών αφορούσε ινοβλάστες με μικρή μιτοχονδριακή μάζα και προτίμηση για την παραγωγή ενέργειας τη γλυκόλυση. Οι όγκοι που αναπτύχθηκαν όταν τα καρκινικά κύτταρα εμφυτεύθηκαν με ινοβλάστες που προτιμούσαν την γλυκόλυση ήταν κατά 4 φορές μεγαλύτεροι σε μάζα και κατά 8 φορές μεγαλύτεροι σε όγκο σε σχέση με τους όγκους που περιείχαν ινοβλάστες που παρήγαγαν ενέργεια με οξειδωτική φωσφορυλίωση¹⁸¹.

Τα πιο πάνω πειραματικά δεδομένα συνηγορούν υπέρ της σημαντικής επίδρασης που έχει στην ανάπτυξη ενός όγκου η χρησιμοποίηση για την οξειδωτική φωσφορυλίωση εντός των καρκινικών κυττάρων μεταβολιτών (πυροσταφυλικό οξύ και γαλακτικό οξύ) που παράγονται κατά την αερόβια γλυκόλυση στους παρακείμενους CAFs. Μήπως όμως αυτός ο συνεταιρισμός συμβάλει στις διεργασίες της καρκινογένεσης και με μηχανισμούς ανεξάρτητους από την απλή χρήση των παραγόμενων από τους CAFs μεταβολιτών από τα καρκινικά κύτταρα για την παραγωγή ενέργειας;

Τα αυξημένα επίπεδα ενεργών μορφών οξυγόνου μπορούν να προκαλέσουν βλάβες του DNA. Αυτές οι βλάβες μπορεί να αφορούν ρήξη στη μία ή και στις δύο αλυσίδες του μορίου του DNA ή μπορεί να μην αφορούν βλάβες του DNA αλλά επιγενετικές τροποποιήσεις της έκφρασης ογκογονιδίων, ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή γονιδίων που τα προϊόντα τους εμπλέκονται στις κυτταρικές διεργασίες επιβίωσης και απόπτωσης. Ακόμα οι ROS προκαλώντας δυσλειτουργία στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA δημιουργούν γενετική αστάθεια αυξάνοντας τη συχνότητα των τυχαίων μεταλλάξεων¹⁸²⁻¹⁸⁴.

Οι CAFs υφίστανται οξειδωτικό στρες το οποίο είναι ανάλογο με τα αυξημένα επίπεδα ROS. Τα κύτταρα αυτά επομένως δυνητικά μπορούν να υποστούν βλάβες του DNA τους. Οι Martinez-Outschoorn και συνεργάτες χρησιμοποιώντας το αντίσωμα gamma-H2AX το οποίο προσδένεται σε διπλά σπασίματα του DNA (DNA-double-strand breaks) απέδειξαν ότι κάτι τέτοιο πραγματικά συμβαίνει στους CAFs. Όμως το πιο σημαντικό εύρημα αυτής της χρώσης, η οποία έγινε σε συν-καλλιέργεια CAFs και καρκινικών κυττάρων, ήταν ότι διπλά σπασίματα του DNA δεν υφίστανται μόνο οι CAFs της συν-καλλιέργειας αλλά και τα καρκινικά κύτταρα. Μάλιστα αυτές οι βλάβες του DNA των καρκινικών κυττάρων αποδόθηκαν στην παρουσία των CAFs καθώς τα καρκινικά κύτταρα σε μονο-καλλιέργεια δεν εμφάνιζαν τέτοιες βλάβες. Ο αιτιολογικός ρόλος των ROS όσον αφορά τις βλάβες του DNA επιβεβαιώθηκε με τη προσθήκη μιας αντιοξειδωτικής ουσίας (NAC) σε συν-καλλιέργεια ινοβλαστών/καρκινικών κυττάρων καθώς σε αυτή την συν-καλλιέργεια δεν παρατηρήθηκαν διπλά σπασίματα του DNA¹⁴².

Στην ίδια πειραματική διάταξη αποκαλύφθηκε ακόμα ότι τα καρκινικά κύτταρα που συν-καλλιεργούνται με CAFs εμφανίζουν ανευπλοειδία σε υψηλότερη συχνότητα από τα καρκινικά κύτταρα που βρίσκονται σε μονο-καλλιέργεια.

Οι αυξημένες συγκεντρώσεις ROS τόσο μέσω βλαβών στο DNA όσο και βλαβών σε άλλα κυτταρικά συστατικά μπορούν να προάγουν την κυτταρική απόπτωση. Ωστόσο σε συν-καλλιέργεια CAFs/καρκινικών κυττάρων όπου τα κύτταρα, κυρίως οι CAFs, βρίσκονται σε οξειδωτικό στρες, δεν αυξάνει η απόπτωση σε κανένα από τους δύο τύπους κυττάρων. Ειδικότερα τα καρκινικά κύτταρα σε αυτές τις συν-καλλιέργειες εμφανίζουν απόπτωση με ρυθμό κατά 6 φορές μικρότερο από τα αντίστοιχα κύτταρα που βρίσκονται σε μονοκαλλιέργεια. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι οι CAFs προάγουν την παραγωγή στα καρκινικά κύτταρα ουσιών που τα προστατεύουν από την απόπτωση. Μια τέτοια ουσία με γνωστές αντι-αποπτωτικές ιδιότητες σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες η οποία αναδείχθηκε, με χρώση με κατάλληλο αντίσωμα σε συν-καλλιέργειες, ότι υπερεκφράζεται από τους CAFs αλλά κυρίως από τα καρκινικά κύτταρα είναι η αντιοξειδωτική ουσία peroxiredoxin-1. Η ίδια όμως ουσία είχε δείχθει ότι υπερεκφράζεται και σε κύτταρα προερχόμενα από γενετικά τροποποιημένα ζώα που δεν εκφράζουν caveolin-1. Μάλιστα σε αυτά τα κύτταρα η υπερέκφραση της peroxiredoxin-1 επιβεβαιώθηκε κατά την πρωτεωμική ανάλυση αυτών των κυττάρων¹⁸⁵.

Μείωση της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων που βρίσκονται σε συν-καλλιέργεια με ινοβλάστες δόθηκε από ακόμα μια μελέτη. Μάλιστα σε αυτή την μελέτη η μείωση της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων σχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με το επίπεδο έκφρασης της caveolin-1 στους ινοβλάστες της συν-καλλιέργειας. Όσο πιο χαμηλό ήταν το επίπεδο έκφρασης της caveolin-1 στους ινοβλάστες τόσο πιο ανθεκτικά στην απόπτωση ήταν τα καρκινικά κύτταρα ενώ ταυτόχρονα πιο ανθεκτικοί στην απόπτωση εμφανίζονταν και οι CAFs. Η συμμετοχή των CAFs στην αναστολή της απόπτωσης επί των καρκινικών κυττάρων αποδόθηκε στην ικανότητα των πρώτων να προάγουν την έκφραση του ενζύμου TIGAR (TP53-

induced glycolysis and apoptosis regulator) στα καρκινικά κύτταρα το οποίο έχει αντιαποπτωτικές ιδιότητες⁸⁵.

Τα πιο πάνω πειραματικά δεδομένα προτείνουν ότι το οξειδωτικό στρες το οποίο όπως έχει παρουσιαστεί πιο πάνω αποτελεί τη γενεσιουργό αιτία του «μεταβολικού συνεταιρισμού CAFs/καρκινικών κυττάρων», εκτός από τη συμμετοχή στην παραγωγή χρήσιμων για τα καρκινικά κύτταρα θρεπτικών μεταβολίτων από τους CAFs συμβάλει και με άλλους μηχανισμούς στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Η πρόκληση βλαβών του DNA και ανευπλοειδίας στα καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε περαιτέρω εξαλλαγή του όγκου με απόκτηση πιο επιθετικών χαρακτήρων. Ακόμα η αντιαποπτωτική δράση των CAFs επί των καρκινικών κυττάρων συμβάλει στην ενσωμάτωση αυτών των γενετικών αλλαγών στο γενετικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων.

11. Η σημασία του «Reverse Warburg Effect» και του «Stromal-Epithelial Metabolic Coupling» για τον ασθενή με καρκίνο

Το «Reverse Warburg Effect» και το «Stromal-Epithelial Metabolic Coupling» όπως έχουν εκτενώς παρουσιαστεί πιο πάνω έχουν τεκμηριωθεί αρκετά τόσο in vitro όσο και in vivo σε πειραματόζωα. Το ερώτημα όμως που παραμένει να απαντηθεί είναι αν η αποσαφήνιση αυτών των διεργασιών που συμβαίνουν σε κυτταρικό επίπεδο μπορεί να επηρεάσει ουσιαστικά τη ζωή των πασχόντων από κακοήθεια. Οι τρόποι μέσω των οποίων τέτοιες κυτταρικές διεργασίες θα μπορούσαν να συσχετισθούν με τον ασθενή με κακοήθεια είναι οι εξής δύο:

1) Οι διεργασίες αυτές να σχετίζονται με την έκφραση συγκεκριμένων κυτταρικών δεικτών. Αν οι δείκτες αυτοί αποδειχθούν ότι έχουν προγνωστική αξία για τον πάσχοντα τότε η χρήση τους θα μπορούσε να κατατάξει τους ασθενείς αυτούς σε χαμηλού και υψηλού κινδύνου,

βοηθώντας τον ακριβέστερο καθορισμό της πρόγνωσης. Ο καθορισμός της πρόγνωσης του εκάστοτε ασθενούς συνδέεται άρρηκτα και με τον σχεδιασμό της θεραπευτικής αγωγής. Ειδικότερα, αν ένας ασθενής κατατάσσεται με τη χρήση των αποτελεσμάτων των κυτταρικών αυτών δεικτών στην ομάδα υψηλού κινδύνου και κακής πρόγνωσης, τα χημειοθεραπευτικά σχήματα τα οποία θα χρησιμοποιηθούν μπορεί να είναι πιο επιθετικά από την έναρξη της αγωγής, αφού θα γνωρίζουμε εκ των προτέρων την επιθετική συμπεριφορά της κακοήθειας. Η ανεύρεση κατάλληλων προγνωστικών δεικτών είναι καθοριστικής σημασίας για τον ασθενή με κακοήθεια.

2) Όπως έχει παρουσιαστεί πιο πάνω οι διεργασίες αυτές συμβάλουν σημαντικά στις διεργασίες της καρκινογένεσης (π.χ συμβάλουν στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων διαμέσου της προσφοράς σε αυτά κατάλληλων μεταβολιτών για την παραγωγή της απαιτούμενης ενέργειας που απαιτείται για την επιβίωση τους). Σήμερα μεγάλο μέρος της επιστημονικής κοινότητας ασχολείται με την ανακάλυψη και εφαρμογή νέων θεραπευτικών σχημάτων κατά των διαφόρων νεοπλασιών. Η δημιουργία φαρμάκων τα οποία ενδεχομένως θα μπορούσαν να αναστείλουν τα μεταβολικά εκείνα μονοπάτια τα οποία οδηγούν στην τροφοδοσία των καρκινικών κυττάρων με μεταβολίτες απαραίτητους για τη θρέψη τους ενδεχομένως να μπορεί να συμβάλλει και στη μεγαλύτερη επιβίωση ή και θεραπεία στους ασθενείς αυτούς. Τα θεραπευτικά αυτά σχήματα μπορούν να χρησιμοποιούν για παράδειγμα μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία θα προσδένονται εκλεκτικά σε κάποιο σημαντικό κυτταρικό μόριο το οποίο να το αδρανοποιούν, εμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό τις δυσμενείς επιπτώσεις από τη λειτουργία του. Η στοχευόμενη φαρμακευτική θεραπεία σίγουρα υπερέχει των σημερινών κυτταροστατικών φαρμάκων τα οποία έχουν μη εκλεκτική δράση, καταστρέφοντας

ταυτόχρονα και τα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού προκαλώντας μεγάλο αριθμό επιπλοκών.

12. Προγνωστικοί δείκτες οι οποίοι σχετίζονται με το «Reverse Warburg Effect» και το "Stromal-Epithelial Metabolic Coupling"

Οι δύο αυτοί όροι που έχουν αναλυθεί εκτενώς στο πλαίσιο αυτής της ανασκόπησης του κυτταρικού μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων αποτέλεσαν και το βασικό υπόστρωμα κατά τη δημιουργία του ερευνητικού πρωτοκόλλου. Το «Reverse Warburg Effect» και το «Stromal-Epithelial Metabolic Coupling» είναι όροι οι οποίοι εμφανίστηκαν σχετικά πρόσφατα στη βιβλιογραφία και με αυτό το δεδομένο αναζητώντας στις διεθνείς βάσεις δεδομένων υπάρχουν μόνο λίγες μελέτες που να προσπαθούν να αξιολογήσουν τη σύνδεση των δύο αυτών φαινομένων με διάφορα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των νεοπλασιών και κατ' επέκταση με την πρόγνωση ασθενών με διάφορες μορφές κακοήθειας. Τα αποτελέσματα που έχουν μέχρι σήμερα ανακοινωθεί είναι σαφώς ιδιαίτερα ενθαρρυντικά καθώς έχει ήδη αποδειχθεί ότι κυτταρικοί δείκτες που χαρακτηρίζουν τα δύο αυτά κυτταρικά φαινόμενα, όπως είναι η αυξημένη έκφραση της MCT4 στα κύτταρα του στρώματος (και συγκεκριμένα στους CAFs) έχουν κλινική εφαρμογή και προγνωστική αξία για τους ασθενείς. Παράλληλα η επιβεβαίωση της προγνωστικής αξίας τέτοιων δεικτών μέχρι σήμερα σε διαφορετικές μελέτες, σε διάφορους τύπους μη σχετιζόμενων μεταξύ τους κακοηθειών (όπως καρκίνος μαστού, στομάχου, εγκεφάλου και προστάτη) αποτελεί αν όχι απόδειξη τουλάχιστο ένδειξη ότι τα φαινόμενα αυτά συμβαίνουν και σε αρκετούς άλλους τύπους κακοηθειών και επομένως αυξάνει το δυνητικό αριθμό των ασθενών με κακοήθεια, στους οποίους θα μπορούσαν οι κυτταρικοί αυτοί δείκτες να αξιοποιηθούν στην καθημερινή κλινική πράξη .

Υπό το πρίσμα αυτών των δεδομένων, ο καρκίνος του μαστού είναι ο πλέον μελετημένος με ιδιαίτερη έμφαση στις εργασίες που έχουν μέχρι τώρα ολοκληρωθεί, στην απώλεια της έκφρασης της caveolin-1 από τους CAFs στο στρώμα που περιβάλλει τα καρκινικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού και τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης στα ίδια κύτταρα του διαμεμβρανικού μεταφορέα μονοκαρβοξυλασών, MCT4. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών έχουν συσχετίσει τους κυτταρικούς αυτούς δείκτες (συγκεκριμένα την απώλεια έκφρασης της caveolin-1 και την έκφραση της MCT4) θετικά με:

- 1) την υποτροπή του όγκου
- 2) την εμφάνιση μεταστάσεων
- 3) την ανάπτυξη αντοχής στην φαρμακευτική θεραπεία
- 4) χαμηλό προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών

Οι Witkiewicz και συνεργάτες παρακολουθώντας 78 γυναίκες, από 4 μέχρι και 208 μήνες, που υποβλήθηκαν σε ευρεία εκτομή ως μονοθεραπεία για DCIS του μαστού (Ductal Carcinoma In Situ, Πορογενές καρκίνωμα in situ) απέδειξαν ότι η μη έκφραση ή έκφραση σε χαμηλά επίπεδα της caveolin-1 στο στρώμα αυτού του τύπου κακοήθειας προδιαθέτει στην υποτροπή της νόσου καθώς επίσης και στην εξαλλαγή της σε διηθητικό καρκίνο¹⁸⁷. Αναλυτικότερα εστιάζοντας στους 56 ασθενείς των οποίων ο όγκος έκφραζε υποδοχείς οιστρογόνων, ανέδειξαν ότι σε αυτή την υποομάδα των ασθενών η μη έκφραση της caveolin-1 από τους CAFs συσχετιζόταν με 100% (5/5) υποτροπή του όγκου και με 80% (4/5) εξαλλαγή της νόσου σε διηθητικό καρκίνωμα. Σε αντιδιαστολή με τα πιο πάνω οι ασθενείς οι οποίοι είχαν θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων των οποίων οι CAFs έκραζαν σε υψηλά επίπεδα caveolin-1 (σύνολο 36 ασθενών) εμφάνιζαν πολύ χαμηλότερο ποσοστό υποτροπής της νόσου, το οποίο ήταν 14% (5/36), και μόνο σε ένα από

αυτούς τους ασθενείς (3%) ο όγκος εξαλλάχθηκε σε διηθητικό καρκίνωμα. Όσον αφορά τώρα τους 15 ασθενείς οι οποίοι αφενός μεν εμφάνιζαν υποδοχείς οιστρογόνων και αφετέρου οι CAFs έκφραζαν σε χαμηλά επίπεδα caveolin-1, το ποσοστό υποτροπής ήταν ενδιάμεσο σε σχέση με τις δύο πιο πάνω υποομάδες, και ήταν στο 40%. Τα ποσοστά υποτροπής της νόσου στις τρεις υποομάδες, όπως αυτές αναλύθηκαν πιο πάνω, εμφάνιζαν μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά (p-value=0.00148). Τέλος στατιστικά σημαντική διαφορά (p-value 0,00031) παρατηρήθηκε και όσον αφορά τον χρόνο εμφάνισης εξαλλαγής του in situ καρκινώματος σε διηθητικό καρκίνο μεταξύ των τριών υποομάδων όπως αυτές διαχωρίστηκαν με κριτήριο τα επίπεδα έκφρασης της caveolin-1 από τους CAFs. Ιδιαίτερη σημασία έχει η παρατήρηση ότι, ενώ στους ασθενείς που οι CAFs εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα την caveolin-1 ο μέσος όρος εμφάνισης διηθητικού καρκινώματος μετά από την χειρουργική αφαίρεση του DCIS είναι 171 μήνες ο χρόνος αυτός πέφτει στους 89 μήνες στην υποομάδα των ασθενών των οποίων οι CAFs δεν εκφράζουν την caveolin-1.

Σε μια άλλη έρευνα οι Witkiewicz και συνεργάτες απέδειξαν ότι η μη έκφραση της caveolin-1 στους CAFs αποτελεί κακό προγνωστικό παράγοντα και σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα μαστού¹⁸⁸. Αναλύοντας δεδομένα τα οποία είχαν συλλεγεί από 154 ασθενείς με μέσο χρόνο παρακολούθησης 8,4 χρόνια, κατέδειξαν ότι η μη έκφραση caveolin-1 από τους CAFs σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την πρόωρη υποτροπή της νόσου, με προχωρημένο στάδιο της νόσου, με παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και κατά συνέπεια των πιο πάνω με μειωμένο διάστημα ελεύθερο νόσου. Πρωιμότερη υποτροπή της νόσου παρατηρήθηκε στους ασθενείς των οποίων οι CAFs δεν έκφραζαν caveolin-1 ανεξάρτητα από το στάδιο της νόσου σύμφωνα με τη σταδιοποίηση TNM, από την έκφραση ή μη υποδοχέων οιστρογόνων (ER+ ή

ER-), προγεστερόνης (PR+/PR-) και ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα τύπου 2 (HER2+/HER2-). Η ελεύθερη νόσου πενταετής επιβίωση στους ασθενείς εκείνους των οποίων οι CAFs έκφραζαν σε χαμηλά επίπεδα ή δεν έκφραζαν καθόλου την caveolin-1 ήταν μόλις 19,1% σε σύγκριση με το 83,1% των ασθενών των οποίων οι CAFs έκφραζαν caveolin-1 (p-value < 0,001). Η διαφορά αυτή γινόταν ακόμα πιο αισθητή όσον αφορά την ελεύθερη νόσου πενταετή επιβίωση σε σχέση με την έκφραση ή όχι της caveolin-1 στους CAFs μεταξύ των ασθενών που εμφάνιζαν κατά την χειρουργική αντιμετώπιση της νόσου διηθημένους λεμφαδένες. Έτσι ενώ η ελεύθερη νόσου πενταετής επιβίωση στις ασθενείς με διηθημένους λεμφαδένες και έκφραση της caveolin-1 από τους CAFs ήταν 79%, αυτή μειωνόταν στο 7% στους ασθενείς με διηθημένους λεμφαδένες των οποίων οι CAFs δεν έκφραζαν caveolin-1 (p-value 6.87×10^{-8}). Στη μελέτη αυτή επίσης επιβεβαιώθηκε ότι προγνωστική αξία έχει μόνο το επίπεδο έκφρασης caveolin-1 στους CAFs και όχι το επίπεδο έκφρασης αυτής της πρωτεΐνης στα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα. Ένα ακόμα συμπέρασμα στη συγκεκριμένη μελέτη με πιθανό αντίκτυπο και στην θεραπεία των ασθενών αυτών ήταν ότι οι ασθενείς των οποίων οι CAFs δεν έκφραζαν caveolin-1 εμφάνιζαν πολύ πτωχή ανταπόκριση στη θεραπεία με ταμοξιφαίνη. Έτσι μεταξύ των ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε ταμοξιφαίνη, η ομάδα η οποία εμφάνιζε στους CAFs έκφραση της caveolin-1 είχε ελεύθερη νόσου πενταετή επιβίωση 90%, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους ασθενείς οι οποίοι εμφάνισαν ελεύθερη νόσου πενταετή επιβίωση 29% (p-value 2.42×10^{-5}).

Το επίπεδο έκφρασης της caveolin-1 από τους CAFs αποδείχθηκε ότι έχει προγνωστική αξία και στις ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (ER - ; PR - ; HER2 -)¹⁸⁹. Σε αυτή την μελέτη έγινε συσχέτιση του επιπέδου έκφρασης της caveolin-1 στους CAFs με την

συνολική επιβίωση σε μια ομάδα 85 ασθενών με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού οι οποίοι παρακολούθηθηκαν για συνολική περίοδο 12 χρόνων. Η συσχέτιση της επιβίωσης των ασθενών αυτών με το επίπεδο έκφρασης της caveolin-1 ήταν πολύ ισχυρή. Ενώ το 50% των ασθενών των οποίων οι CAFs έκφραζαν σε υψηλά επίπεδα caveolin-1 ήταν στη ζωή στο τέλος της περιόδου παρακολούθησης, ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ασθενών με χαμηλά επίπεδα έκφρασης ή απουσία έκφρασης ήταν μόλις 37,5 μήνες και 25,7 μήνες αντίστοιχα. Όσον αφορά την πενταετή επιβίωση στις τρεις αυτές υποομάδες ασθενών (υψηλή, χαμηλή, καθόλου έκφραση) αυτή ήταν 75,5%, 40% και 9,4% αντίστοιχα (p -value 2.7×10^{-6}). Ακόμα μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση που προκύπτει από αυτή την έρευνα είναι η συσχέτιση της έκφρασης ή μη της caveolin-1 στους CAFs με την παρουσία ή όχι λεμφαδενικής διασποράς της νόσου. Ενώ 75% των ασθενών των οποίων οι CAFs δεν έκφραζαν caveolin-1 παρουσίαζαν λεμφαδενικές μεταστάσεις, το ποσοστό αυτό ήταν 46% στις ασθενείς των οποίων οι CAFs έκφραζαν υψηλά επίπεδα caveolin-1 (p -value 0.018). Αυτή η συσχέτιση μπορεί να ερμηνευτεί με δύο υποθέσεις. Η πρώτη είναι ότι η πρόοδος της νόσου οδηγεί σε αναστολή της έκφρασης της caveolin-1 από τους CAFs και η δεύτερη που είναι και η επικρατέστερη, είναι ότι η απουσία έκφρασης της caveolin-1 συμβάλλει στη δημιουργία του κατάλληλου μικροπεριβάλλοντος για τη μεταστατική συμπεριφορά του νεοπλασματος. Όσον αφορά το επίπεδο έκφρασης της caveolin-1 στα επιθηλιακά νεοπλασματικά κύτταρα, αν και η απουσία έκφρασης οδηγεί σε κάπως μικρότερο ποσοστό πενταετούς επιβίωσης (31%vs41%), αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (p -value 0.185). Το εύρημα αυτό συμφωνεί και με άλλες μελέτες οι οποίες καταδεικνύουν ότι η προγνωστική αξία του επιπέδου έκφρασης caveolin-1 εξαρτάται από το διαμέρισμα (στρώμα vs νεοπλασματικά κύτταρα) στο οποίο αυτή μελετάται. Η περαιτέρω στατιστική ανάλυση στην συγκεκριμένη έρευνα κατέδειξε ότι το

επίπεδο έκφρασης της caveolin-1 στους CAFs αποτελεί ισχυρότερο προγνωστικό δείκτη από ότι καλά τεκμηριωμένοι και ευρέως χρησιμοποιούμενοι προγνωστικοί δείκτες (π.χ μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου, ιστολογικός βαθμός κακοήθειας, είδος θεραπείας κ.α)^{190,191}.

Τα αποτελέσματα των ερευνών των Witkiewicz και συνεργατών επιβεβαιώθηκαν και από άλλες ανεξάρτητες ομάδες. Έτσι οι Koo και συνεργάτες¹⁹¹ επιβεβαίωσαν την κακή πρόγνωση που συνοδεύει την απώλεια έκφρασης της caveolin-1 στους CAFs σε ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από πορογενές διηθητικό καρκίνωμα του μαστού. Πιο συγκεκριμένα η μη έκφραση της caveolin-1 στους CAFs παρουσίαζε σε αυτή την έρευνα στατιστικά σημαντική συσχέτιση με προχωρημένο στάδιο της νόσου (p-value 0.001), με την παρουσία λεμφαδενικής διασποράς της νόσου (p-value 0,001), με υψηλότερη συχνότητα υποτροπής της νόσου (p-value 0.003) και με μικρότερη ολική και ελεύθερη νόσου επιβίωση (p-value <0.001).

Οι Sloan και συνεργάτες μελετώντας την έκφραση caveolin-1 στο στρώμα 173 ασθενών με διηθητικό καρκίνο μαστού (πορογενές και λοβιακό) κατέδειξαν ότι η μη έκφραση caveolin-1 σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με πιο τοπικά προχωρημένη νόσο (p-value 0.03) και με πιο υψηλό ιστολογικό βαθμό κακοήθειας (p-value 0.001)¹⁹². Σε αντίθεση με άλλες μελέτες δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο υποομάδων (έκφραση ή μη έκφραση caveolin-1 στο στρώμα) όσον αφορά την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (p-value 0.1). Σημαντική ωστόσο ήταν η διαφορά όσον αφορά την 10ετή επιβίωση των ασθενών, με τις ασθενείς των οποίων οι CAFs έκφραζαν caveolin-1 να έχουν 91% 10ετή επιβίωση ενώ η απουσία έκφραση caveolin-1 σχετιζόταν με 43% 10ετή επιβίωση (p-value <0.0001). Και σε αυτή τη μελέτη καταδείχθηκε ότι το επίπεδο έκφρασης της caveolin-1 έχει προγνωστική αξία όταν μελετάται στο στρώμα και όχι στα επιθηλιακά νεοπλασματικά κύτταρα καθώς η 10ετής

επιβίωση δεν διέφερε μεταξύ των ασθενών των οποίων τα νεοπλασματικά κύτταρα έκφραζαν caveolin-1 και αυτών που δεν έκφραζαν (p-value 0.9).

Οι Qian και συνεργάτες μελετώντας και πάλι την προγνωστική αξία του επιπέδου έκφρασης της caveolin-1 σε 104 ασθενείς με καρκίνο μαστού κατέληξαν σε κάπως διαφορετικά συμπεράσματα σε σχέση με τις πιο πάνω μελέτες¹⁹⁴. Οι ερευνητές αυτοί ενώ, όπως και οι πιο πάνω μελέτες, απέδειξαν ότι η μη έκφραση caveolin-1 στο στρώμα σχετίζεται με χαμηλή ελεύθερη νόσου επιβίωση (p-value 0.009) σε σχέση με τις ασθενείς των οποίων το στρώμα έκφραζε caveolin-1, κατέληξαν ότι ο συνδυασμός μη έκφρασης caveolin-1 στο στρώμα με την έκφραση caveolin-1 στα νεοπλασματικά κύτταρα παρουσιάζει πιο ισχυρή συσχέτιση (p-value <0.001) με την βραχυχρόνια ελεύθερης νόσου επιβίωση.

Η απουσία έκφρασης caveolin-1 από το στρώμα καρκίνου μαστού συσχετίστηκε με μεγαλύτερο μέγεθος όγκου, υψηλότερο ιστολογικό βαθμό κακοήθειας, πιο προχωρημένη λεμφαδενική νόσο, πιο προχωρημένο στάδιο κατά TNM, πιο υψηλό ποσοστό υποτροπής της νόσου, πτωχότερη ελεύθερη νόσου επιβίωση και αντίσταση στη θεραπεία με ταμοξιφαίνη και από τους El-Gendi και συνεργάτες¹⁹⁵.

Οι Di Vizio και συνεργάτες μελέτησαν το επίπεδο έκφρασης της caveolin-1 στο στρώμα καλοήθους υπερτροφίας του προστάτη, καρκίνου του προστάτη και απομακρυσμένων μεταστάσεων από καρκίνο του προστάτη¹⁹⁶. Ενώ στην περίπτωση του υπερτροφικού ιστού το περιβάλλον στρώμα έκφραζε σε υψηλά επίπεδα την πρωτεΐνη caveolin-1, το στρώμα που περιέβαλλε τον καρκινικό είτε την έκφραζε σε πολύ χαμηλά επίπεδα είτε δεν την έκφραζε καθόλου, ενώ το στρώμα που περιέβαλλε τον μεταστατικό καρκινικό ιστό δεν έκφραζε καθόλου caveolin-1. Η παρατήρηση αυτή συνηγορεί για την μετατροπή των ινοβλαστών που βρίσκονται

σε επαφή με καρκινικά προστατικά κύτταρα σε σχετιζόμενους με καρκίνο ινοβλάστες, ενώ επίσης αναδεικνύεται ότι η μετατροπή αυτή προάγει την εξέλιξη του όγκου. Στη συγκεκριμένη μελέτη επίσης καταδείχτηκε ότι όσο χαμηλότερα είναι τα επίπεδα έκφρασης της caveolin-1 στο στρώμα τόσο πιο υψηλά είναι τα επίπεδα έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στα καρκινικά κύτταρα. Το επόμενο βήμα σε αυτή τη μελέτη ήταν η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της Cav-1 στο στρώμα που περιέβαλλε καρκίνους του προστάτη που περιορίζονταν εντός του προστάτη με την βαθμολόγηση κατά Gleason, ένα από τα βασικά συστήματα βαθμολόγησης με ιδιαίτερη προγνωστική αξία για την επιβίωση των ασθενών. Τα αποτελέσματα αυτής της σύγκρισης ήταν εντυπωσιακά καθώς διαφάνηκε ότι όσο μικρότερη είναι η έκφραση της Cav-1 στα κύτταρα του στρώματος τόσο πιο υψηλή είναι η βαθμολογία κατά Gleason και επομένως τόσο πιο δυσμενής η πρόγνωση για την επιβίωση των ασθενών .

Οι Witkiewicz και συνεργάτες διερεύνησαν την προγνωστική αξία του επιπέδου έκφρασης της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης MCT4 στο στρώμα 181 με τριπλά αρνητικών καρκίνων του μαστού (ER - ; PR - ; HER2 -). Η έρευνα αυτή κατέδειξε ότι όσο πιο υψηλή ήταν η έκφραση του MCT4 στο στρώμα τόσο πιο κακή ήταν η πρόγνωση των ασθενών. Έτσι η 10 ετής επιβίωση των ασθενών με υψηλή, μέτρια και καθόλου έκφραση του MCT4 στο στρώμα ήταν 17.7%, 75.5% και 96.9% αντίστοιχα. Το επίπεδο έκφρασης του MCT4 στο στρώμα ήταν αντιστρόφως ανάλογο με το επίπεδο έκφρασης στο ίδιο διαμέρισμα της caveolin-1 (p-value 5×10^{-15}), της οποίας η προγνωστική αξία στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού είχε δειχθεί από την ίδια ομάδα στο παρελθόν¹⁹². Αυτή η προγνωστική αξία του επιπέδου έκφρασης caveolin-1 στο στρώμα επιβεβαιώθηκε και σε αυτή την μελέτη καθώς η 10 ετής επιβίωση των ασθενών με καθόλου, μέτρια ή υψηλή έκφραση caveolin-1 στο στρώμα ήταν 25.2%, 58.9% και 90.8% αντίστοιχα. Ένα ακόμα σημαντικό συμπέρασμα αυτής της μελέτης ήταν ότι η συνύπαρξη

υψηλού επιπέδου έκφρασης του MCT4 στο στρώμα με την απουσία έκφρασης caveolin-1 στο ίδιο διαμέρισμα αποτελεί πιο ακριβή προγνωστικό παράγοντα όσον αφορά την πτωχή πρόγνωση των ασθενών σε σχέση με την προγνωστική αξία του επιπέδου έκφρασης των δύο πρωτεϊνών ξεχωριστά.

Οι He Y και συνεργάτες συσχέτισαν τα επίπεδα έκφρασης της caveolin-1 στους CAFs καρκίνου στομάχου με την επιβίωση των ασθενών. Μελέτησαν 118 ασθενείς με καρκίνο στομάχου. Αν και δεν κατέδειξαν συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της caveolin-1 στους CAFs με ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου (σταδιοποίηση κατά TNM, ιστολογικό τύπο κ.α) βρήκαν σημαντική συσχέτιση αυτών των επιπέδων με την συνολική επιβίωση των ασθενών. Πιο συγκεκριμένα η πενταετής επιβίωση των ασθενών με χαμηλή έκφραση της caveolin-1 στους CAFs και των ασθενών με υψηλή έκφραση ήταν 56.2% και 72.2% αντίστοιχα (p-value 0.026). Μάλιστα η περαιτέρω στατιστική ανάλυση κατέδειξε ότι η χαμηλή έκφραση της caveolin-1 στους CAFs σε καρκίνο στομάχου αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη κακής πρόγνωσης. Στην ίδια μελέτη εξετάστηκε και η προγνωστική αξία του LC3B, ο οποίος αποτελεί δείκτη αυτοφαγίας, στους CAFs. Ο δείκτης αυτός δεν αποδείχθηκε να έχει κάποια προγνωστική αξία.

Όλες οι πιο πάνω μελέτες στοχευόμενα αναζήτησαν και απόδειξαν την προγνωστική αξία κυτταρικών δεικτών των οποίων η έκφραση σχετίζεται με τις κυτταρικές διεργασίες του «Reverse Warburg Effect» και του «Stromal-Epithelial Metabolic Coupling». Αν ανατρέξουμε στη βιβλιογραφία θα βρούμε αρκετές δημοσιεύσεις, στις οποίες αν και το θεωρητικό υπόβαθρο στο οποίο στηρίχθηκαν για τον έλεγχο της προγνωστικής αξίας διάφορων δεικτών σε καρκινοπαθείς δεν είχε καμία σχέση με τις πιο πάνω κυτταρικές διεργασίες, η προγνωστική αξία που προσδόθηκε σε αυτούς τους δείκτες θα μπορούσε έστω και με επιφύλαξη να αποδοθεί στην εμπλοκή τους στις διεργασίες αυτές.

Η αύξηση του γαλακτικού οξέος σε ένα όγκο βάση των όσων αναφέρθηκαν πιο πάνω εύκολα θα μπορούσε να αποδοθεί στην αυξημένη παραγωγή του από τους CAFs στους οποίους συντελείται αυξημένη αερόβια γλυκόλυση (Reverse Warburg Effect). Ταυτόχρονα μελέτες οι οποίες βασίστηκαν στην υπόθεση της αυξημένης αναερόβια γλυκόλυσης των υποξικών καρκινικών κυττάρων είτε στην αναμενόμενη αερόβια γλυκόλυση των καρκινικών κυττάρων (Warburg Effect) απέδειξαν ότι η αυξημένη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος σε ένα κακοήγη όγκο αποτελεί κακό προγνωστικό παράγοντα για τον ασθενή^{197,198}.

Η υιοθέτηση της θεωρίας ότι η κάλυψη των μεταβολικών αναγκών των καρκινικών κυττάρων προέρχεται από τους ινοβλάστες (CAF) και ότι οι μεταβολίτες αυτοί οι οποίοι συμβάλλουν στην εξέλιξη του όγκου, θα μπορούσε να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι όσο περισσότεροι σε αριθμό είναι οι CAFs τόσο περισσότερους τέτοιους μεταβολίτες θα μπορούσαν να παράγουν και επομένως τόσο πιο ταχεία θα ήταν η εξέλιξη του όγκου. Κάτω από αυτό το πρίσμα θα μπορούσε να εξηγηθεί η χειρότερη πρόγνωση των ασθενών με ορθοκολικό αδενοκαρκίνωμα των οποίων οι όγκοι εμφανίζουν αυξημένη ποσότητα καρκινικού στρώματος.

Οι βασικοί μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στις κυτταρικές διεργασίες με τις οποίες ασχολούμαστε σε αυτή την ανασκόπηση είναι οι HIF-1 και NF-κB. Η αυξημένη ενεργοποίηση αυτών των παραγόντων στους CAFs οδηγεί σε ενίσχυση όλων των σταδίων των εν λόγω κυτταρικών διεργασιών και των αναμενόμενων ευνοϊκών επιπτώσεων τους στην εξέλιξη του κακοήθους δυναμικού του όγκου. Πράγματι έχει δειχθεί ότι η αυξημένη ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2 (μια ισομορφή του HIF με ιδιότητες παρόμοιες με τον HIF-1) στο καρκινικό στρώμα ορθοκολικού καρκίνου οδηγεί σε χειρότερη πρόγνωση.

Επίσης η αυξημένη έκφραση του NF-κB στο καρκινικό στρώμα και πιο συγκεκριμένα στα μακροφάγα του καρκινικού στρώματος ή η αυξημένη έκφραση ενός από τα γονίδια στόχους του, της IL-8, στους CAFs υποβοηθά την ανάπτυξη μεταστάσεων με καρκίνο πνευμόνων και δυσχεραίνει την πρόγνωση σε ασθενείς με ορθοκολικές ηπατικές μεταστάσεις αντίστοιχα.

Καθώς η λίστα αυτών των, βάσιμων ή μη, συσχετισμών του «Reverse Warburg Effect» και του «Stromal-Epithelial Metabolic Coupling» με την προγνωστική αξία διαφόρων δεικτών είναι τεράστια θα την τερματίσουμε αναφέροντας την κακή πρόγνωση των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο οι οποίοι εμφανίζουν αυξημένη έκφραση του micro RNA-31. Αφενός μεν το συγκεκριμένο microRNA έχει αποδειχθεί ότι υπερ-εκφράζεται στους CAFs και αφετέρου πιθανότατα εμπλέκεται στις κυτταρικές διεργασίες που μελετούμε μέσω της αναστολής της μετάφρασης του mRNA της πρωτεΐνης FII, ενός γνωστού αναστολέα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1.

Έχουμε κάνει πολλές υποθέσεις στην προσπάθεια μας να συσχετίσουμε πιθανός μη συσχετιζόμενα μεταξύ τους γεγονότα. Σίγουρα χρειάζεται συνέχιση της έρευνας η οποία αφενός μεν θα δείξει το σωστό ή λάθος των υποθέσεων μας και αφετέρου ίσως αποκαλύψει ακόμα περισσότερους προγνωστικούς δείκτες που να σχετίζονται με τις κυτταρικές διεργασίες που μελετάμε (δείκτες αυτοφαγίας/μιτοχονδριοφαγίας, δείκτες οξειδωτικού στρες, παρουσία ή απουσία διαμεμβρανικών μεταφορέων, υπερέκφραση ενζύμων σχετιζόμενων με τη γλυκόλυση ή την παραγωγή NO, μεταβολιτών της οξειδωτικής φωσφορλίωσης κ.α)

Στην εργασία την οποία πραγματοποιήσαμε και η οποία αναλύεται πιο κάτω επιλέχθηκε η διερεύνηση της συσχέτισης των διαμεμβρανικών μεταφορέων των μονοκαρβοξυλασών και ειδικότερα της MCT4 με την πρόγνωση ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου και ηπατικές

μόνο μεταστάσεις. Συνοψίζοντας όλη τη πιο πάνω ανασκόπηση η αυξημένη παραγωγή ενεργειακών μεταβολίτων από τους CAFs υπό την επίδραση των καρκινικών κυττάρων οδηγεί σε συσσώρευση γαλακτικού οξέως εντός του κυτταροπλάσματος τους. Το γαλακτικό οξύ αποτελεί «τροφή» για τα καρκινικά κύτταρα τα οποία το χρησιμοποιούν για την κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών. Η σπουδαιότητα της χρήσης αυτού του γαλακτικού οξέως έγκειται στο ότι με τη χρήση του τα καρκινικά κύτταρα τα οποία βρίσκονται και μακριά από τα τροφοφόρα αγγεία του όγκου μπορούν να συνεχίζουν τις κυτταρικές τους λειτουργίες και ταυτόχρονα να πολλαπλασιάζονται και να μεταναστεύουν. Η MCT4 θεωρήθηκε ως ένας αξιόπιστος δείκτης των μεταβολικών αυτών φαινομένων και η αύξηση της στους CAFs που περιβάλλουν τα καρκινικά κύτταρα από καρκίνο του παχέος εντέρου με ηπατικές μεταστάσεις θα επιβεβαιώσει τη θεωρία του μεταβολικού συνεταιρισμού CAFs και καρκινικών κυττάρων και σε αυτή τη μορφή καρκίνου.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι ο καθορισμός της προγνωστικής σημασίας της έκφρασης της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης MCT4 στον καρκίνο του παχέος εντέρου με ηπατικές μεταστάσεις. Η MCT4 αποτελεί τον κύριο μεταφορέα των μονοκαρβοξυλασών (γαλακτικού οξέως, πυρουβικού οξέως) διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης σε κύτταρα στα οποία υπερτερεί η γλυκόλυση και το παραγόμενο γαλακτικό οξύ συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα τους. Τα καρκινικά κύτταρα περιβάλλονται από άλλα στρωματικά κύτταρα, ο αριθμός και η σύσταση των οποίων χαρακτηρίζει το μικροπεριβάλλον του όγκου. Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στους ινοβλάστες (CAFs) του στρώματος αυτού οι οποίοι φαίνεται να βρίσκονται σε μια ενεργειακή συνεργασία με τα καρκινικά κύτταρα. Η ενεργειακή συνεργασία ορίζεται ως η μεταφορά ενεργειακών μεταβολιτών όπως είναι το γαλακτικό οξύ από τους CAFs προς τα καρκινικά κύτταρα. Η μεταφορά αυτή του γαλακτικού οξέως από τους CAFs προς τα καρκινικά κύτταρα διαμεσολαβείται από τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη MCT4. Η αυξημένη έκφραση της στη μεμβράνη των CAFs συνεπάγεται και αυξημένη μεταφορά εκτός του κυτταροπλάσματος τους γαλακτικού οξέως, το οποίο προσλαμβάνεται από τα καρκινικά κύτταρα διαμέσου μίας άλλης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης η οποία ονομάζεται MCT1. Η MCT4 συμμετέχει ενεργά στο μεταβολικό μονοπάτι που περιγράφηκε ως «Reverse Warburg Effect» και στο φαινόμενο του «Stromal-Epithelial Metabolic Coupling», όπως έχει αποδειχτεί σε άλλες μελέτες οι οποίες εξέτασαν την δραστηριότητα της σε εργαστηριακές συνθήκες. Παραμένει όμως να αποδειχθεί η χρησιμότητα της MCT4 ως προγνωστικός δείκτης στην κλινική πρακτική.

Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό τη συσχέτιση της έκφρασης της MCT4 στο στρώμα που περιβάλλει τα καρκινικά κύτταρα ηπατικών μεταστάσεων από ορθοκολικό καρκίνο με την 5ετή επιβίωση και με το διάστημα ελεύθερο νόσου των ασθενών αυτών. Με την ιδιότητα της αυτή

αν η υπερέκφραση της MCT4 συνδεθεί με μείωση της συνολικής επιβίωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας νέος προγνωστικός δείκτης στον καρκίνο του παχέος εντέρου με ηπατικές μεταστάσεις.

Πέρα από τον προγνωστικό χαρακτήρα, η απόδειξη της υπερέκφρασης της MCT4 στον ορθοκολικό καρκίνο με ηπατικές μεταστάσεις δημιουργεί νέα δεδομένα στην αξιοποίηση των κυτταρικών λειτουργιών που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των κυττάρων ως προς τις θεραπευτικές παρεμβάσεις που διαθέτουμε σήμερα στην κλινική πράξη.

Ο κυτταρικός μεταβολισμός αποτελεί σήμερα ίσως ένα από τα σημαντικότερα πεδία στα οποία η επιστημονική κοινότητα στηρίζει τις προσπάθειες της για ανεύρεση νέων φαρμακευτικών παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί θα μπορούσαν να λειτουργήσουν συνεργικά με τα υπάρχοντα χημειοθεραπευτικά σχήματα για αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων.

Η σπουδαιότητα της μελέτης αυτής ενισχύεται και από το γεγονός ότι μέχρι σήμερα, αν και γίνονται προσπάθειες, δεν έχει γίνει ακόμα παραγωγή αναστολέα της MCT4 ο οποίος να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως στην καθημερινή κλινική πράξη. Έχουν γίνει πειραματικές μελέτες in vitro και in vivo αλλά δεν έχει ακόμα κάποιο από τα υπό μελέτη φαρμακευτικά προϊόντα που δοκιμάζονται πάρει έγκριση για χρήση σε ανθρώπους. Η απόδειξη του προγνωστικού ρόλου της MCT4 σε όλο και περισσότερες μορφές κακοήθειας καθώς και ο σημαντικός της ρόλος ως κυτταρικός στόχος νέων χημειοθεραπευτικών παραγόντων καθιστά επιτακτική την περαιτέρω έρευνα για την αποσαφήνιση της δράσης της και στον καρκίνο του παχέος εντέρου με ηπατικές μεταστάσεις.

2. Υλικό και Μέθοδος

Για το σκοπό της μελέτης μελετήθηκε αναδρομικά υλικό αρχείου από τους φακέλους 107 ασθενών με ιστολογικά επιβεβαιωμένο καρκίνο του παχέος εντέρου και ηπατικές μεταστάσεις. Οι ασθενείς αυτοί υποβλήθηκαν σε ηπατεκτομή με θεραπευτικό σκοπό από τον Ιανουάριο του 2001 ως τον Δεκέμβριο του 2012. Οι ασθενείς αντιμετωπίστηκαν χειρουργικά στην Α' Πανεπιστημιακή Χειρουργική Κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών καθώς επίσης και στη Χειρουργική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Λευκωσίας.

Οι ασθενείς οι οποίοι επιλέχθηκαν και συμπεριλήφθηκαν τελικά στη μελέτη ακολουθούσαν τα πιο κάτω κριτήρια:

1. Δεν είχαν κατά τη στιγμή της χειρουργικής επέμβασης στο ήπαρ εξωηπατική μεταστατική νόσο.
2. Είχαν λάβει προηγουμένως χημειοθεραπεία με βάση εγκεκριμένα πρωτόκολλα. Τα πρωτόκολλα αυτά βασίζονταν είτε στη χορήγηση λευκοβορίνης με 5-FU ή σε συνδυασμό οξαλιπλατίνας ή ιρινοτεκάνης ή καπεσιταμίνης με ή χωρίς την προσθήκη μπεβασιζουμάμπης ή σετουξιμάμπης.
3. Υπήρχε κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης πλήρης αφαίρεση του όγκου. Τα ιστολογικά όρια εκτομής των ηπατικών μεταστάσεων ήταν για όλους τους ασθενείς ελεύθερα νόσου (R0 εκτομές). Τα όρια εκτομής επίσης ήταν τουλάχιστο 1mm.
4. Υπήρχαν πλήρη στοιχεία σχετικά με το ιστορικό τους, το πρακτικό της χειρουργικής επέμβασης, τη θεραπεία που έλαβαν και την πορεία της νόσου ως το θάνατο (εάν αυτό ήταν η τελική έκβαση της νόσου τους) ή την υποτροπή της νόσου. Η παρακολούθηση τους συνεχίστηκε

ως το θάνατο από καρκίνο του παχέος εντέρου με ηπατικές μεταστάσεις ή οποιαδήποτε άλλη αιτία ενώ όσοι παρέμειναν ζωντανοί, ανεξάρτητα αν είχαν ή όχι υποτροπή παρακολουθήθηκαν ως την 1η Ιανουαρίου 2016.

5. Όλα τα περιστατικά προέρχονταν από τα ίδια θεραπευτικά κέντρα και δεν συμμετείχαν σε οποιαδήποτε κλινική μελέτη.

6. Δεν συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη ασθενείς οι οποίοι πέθαναν κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης ή άμεσα μετά τη χειρουργική επέμβαση λόγω μετεγχειρητικών επιπλοκών.

Από το αρχειακό υλικό επιλέχθηκαν τυχαία 107 ασθενείς που είχαν πλήρη στοιχεία όσον αφορά στους παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν ως προγνωστικοί, με σκοπό να συμπεριληφθούν στη συγκεκριμένη μελέτη. Το καταληκτικό στοιχείο παράμενε η συνολική επιβίωση και το διάστημα ελεύθερο νόσου. Το πρωτόκολλο είχε λάβει έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών καθώς και από την Επιτροπή Βιοηθικής Κύπρου.

Οι ασθενείς οι οποίοι εντάχθηκαν τελικά στη μελέτη είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση που αφορούσε είτε μείζονα είτε ελάσσονα ηπατεκτομή, με θεραπευτικό σκοπό και δεν είχαν άλλη μεταστατική εστία εκτός του ήπατος. Οι ηπατεκτομές επίσης μπορούσαν να γίνουν ή στον ίδιο χρόνο με την κολεκτομή είτε σε δεύτερο χρόνο μετά από χορήγηση χημειοθεραπείας. Ο αποκλεισμός της εξωηπατικής νόσου γινόταν ως ρουτίνα προεγχειρητικά με την χρήση υπολογιστικής τομογραφίας θώρακος, κοιλίας και πυέλου. Η απόφαση για τη διενέργεια της χειρουργικής επέμβασης λαμβανόταν από ομάδα ειδικών, την οποία αποτελούσαν ένας ειδικός

χειρουργός με εξειδίκευση και επαρκή εμπειρία στη χειρουργική ήπατος, ένας ογκολόγος και ένας επεμβατικός ακτινολόγος.

Μέσα από τον ιατρικό φάκελο του ασθενούς συλλέχθηκαν όλες οι πληροφορίες που θα μπορούσαν να αποκαλύψουν προγνωστικούς παράγοντες για τη συνολική επιβίωση και το διάστημα ελεύθερο νόσου για τον κάθε ασθενή ξεχωριστά. Πέρα από το αρχείο, η παρακολούθηση των ασθενών έγινε με απευθείας επικοινωνία με τους ασθενείς. Ειδικότερα οι πληροφορίες που καταγράφονταν για κάθε ασθενή αφορούσαν:

1. δημογραφικά στοιχεία
2. στοιχεία για τον πρωτοπαθή όγκο στο κόλον (θέση, μέγεθος, ιστολογικός τύπος, βαθμός διαφοροποίησης)
3. τα χαρακτηριστικά των ηπατικών μεταστάσεων (σύγχρονες, μετάχρονες, αριθμός, ανατομική θέση)
4. προεγχειρητική χημειοθεραπεία
5. ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία
6. είδος ηπατεκτομής (μεταστασεκτομή, δεξιά ηπατεκτομή, αριστερή ηπατεκτομή, τρισεκτομή)
7. συνολική επιβίωση (Overall Survival, OS) και το διάστημα ελεύθερο νόσου (Disease Free Survival, DFS)

2.1 Ανοσοϊστοχημεία

Τα ιστολογικά παρασκευάσματα των ασθενών που είχαν επιλεγεί για την πραγματοποίηση της μελέτης, έτυχαν κατάλληλης διαλογής από ειδικό ιστοπαθολόγο και υποβλήθηκαν τελικά σε επεξεργασία με ανοσοϊστοχημεία. Η ανοσοϊστοχημική χρώση προς αναγνώριση της μεμβρανικής πρωτεΐνης MCT4 πραγματοποιήθηκε σε τομές οι οποίες είχαν μονιμοποιηθεί με παραφίνη και είχαν πάχος 3mm. Η διαδικασία αφορούσε τεχνική δύο φάσεων. Στην πρώτη φάση τα δείγματα ζεσταίνονταν καθ'όλη τη διάρκεια της νύχτας στους 37°C. Τη διαδικασία αυτή ακολούθησε η αφαίρεση της παραφίνης σε ξυλίνη και στη συνέχεια επανυδάτωση με την χρήση διαβαθμιζόμενων αλκοολών. Μετά από τη διαγραφή της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης, η οποία πραγματοποιήθηκε με την χρήση ενός διαλύματος υπεροξειδίου μεθανόλης-υδρογόνου (0.3% in TBS for 30 min), η διαδικασία συνεχίστηκε με την ανάκτηση του αντιγόνου διαμέσου τεχνικής, υποβοηθούμενης με μικροκύματα, σε αιθυλενο-διαμινο-τετραοξεικό οξύ (EDTA) σε pH 9, για χρονική διάρκεια δέκα λεπτών. Ακολούθως, οι τομές τοποθετήθηκαν σε κύβους κατά τη διάρκεια της νύχτας σε θερμοκρασία 4°C μαζί με το πρωταρχικό αντίσωμα κατά της MCT4 (MCT4, clone sc-50329, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA).

Το αντίσωμα αυτό είναι ταχείας δράσης αντίσωμα και δεσμεύεται στα αμινοξέα 376-465 του C-άμινο τελικού κυτταροπλασματικού άκρου της MCT4. Κάθε φιαλίδιο από το συγκεκριμένο αντίσωμα περιέχει 200μg IgG σε 1.0ml PBS σε συνδυασμό με < 0.1% αζίδιο του νατρίου και 0,1% γελατίνη. Το συγκεκριμένο αντίσωμα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά την ανοσοϊστοχημική χρώση των ιστολογικών τομών των μεταστάσεων από ορθοκολικό καρκίνο, είναι κατάλληλο για την ανίχνευση της MCT4 προερχόμενης τόσο από τον άνθρωπο όσο και από ποντίκια και αρουραίους. Η αναγνώριση της MCT4 μπορεί να γίνει με τη μέθοδο Western

Blot (αρχική διάλυση 1:200, εύρος διάλυσης 1:100 με 1:1000), με ανοσοκατακρήμνιση 1-2μg ανά 100-500μg συνολικής πρωτεΐνης (1ml της κυτταρικής λυσίνης,)], με ανοσοϊστοχημεία (σε κύβους παραφίνης, αρχική διάλυση 1:50, εύρος διάλυσης 1:50 με 1:500) και με ELISA (αρχική διάλυση 1:30 και εύρος διάλυσης 1:3000).

Για την ανίχνευση του αντισώματος χρησιμοποιήθηκε τεχνική δύο σταδίων (Quanto, Thermo – Fischer Scientific Inc., USA). Για το χρωματισμό χρησιμοποιήθηκε η διαμινοβενζιδίνη. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε στις τομές αιμοτοξυλλίνη. Για έλεγχο του θετικού αποτελέσματος για την ύπαρξη της MCT4, χρησιμοποιήθηκαν ως μέτρο σύγκρισης τομές από πλακούντα οι οποίες είναι αποδεδειγμένο ότι εκφράζουν σε μεγάλη ποσότητα την MCT4. Για την ομάδα αρνητικού ελέγχου το πρωτοπαθές αντίσωμα αφαιρέθηκε και αντικαταστάθηκε από μη άνοσο, φυσιολογικό ορό από το ίδιο είδος με το πρωτοπαθές αντίσωμα ή TBS.

2.2 Έλεγχος αποτελεσμάτων ανοσοϊστοχημείας

Η αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων πραγματοποιήθηκε από ειδικό ιστοπαθολόγο με την χρήση μικροσκοπίου, χωρίς ο ίδιος να γνωρίζει τα υπόλοιπα κλινικά στοιχεία του ασθενούς, για αποφυγή παρεμβάσεων στο τελικό αποτέλεσμα. Η έκφραση της MCT4 με την ανοσοϊστοχημεία ήταν τόσο μεμβρανική όσο και κυτταροπλασματική. Οι κυτταρικοί τύποι οι οποίοι έκφραζαν την MCT4 ήταν οι ινοβλάστες, τα καρκινικά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, τα αδιποκύτταρα και οι λείες μυϊκές ίνες. Η ανοσοδραστικότητα της MCT4 διαχωρίστηκε σε τέσσερις κατηγορίες, με ημιποσοτική μέθοδο με κριτήριο την ένταση της χρώσης. Οι τέσσερις αυτές κατηγορίες ήταν οι ακόλουθες:

Ένταση Χρώσης:

Κατηγορία 1, score 0: χωρίς καμία χρώση (no staining)

Κατηγορία 2, score 1: ήπια χρώση (weak staining)

Κατηγορία 3, score 2: εντονότερη χρώση (moderate staining)

Κατηγορία 4, score 3: ισχυρή χρώση (strong staining)

Με ανάλογο τρόπο αυτού που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της έντασης της χρώσης εκτιμήθηκε και η έκταση της χρώσης, με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν ακόμα πέντε κατηγορίες, οι οποίες είναι οι ακόλουθες:

Έκταση Χρώσης:

Κατηγορία 1, score 0: καμία χρώση

Κατηγορία 2, score 1: χρώση σε ποσοστό <25% του όγκου

Κατηγορία 3, score 2: χρώση σε ποσοστό 25-50% του όγκου

Κατηγορία 4, score 3: χρώση σε ποσοστό 50-75% του όγκου

Κατηγορία 5, score 4: χρώση σε ποσοστό >75% του όγκου

Για τη μελέτη της προγνωστικής σημασίας της έκφρασης της MCT4, δημιουργήθηκαν τελικά δύο ομάδες ασθενών με βάση τις πιο πάνω αναφερθείσες κατηγορίες. Για τις δύο κύριες σειρές κυττάρων που μελετήθηκαν σε κάθε ασθενή, δηλαδή τους ινοβλάστες και τα καρκινικά κύτταρα, αν το άθροισμα της έντασης και της έκτασης της χρώσης ήταν μικρότερο ή ίσο με 5, τότε ο ασθενής τοποθετείτο στην ομάδα I όπου υπήρχε ασθενής έκφραση της MCT4 (weak MCT4 expression). Εάν όμως το άθροισμα αυτό ήταν μεγαλύτερο του 5 τότε τοποθετείτο στην ομάδα II όπου υπήρχε ισχυρή έκφραση της MCT4 (strong MCT4 expression).

Οι δύο αυτές ομάδες ουσιαστικά καθορίζουν και τη μεταβολική λειτουργία των κυτταρικών πληθυσμών που μελετώνται. Στην ομάδα I όπου υπάρχει ασθενής χρώση για την MCT4, υποθέτουμε ότι υπάρχει και μικρότερη παραγωγή γαλακτικού οξέως σε αντίθεση με την ομάδα II όπου η ισχυρή χρώση για την MCT4 συνδυάζεται με αυξημένες ποσότητες γαλακτικού οξέως εντός του κυτταροπλάσματος των κυττάρων αυτών. Τα αυξημένα επίπεδα του γαλακτικού οξέως δηλώνουν και τη διεργασία της αερόβιας γλυκόλυσης στα κύτταρα αυτά, όπως έχει αναλυθεί στην περιγραφή του «Reverse Warburg effect». Συνεπώς στις δύο αυτές ομάδες υπάρχει διαφορετικός κυτταρικός μεταβολισμός.

2.3 Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Statistical Package of Social Sciences software (SPSS), version 17.0. Το πρωταρχικό αποτέλεσμα που μελετήθηκε στον πληθυσμό της μελέτης, που αφορούσε ασθενείς με χειρουργηθέν ορθοκολικό καρκίνο και χειρουργηθείσες ηπατικές μεταστάσεις ήταν η συνολική επιβίωση των ασθενών (Overall Survival, OS). Το δευτερεύον αποτέλεσμα της μελέτης για τους ασθενείς αυτούς ήταν το διάστημα ελεύθερο νόσου (Disease Free Survival, DFS). Άλλα δευτερεύοντα αποτελέσματα ήταν επίσης η προγνωστική σημασία άλλων παραγόντων που αφορούσαν τους ασθενείς αυτούς σε σχέση με τη τελική έκβαση της νόσου τους. Οι παράγοντες αυτοί αφορούσαν το στάδιο της νόσου, την ιστολογική διαφοροποίηση του όγκου, την προεγχειρητική θεραπεία, την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, τον αριθμό και τη θέση των ηπατικών μεταστάσεων και την ηλικία του ασθενούς.

Η συνολική επιβίωση των ασθενών αυτών υπολογίστηκε από την ημερομηνία της ηπατεκτομής μέχρι την ημερομηνία θανάτου του ασθενούς από αίτια τα οποία σχετίζονταν με τη νόσο του δηλαδή τον ορθοκολικό καρκίνο με ηπατικές μεταστάσεις. Η παρακολούθηση των ασθενών τερματιζόταν κατά την ημερομηνία που σταματούσε η μελέτη που καθορίστηκε με βάση το πρωτόκολλο της μελέτης και ήταν η 1/1/2016 ή κατά την ημερομηνία θανάτου των ασθενών από αίτια τα οποία δεν σχετίζονταν με την πρωτοπαθή νόσο τους.

Το διάστημα ελεύθερο νόσου υπολογίστηκε από την ημερομηνία της ηπατεκτομής μέχρι την ημερομηνία κατά την οποία υπήρχε υποτροπή της νόσου. Η υποτροπή αυτή μπορούσε να αφορά τοπική υποτροπή της πρωτοπαθούς εστίας στο παχύ έντερο όσο και υποτροπή των ηπατικών μεταστάσεων αλλά παράλληλα αφορούσε και οποιαδήποτε άλλη εξωηπατική υποτροπή (π.χ

νεοεμφανιζόμενες πνευμονικές μεταστάσεις οι οποίες δεν υπήρχαν κατά τη χρονική στιγμή στην οποία ο ασθενής υποβλήθηκε σε θεραπευτική ηπατεκτομή). Επίσης όσον αφορά στο διάστημα ελεύθερο νόσου, η παρακολούθηση των ασθενών τερματιζόταν κατά την τελευταία ημερομηνία παρακολούθησης όλων των ασθενών με βάση το πρωτόκολλο της μελέτης, αν κατά τη χρονική εκείνη στιγμή παρέμεναν χωρίς υποτροπή, ή αν επερχόταν θάνατος από αίτια τα οποία δεν σχετίζονταν με την πρωτοπαθή του νόσο.

Για τη μελέτη της ύπαρξης συσχετισμού μεταξύ των χαρακτηριστικών τόσο του όγκου όσο και των ασθενών σε σχέση με την έκφραση στις μελετώμενες ιστολογικές τομές της MCT4 στα κύτταρα του στρώματος καθώς και στα ίδια τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Chi-Square.

Η επίδραση αυτών των παραγόντων στο πρωταρχικό αποτέλεσμα της μελέτης το οποίο, όπως προαναφέρθηκε, ήταν η συνολική επιβίωση (OS) και στο δευτερεύον αποτέλεσμα το οποίο ήταν το διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) αναλύθηκε με βάση τη μέθοδο Kaplan-Meier. Τα τελικά αποτελέσματα της επίδρασης της έκφρασης της MCT4 στην επιβίωση των ασθενών μεταξύ των διαφόρων ομάδων που δημιουργήθηκαν, με βάση τα το σύνολο των χαρακτηριστικών πραγματοποιήθηκε με το log-rank τεστ. Τιμές του p-value μικρότερες από 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Οι παράγοντες εκείνοι οι οποίοι ανευρέθηκε να σχετίζονται στατιστικά με τη συνολική επιβίωση (OS) και το διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS), είχαν δηλαδή $p > 0,1$, στη μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την πραγματοποίηση της πολυπαραγοντικής Cox-regression ανάλυσης.

3. Αποτελέσματα

Με βάση τα κριτήρια εισαγωγής των ασθενών στη μελέτη, συνολικά εξετάστηκαν ιστολογικά με ανοσοϊστοχημική μέθοδο, δείγματα ορθοκολικού καρκίνου με ηπατικές μεταστάσεις από 107 ασθενείς. Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών καθώς επίσης και τα χαρακτηριστικά του ορθοκολικού καρκίνου με ηπατικές μεταστάσεις των ασθενών αυτών κατά τη χρονική στιγμή της διάγνωσης παρατίθενται στους Πίνακες 2 και 3.

Χαρακτηριστικό	Αριθμός ασθενών
Ηλικία	
<65 ετών	67(62.6%)
>65 ετών	40(37.4%)
Φύλο	
Γυναίκες	42(39.3%)
Άνδρες	65(60.7%)

Πίνακας 2: Δημογραφικά στοιχεία των ασθενών

Χαρακτηριστικό	Αριθμός ασθενών
Αριθμός ηπατικών μεταστάσεων κατά τη διάγνωση	
≤ 3	81(75.7%)
>3	26(24.3%)
Κατανομή των βλαβών στο ήπαρ	
Σε ένα λοβό	69(64.5%)

Και στους δύο λοβούς	38(35.5%)
Μέγεθος ηπατικών μεταστάσεων	
≤ 5cm	83(77.6%)
>5cm	24(22.4%)
Χρονική στιγμή των μεταστάσεων	
Σύγχρονες	75(70.1%)
Μετάχρονες	32(29.9%)
Είδος προεγχειρητικής χημειοθεραπείας	
Oxaliplatin-based chemotherapy	68(63.6%)
Irinotecan- based chemotherapy	38(35.5%)
Άγνωστο	1(0.9%)
Προεγχειρητική θεραπεία με Bevacizumab	
Όχι	64(59.8%)
Ναι	43(40.2%)
Ανταπόκριση στη προεγχειρητική θεραπεία	
Θετική ανταπόκριση	97(90.7%)
Καμία ανταπόκριση	10(9.3%)
Αριθμός ηπατικών τμημάτων που αφαιρέθηκαν κατά την ηπατεκτομή	
≤ 3	52(48.6%)
>3	55(51.4%)

Πρωτοπάθής όγκος in situ κατά τη στιγμή της ηπατεκτομής	
Όχι	88(82.2%)
Ναι	19(17.8%)
Adjuvant Χημειοθεραπεία	
Ναι	80(74.8%)
Όχι	27(25.2%)
Έκφραση της MCT4 στα κύτταρα του όγκου	
Weak	55(51.4%)
Strong	51(47.7%)
Άγνωστη	1(0.9%)

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά στοιχεία της νόσου

Από τους 107 ασθενείς οι οποίοι συμμετείχαν στη μελέτη, οι 50 (46,7 %) παρουσίασαν ισχυρή χρώση για τη μεμβρανική πρωτεΐνη MCT4. Στους ασθενείς αυτούς το άθροισμα της έντασης και της έκτασης της χρώσης ήταν μεγαλύτερο από 5 σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μελέτης, οπότε κατηγοριοποιήθηκαν στην υποομάδα της ισχυρής MCT4 χρώσης. Ασθενή χρώση για την MCT4 παρουσίασαν 57 (53,3%) ασθενείς, οι οποίοι είχαν συνολικό άθροισμα μικρότερο ή ίσο του 5. Εικόνες από το μικροσκόπιο που αναδεικνύουν την ισχυρή και ασθενή χρώση των κυττάρων ως προς την πρωτεΐνη MCT4, παρουσιάζονται στις εικόνες 16 και 17. Οι δύο κατηγορίες συγκρίθηκαν με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών καθώς επίσης και με τα

χαρακτηριστικά του ορθοκολικού καρκίνου με ηπατικές μεταστάσεις χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση. (Πίνακας 4)

Στρωματική έκφραση της MCT4				
Παράμετρος	Σύνολο	Ασθενής (Weak)	Ισχυρή (Strong)	P-value
Ηλικία κατά τη χειρουργική επέμβαση				
≤ 65 yr	67(62.6%)	34(59.6%)	33(66%)	0.551
>65 yr	40(37.4%)	23(40.4%)	17(34%)	
Φύλο				
Γυναίκες	42(39.3%)	22(38.6%)	20(40%)	0.999
Άντρες	65(60.7%)	35(61.4%)	30(60%)	
Αριθμός μεταστάσεων κατά τη διάγνωση				
≤ 3	81(75.7%)	43(75.4%)	38(76%)	0.999
>3	26(24.3%)	14(24.6%)	12(24%)	
Κατανομή βλαβών				
Ένας λοβός	69(64.5%)	35(61.4%)	34(68%)	0.546
Δύο λοβοί	38(35.5%)	22(38.6%)	16(32%)	

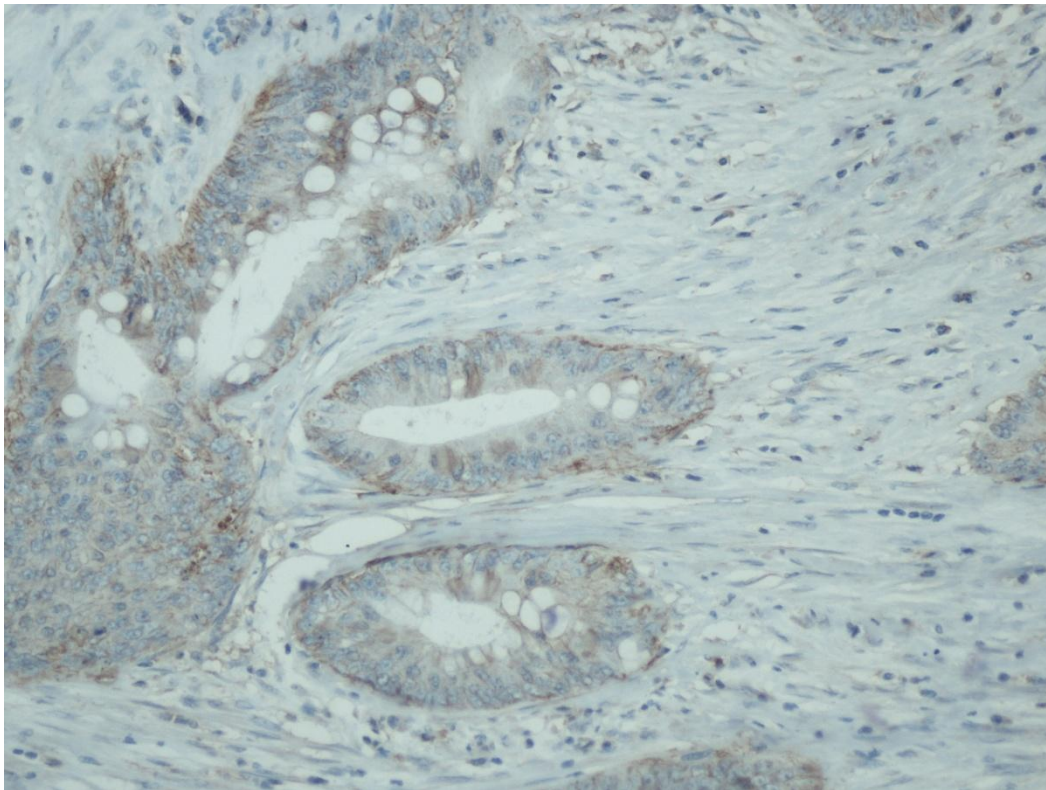
Μέγεθος μεταστάσεων				
≤ 5cm	83(77.6%)	46(80.7%)	37(74%)	0.473
>5cm	24(22.4%)	11(19.3%)	13(26%)	
Χρόνος μετάστασης				
Σύγχρονες	75(70.1%)	39(68.4%)	36(72%)	0.833
Μετάχρονες	32(29.9%)	18(31.6%)	14(28%)	
Είδος προεγχειρητικής χημειοθεραπείας				
Oxaliplatin-based chemotherapy	68(63.6%)	39(68.4%)	29(58%)	0.417
Irinotecan- based chemotherapy	38(35.5%)	18(31.6%)	20(40%)	
Unknown	1(0.9%)	0(0%)	1(2%)	
Προεγχειρητική χορήγηση Bevacizumab				
Όχι	64(59.8%)	35(61.4%)	29(58%)	0.436
Ναι	43(40.2%)	22(38.6%)	21(42%)	

Ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία⁺				
Ανταπόκριση ⁺	97(90.7%)	53(93%)	44(88%)	0.377
Πρόοδος νόσου	10(9.3%)	4(7%)	6(12%)	
Αριθμός ηπατικών τμημάτων που αφαιρέθηκαν				
≤ 3	52(48.6%)	30(52.6%)	22(44%)	0.440
>3	55(51.4%)	27(47.4%)	28(56%)	
Πρωτοπαθής όγκος in situ κατά τη χρονική στιγμή της ηπατεκτομής				
Όχι	88(82.2%)	47(82.5%)	41(82%)	0.999
Ναι ⁺⁺	19(17.8%)	10(17.5%)	9(18%)	
Μετεγχειρητική χημειοθεραπεία				
Ναι	80(74.8%)	43(75.4%)	37(74%)	0.999
Όχι	27(25.2%)	14(24.6%)	13(26%)	
Έκφραση της MCT4 στα καρκινικά κύτταρα				
Ασθενής (Weak)	55(51.4%)	29(50.9%)	26(52%)	0.999
Ισχυρή (Strong)	51(47.7%)	27(47.3%)	24(48%)	
Άγνωσ	1(0.9%)	1(1.8%)	0(0%)	

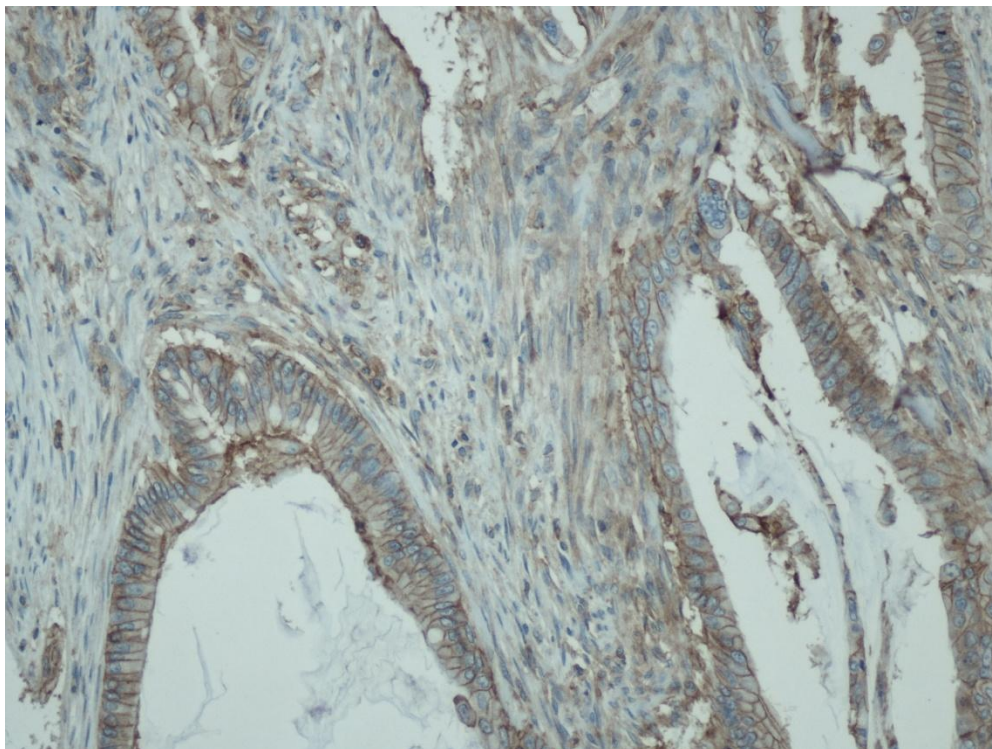
⁺ ακτινολογική εικόνα πλήρους ή μερικής ανταπόκρισης ή σταθερή νόσος (σύμφωνα με τα κριτήρια RECIST)

⁺⁺ δεκαπέντε ασθενείς υποβλήθηκαν σε σύγχρονη αφαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου και ηπατικών μεταστάσεων και τέσσερις ασθενείς υποβλήθηκαν στην τεχνική 'liver first'

Πίνακας 4: Σύγκριση των χαρακτηριστικών του όγκου με την έκφραση της MCT4



Εικόνα 16: Ασθενής χρώσης για την MCT4 (Weak MCT4 expression)



Εικόνα 17: Ισχυρή χρώση για την MCT4 (Strong MCT4 expression)

Η μέση περίοδος παρακολούθησης των 107 ασθενών ήταν 39 μήνες (εύρος παρακολούθησης από 2 μήνες μέχρι 102 μήνες). Κατά τη χρονική αυτή διάρκεια της παρακολούθησης, 72 (67,3%) ασθενείς παρουσίασαν υποτροπή του όγκου και 38 (35,5%) ασθενείς πέθαναν από αίτια που οφείλονταν άμεσα στην επέκταση της νόσου τους. Οι ασθενείς οι οποίοι κατανεμήθηκαν στην ομάδα όπου εμφανιζόταν ισχυρή χρώση της MCT4 στα στρωματικά κύτταρα τα οποία περιβάλλουν τα καρκινικά κύτταρα του όγκου, η συχνότητα υποτροπής ήταν σημαντικά υψηλότερη, δεδομένου ότι 40 από τους 50 ασθενείς (80%) παρουσίασαν υποτροπή του όγκου. Η αντίστοιχη συχνότητα υποτροπής στην ομάδα ασθενών οι οποίοι παρουσίαζαν ασθενή χρώση των κυττάρων του στρώματος ως προς την MCT4, ήταν 56,1%. Συγκρίνοντας τις δύο αυτές συχνότητες (80% σε σύγκριση με 56,1%) η τιμή του P είναι ίση με 0.009 (P=0.009).

Στην ομάδα ισχυρής έκφρασης της MCT4 στα κύτταρα του στρώματος, σημειώθηκαν 27 θάνατοι (από το σύνολο των 50 ασθενών της ομάδας αυτής) οι οποίοι αποδόθηκαν σε αίτια άμεσα σχετιζόμενα με την πρόοδο της κακοήθειας τους, το οποίο αντιστοιχεί στο 54% του συνόλου των ασθενών αυτών. Οι αντίστοιχοι θάνατοι στην ομάδα των ασθενών με ασθενή χρώση ως προς την έκφραση της MCT4 στα κύτταρα του στρώματος ήταν 11, από το σύνολο των 57 ασθενών της ομάδας αυτής, το οποίο αντιστοιχεί σε 19%. Συγκρινόμενες οι δύο αυτές ομάδες παρουσιάζουν διαφορά η οποία είναι στατιστικά σημαντική με την τιμή του P να είναι μικρότερη από 0,001 ($p < 0.001$).

3.1 Διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS)

Η μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης η οποία παρατίθεται αναλυτικά στον Πίνακα 5 κατέδειξε ότι οι εξής παράγοντες σχετίζονται με μειωμένο διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS):

1. η παρουσία περισσότερων από τριών ηπατικών μεταστάσεων (HR 2.27; 95% CI, 1.36-3.80; P=0.002)
2. η παρουσία μεταστάσεων και στους δύο ηπατικούς λοβούς (HR 2.41; 95% CI, 1.47-3.94; P<0.001)
3. η πρόοδος της κακοήθειας κατά τη διάρκεια της προεγχειρητικής συστηματικής θεραπείας (neoadjuvant chemotherapy) σύμφωνα με τα κριτήρια του RECIST¹⁸⁶ (HR 3.84; 95% CI, 1.91-7.7; P<0.001)
4. όταν την ηπατεκτομή δεν ακολουθούσε συστηματική χημειοθεραπεία {(adjuvant-post hepatectomy chemotherapy), (HR 2.27; 95% CI, 1.34-3.84 ;P=0.002)}
5. ισχυρή χρώση των κυττάρων του στρώματος το οποίο περιβάλλει τα καρκινικά κύτταρα ως προς την MCT4 (HR 1.79; 95% CI, 1.12-2.85; P=0.014)

Παράμετρος	Διάστημα Ελεύθερο Νόσου (DFS)			
	Μονοπαραγοντική ανάλυση		Πολυπαραγοντική Αναλύση	
	HR (95% CI)	P- value	HR (95% CI)	P-value
Ηλικία κατά τη χειρουργική επέμβαση				
≤ 65 έτη	1(referent)			
>65 έτη	0.89(0.52-1.46)	0.665		
Φύλο				
Γυναίκα	1(referent)			
Άντρας	1.50(0.91-2.47)	0.104		
Αριθμός μεταστάσεων κατά τη διάγνωση				
≤ 3	1(referent)		1(referent)	
>3	2.27(1.36-3.80)	0.002	1.67(0.94-2.96)	0.076
Κατανομή των ηπατικών μεταστάσεων				
Ένα λοβό	1(referent)		1(referent)	
Δύο Λοβούς	2.41(1.47-3.94)	<0.001	2.05(1.15-3.65)	0.015

Παράμετρος	Διάστημα Ελεύθερο Νόσου (DFS)			
	Μονοπαραγοντική ανάλυση		Πολυπαραγοντική Αναλύση	
	HR(95% CI)	P- value	HR(95% CI)	P-value
Μέγεθος μεταστάσεων				
<5cm	1(referent)			
>5cm	1.18(0.67-2.07)	0.550		
Τύπος/χρόνος μεταστατικών εστιών				
Σύγχρονες	1(referent)			
Μετάχρονες	0.70(0.41-1.19)	0.191		
Τύπος Neoadjuvant χημειοθεραπείας				
Oxaliplatin-based	1(referent)			
Irinotecan-based	1.48(0.92-2.39)	0.102		

Παράμετρος	Διάστημα Ελεύθερο Νόσου (DFS)			
	Μονοπαραγοντική ανάλυση		Πολυπαραγοντική Αναλύση	
	HR(95% CI)	P- value	HR(95% CI)	P-value
Προεγχειρητική χορήγηση Bevacizumab				
No	1(referent)		1(referent)	
Yes	1.59(0.99-2.54)	0.052	1.57(0.96-2.56)	0.073
Ανταποκριση στη προεγχειρητική χημειοθεραπεία				
Ανταπόκριση	1(referent)		1(referent)	
Πρόοδος νόσου ⁺	3.84(1.91-7.71)	<0.001	3.60(1.62-7.99)	0.002
Αριθμός τμημάτων ήπατος που αφαιρέθηκαν κατά τη χειρουργική επέμβαση				
≤ 3	1(referent)			
>3	1.40(0.87-2.24)	0.155		
Πρωτοπαθής όγκος in situ κατά τη στιγμή της ηπατεκτομής				
Όχι	1(referent)			
Ναί ⁺⁺	1.59(0.89-2.84)	0.117		

Παράμετρος	Διάστημα Ελεύθερο Νόσου (DFS)			
	Μονοπαραγοντική ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση	
	HR(95% CI)	P- value	HR(95% CI)	P- value
Μετεγχειρητική Χημειοθεραπεία				
Ναι	1(referent)		1(referent)	
Όχι	2.27(1.34-3.84)	0.002	1.47(0.79-2.70)	0.217
Tumour MCT4 expression				
Ασθενής	1(referent)			
Ισχυρή	0.70(0.43-1.12)	0.145		
Έκφραση της MCT4 στα κύτταρα του στρώματος				
Ασθενής	1(referent)		1(referent)	
Ισχυρή	1.79(1.12-2.85)	0.014	1.95(1.19-3.17)	0.007
<p>⁺ ακτινολογική εικόνα πλήρους ή μερικής ανταπόκρισης ή σταθερή νόσος (σύμφωνα με τα κριτήρια RECIST)</p> <p>⁺⁺ δεκαπέντε ασθενείς υποβλήθηκαν σε σύγχρονη αφαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου και ηπατικών μεταστάσεων και τέσσερις ασθενείς υποβλήθηκαν στην τεχνική 'liver first'</p>				

Πίνακας 5: Μονοπαραγοντική και Πολυπαραγοντική ανάλυση για το DFS

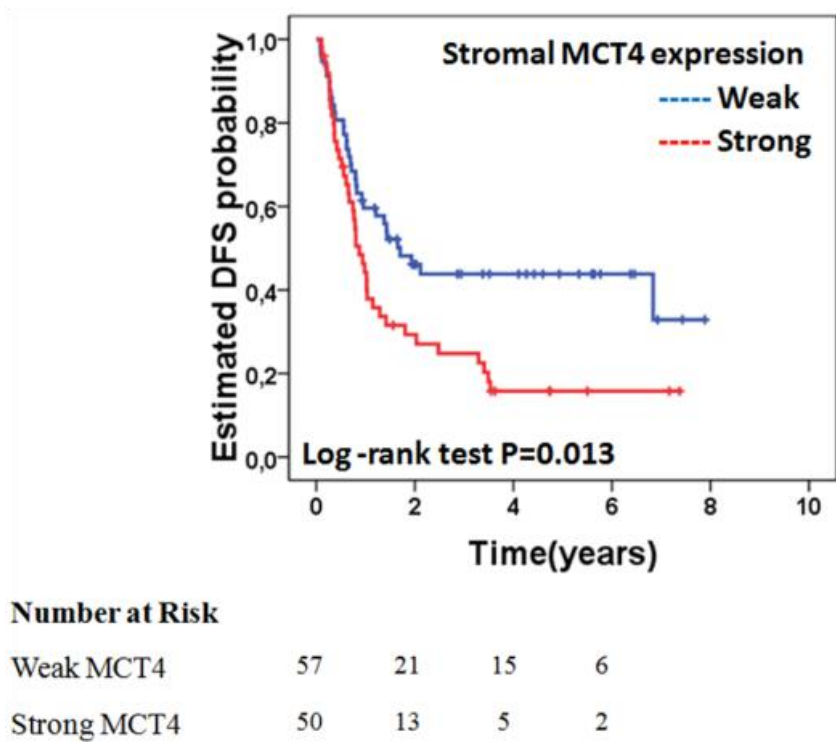
Το σημαντικό στοιχείο το οποίο προέκυψε από την ανάλυση αυτή ήταν ότι η έκφραση της MCT4 στα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στα κύτταρα του στρώματος τα οποία περιβάλλουν τα καρκινικά κύτταρα, δεν συνδεόταν με στατιστικά σημαντικό τρόπο με τη μείωση του διαστήματος χωρίς υποτροπή της νόσου, δηλαδή με το DFS (HR 0.70; 95% CI, 0.43-1.12; P=0.145).

Οι ασθενείς οι οποίοι εμφάνιζαν ισχυρή χρώση στα κύτταρα του στρώματος για την MCT4 είχαν μέσο διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) 10,5 μήνες, σε αντίθεση με τους ασθενείς οι οποίοι είχαν ασθενή χρώση στα κύτταρα του στρώματος για την MCT4, οι οποίοι εμφάνιζαν μέσο διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) 20,4 μήνες. Στα τρία χρόνια το διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) στην ομάδα των ασθενών με ισχυρή χρώση για την MCT4 ήταν 25% ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για την ομάδα των ασθενών με ασθενή χρώση για την MCT4 ήταν 43%. Η διαφορά αυτή όσον αφορά το διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) παρέμενε χωρίς ιδιαίτερη διακύμανση και κατά τη σύγκριση ανάμεσα στις δύο ομάδες ασθενών στα πέντε χρόνια παρακολούθησης. Τα ποσοστά αυτά για το διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) στα πέντε χρόνια ήταν 15% στην ομάδα των ασθενών με ισχυρή χρώση για την MCT4 και το ποσοστό αυτό για την ομάδα των ασθενών με ασθενή χρώση για την MCT4 ήταν 35%.

Η πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης για το διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) προσαρμόστηκε στον αριθμό των ηπατικών μεταστάσεων από ορθοκολικό καρκίνο, στην κατανομή των ηπατικών μεταστάσεων, στην προεγχειρητική χορήγηση Bevacizumab, στην ανταπόκριση στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία (neoadjuvant chemotherapy), στη χορήγηση μετεγχειρητικής χημειοθεραπείας (adjuvant-post hepatectomy chemotherapy) και στην έκφραση της MCT4 στα κύτταρα του στρώματος που περιβάλλουν τα καρκινικά κύτταρα του όγκου.

Στη πολυπαραγοντική ανάλυση οι παράγοντες οι οποίοι αφορούσαν το διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) και παρέμειναν στατιστικά σημαντικοί ήταν (Πίνακας 5):

1. η κατανομή των ηπατικών μεταστάσεων και στους δύο λοβούς (HR 2.05; 95% CI, 1.15-3.65 ;P=0.015)
2. η πρόοδος της νόσου κατά τη διάρκεια της προεγχειρητικής χημειοθεραπείας (HR 3.60; 95% CI, 1.62-7.99 ;P=0.002)
3. η ισχυρή χρώση των κυττάρων του στρώματος για την MCT4 (HR 1.95; 95% CI, 1.19-3.17; P=0.007) (Διάγραμμα 1)



Διάγραμμα 1: Οι ασθενείς οι οποίοι παρουσίαζαν ισχυρή χρώση στα κύτταρα του στρώματος για την MCT4 είχαν χειρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) από τους ασθενείς οι οποίοι παρουσίαζαν ασθενή χρώση για την MCT4

3.2 Συνολική Επιβίωση

Η μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης η οποία παρατίθεται αναλυτικά στον Πίνακα 6 κατέδειξε ότι οι εξής παράγοντες σχετίζονται με μειωμένη συνολική επιβίωση (OS):

1. κατανομή ηπατικών μεταστάσεων και στους δύο λοβούς (HR 2.87; 95% CI, 1.49-5.54; P=0.002)
2. απουσία μετεγχειρητικής χημειοθεραπείας {(adjuvant-post hepatectomy chemotherapy), (HR 3.04; 95% CI, 1.54-5.99 ;P=0.001)}
3. ισχυρή έκφραση στα κύτταρα του στρώματος τα οποία περιβάλλουν τα καρκινικά κύτταρα για την MCT4 (HR 3.81; 95% CI, 1.88-7.72 ;P<0.001)

Πολύ σημαντική για τη μελέτη ήταν η παρατήρηση ότι η έκφραση της MCT4 στα καρκινικά κύτταρα δεν συσχετιζόταν με τη συνολική επιβίωση (OS) των ασθενών αυτών, παρατήρηση η οποία είχε γίνει και για το διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) και επιβεβαιώνει τη θεωρία του Reverse Warburg effect στην οποία και βασίστηκε το πρωτόκολλο της μελέτης. (HR 1.02; 95% CI, 0.53-1.95 ;P=0.946).

Οι ασθενείς οι οποίοι εμφάνιζαν ισχυρή χρώση στα κύτταρα του στρώματος για την MCT4 είχαν μέσο χρόνο συνολικής επιβίωσης (OS) 56 μήνες, σε αντίθεση με τους ασθενείς οι οποίοι είχαν ασθενή χρώση στα κύτταρα του στρώματος για την MCT4, οι οποίοι εμφάνιζαν μέσο χρόνο συνολικής επιβίωσης (OS) 68 μήνες.

Στα τρία χρόνια ο χρόνος συνολικής επιβίωσης (OS) στην ομάδα των ασθενών με ισχυρή χρώση για την MCT4 ήταν 61% ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για την ομάδα των ασθενών με ασθενή χρώση για την MCT4 ήταν 89%. Η διαφορά αυτή όσον αφορά τον χρόνο συνολικής επιβίωσης

(OS) παρέμενε χωρίς ιδιαίτερη διακύμανση και κατά τη σύγκριση ανάμεσα στις δύο ομάδες ασθενών στα πέντε χρόνια παρακολούθησης. Τα ποσοστά αυτά για τον χρόνο συνολικής επιβίωσης (OS) στα πέντε χρόνια ήταν 37% στην ομάδα των ασθενών με ισχυρή χρώση για την MCT4 και το ποσοστό αυτό για την ομάδα των ασθενών με ασθενή χρώση για την MCT4 ήταν 78%.

Η πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης για τη συνολική επιβίωση (OS) προσαρμόστηκε στην κατανομή των ηπατικών μεταστάσεων από ορθοκολικό καρκίνο, στη χορήγηση μετεγχειρητικής χημειοθεραπείας και στην έκφραση της MCT4 στα κύτταρα του στρώματος. Ο σημαντικότερος παράγοντας ο οποίος συσχετίστηκε με τη μειωμένη συνολική επιβίωση (OS) κατά την ανάλυση αυτή ήταν η ισχυρή έκφραση της MCT4 στα κύτταρα του στρώματος κατά την πολυπαραγοντική ανάλυση (HR 4.38; 95% CI, 2.15 – 8.92, P<0.001), αν και η κατανομή των ηπατικών μεταστάσεων και στους δύο λοβούς παρέμεινε και αυτή στατιστικά σημαντική (HR 2.59; 95% CI, 1.23-5.45 ;P=0.012).

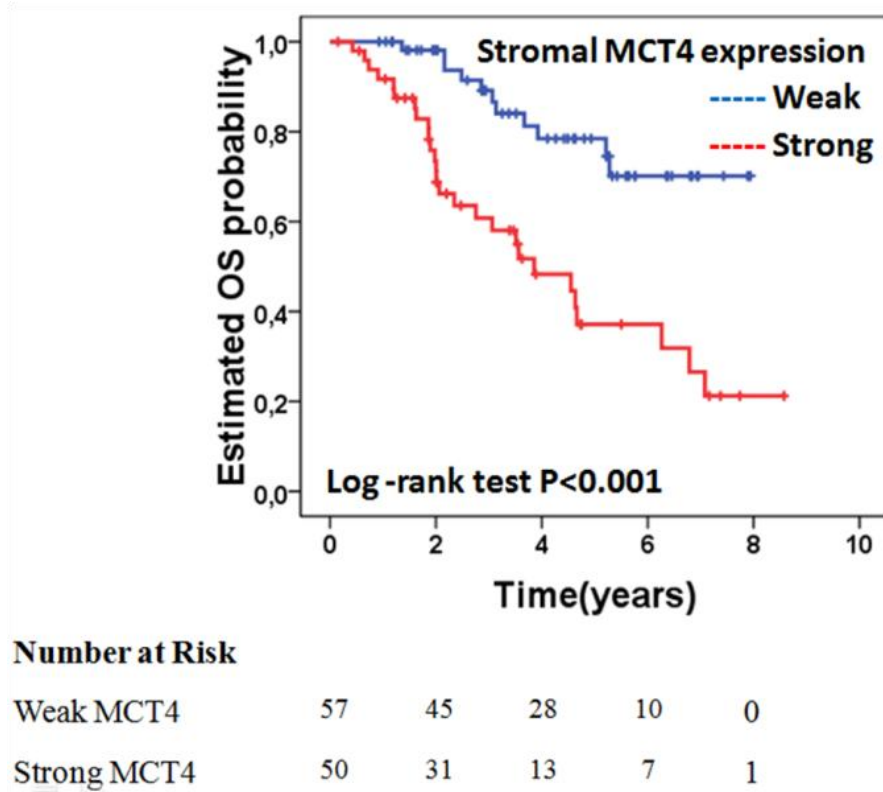
Παράμετρος	Συνολική Επιβίωση (OS)			
	Μονοπαραγοντική ανάλυση		Πολυπαραγοντική Αναλύση	
	HR (95% CI)	P- value	HR (95% CI)	P-value
Ηλικία κατά τη χειρουργική επέμβαση				
≤ 65 έτη	1(referent)			
>65 έτη	1.64(0.86-3.12)	0.130		
Φύλο				
Γυναίκα	1(referent)			
Άντρας	1.31(0.66-2.61)	0.428		
Αριθμός μεταστάσεων κατά τη διάγνωση				
≤ 3	1(referent)			
>3	1.63(0.79-3.37)	0.182		
Κατανομή των ηπατικών μεταστάσεων				
Ένα λοβό	1(referent)	0.002	2.59(1.23-5.45)	0.012
Δύο Λοβούς	2.87(1.49-5.54)			

Παράμετρος	Συνολική Επιβίωση (OS)			
	Μονοπαραγοντική ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση	
	HR(95% CI)	P- value	HR(95% CI)	P-value
Μέγεθος μεταστάσεων				
<5cm	1(referent)			
>5cm	1.37(0.64-2.92)	0.407		
Τύπος/χρόνος μεταστατικών εστιών				
Σύγχρονες	1(referent)			
Μετάχρονες	0.77(0.38-1.56)	0.473		
Τύπος Neoadjuvant χημειοθεραπείας				
Oxaliplatin-based	1(referent)			
Irinotecan-based	1.27(0.64-2.50)	0.485		

Παράμετρος	Συνολική Επιβίωση (OS)			
	Μονοπαραγοντική ανάλυση		Πολυπαραγοντική Αναλύση	
	HR(95% CI)	P- value	HR(95% CI)	P-value
Προεγχειρητική χορήγηση Bevacizumab				
Όχι	1(referent)			
Ναι	1.12(0.58-2.15)	0.727		
Ανταποκριση στη προεγχειρητική χημειοθεραπεία				
Ανταπόκριση	1(referent)			
Πρόοδος νόσου ⁺	2.14(0.82-5.56)	0.118		
Αριθμός τμημάτων ήπατος που αφαιρέθηκαν κατά τη χειρουργική επέμβαση				
≤ 3	1(referent)			
>3	1.23(0.65-2.35)	0.514		
Πρωτοπαθής όγκος in situ κατά τη στιγμή της ηπατεκτομής				
Όχι	1(referent)			
Ναι ⁺⁺	1.16(0.51-2.66)	0.712		

Παράμετρος	Συνολική Επιβίωση (OS)			
	Μονοπαραγοντική ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση	
	HR(95% CI)	P- value	HR(95% CI)	P- value
Μετεγχειρητική Χημειοθεραπεία				
Ναι	1(referent)		1(referent)	
Όχι	3.04(1.54-5.99)	0.001	2.10(0.98-4.48)	0.055
Tumour MCT4 expression				
Ασθενής	1(referent)			
Ισχυρή	1.02(0.53-1.95)	0.946		
Έκφραση της MCT4 στα κύτταρα του στρώματος				
Ασθενής	1(referent)		1(referent)	
Ισχυρή	3.81(1.88-7.72)	<0,001	4.38(2.15-8.92)	<0,001
<p>⁺ ακτινολογική εικόνα πλήρους ή μερικής ανταπόκρισης ή σταθερή νόσος (σύμφωνα με τα κριτήρια RECIST)</p> <p>⁺⁺ δεκαπέντε ασθενείς υποβλήθηκαν σε σύγχρονη αφαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου και ηπατικών μεταστάσεων και τέσσερις ασθενείς υποβλήθηκαν στην τεχνική 'liver first'</p>				

Πίνακας 6: Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση σε σχέση με τη συνολική επιβίωση



Διάγραμμα 2: Οι ασθενείς που εμφάνιζαν ισχυρή έκφραση στα κύτταρα του στρώματος για την MCT4 είχαν χειρότερη συνολική επιβίωση από τους ασθενείς που εμφάνιζαν ασθενή χρώση για την MCT4

4. Συζήτηση

Είναι πλέον καλά κατανοητό στις μέρες μας ότι τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν μοναδικά μεταβολικά σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία έχουν επιπτώσεις στη συμπεριφορά του όγκου και έχουν ουσιώδη προγνωστική σημασία για τον ασθενή. Οι κυτταρικές αυτές διεργασίες είναι παράλληλα και ένα καινούριο αντικείμενο μελέτης προς δημιουργία νέων θεραπευτικών παρεμβάσεων. Μία τέτοια χαρακτηριστική προσαρμογή αποτελεί και η χρήση του γαλακτικού οξέως προς παραγωγή ενέργειας, η οποία χρησιμοποιείται για συνέχιση των κυτταρικών λειτουργιών των καρκινικών κυττάρων. Η ιδιαιτερότητα της προσαρμογής αυτής είναι η χρήση του γαλακτικού οξέος ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι οξυγόνου.

Ιδιαίτερη έμφαση στις κυτταρικές λειτουργίες που διαμορφώνονται κατά τη διάρκεια δημιουργίας αλλά και επέκτασης των διαφόρων μορφών νεοπλασιών πρέπει να αποδοθεί και στο μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων. Το μικροπεριβάλλον αυτό αποτελείται από μεγάλο αριθμό κυττάρων, αλλά όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις τους με τα καρκινικά κύτταρα, οι ινοβλάστες οι οποίοι σχετίζονται με τον καρκίνο (Cancer Associated Fibroblasts-CAFs) έχουν μελετηθεί περισσότερο στη βιβλιογραφία και αποτέλεσαν και το βασικό αντικείμενο μελέτης στην παρούσα εργασία. Τα κύτταρα αυτά φαίνεται να επιτελούν πληθώρα λειτουργιών και να συμμετέχουν πιο ενεργά από ότι πιστευόταν στο παρελθόν στην εξέλιξη του καρκίνου.

Η πρωτεΐνη MCT4 αποτελεί ένα διαμεμβρανικό μεταφορέα των μονοκαρβοξυλασών και εντοπίζεται φυσιολογικά σε κύτταρα τα οποία χρησιμοποιούν την αερόβιο γλυκόλυση προς παραγωγή ενέργειας και τα οποία δεν έχουν λειτουργικά μιτοχόνδρια. Η έκφραση της MCT4 είναι υψηλότερη στις σκελετικές μυϊκές ίνες, ιδιαίτερα στις τύπου II μυϊκές ίνες (fast-twitch fibers) και σε χαμηλότερα επίπεδα στον πλακούντα, όρχεις, πνεύμονες, χονδροκύτταρα,

λευκοκύτταρα και αστροκύτταρα.¹⁹⁹⁻²⁰² Η έκφραση της αυξάνεται σε συνθήκες υποξίας και η μεταγραφή της ενισχύεται από το παράγοντα HIF-1a. Σε συνθήκες υποξίας, οι αυξημένες ποσότητες της MCT4 είναι απαραίτητες για τη μεταφορά του παραγόμενου γαλακτικού οξέως εκτός του κυττάρου όπου μεταφέρεται στη συνέχεια προς το ήπαρ για περαιτέρω επεξεργασία. Όταν το γαλακτικό οξύ μεταφέρεται έξω από τα γλυκολυτικά κύτταρα διαμέσου της μεμβρανικής πρωτεΐνης MCT4 προσλαμβάνεται από παρακείμενα κύτταρα με την χρήση άλλων μεταφορέων των μονοκαρβοξυλασών. Για παράδειγμα το γαλακτικό οξύ που παράγεται από τις γρήγορα συσπώμενες μυϊκές ίνες (fast-twitch fibers) μεταφέρεται εκτός του κυτταροπλάσματος τους από την MCT4 και στη συνέχεια αυτό προσλαμβάνεται από τις αργά συσπώμενες μυϊκές ίνες (slow-twitch fibers) με τη βοήθεια της MCT1. Ανάλογο φαινόμενο παρατηρείται και μεταξύ των κυττάρων του εγκεφαλικού παρεγχύματος, όπου το γαλακτικό οξύ το οποίο παράγεται από τα αστροκύτταρα, μεταφέρεται εκτός των κυττάρων αυτών από την MCT4 και στη συνέχεια προσλαμβάνεται από τους νευρώνες με την χρήση της MCT2. Η MCT1 και η MCT2 είναι παρόμοιες τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργικότητα. Αυτοί οι δύο μηχανισμοί ανταλλαγής γαλακτικού οξέως που συμβαίνουν φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό ονομάστηκαν για την μεν σύζευξη των αστροκυττάρων με τους νευρώνες “neuronglia metabolic coupling” και για την σύζευξη που υπάρχει στους σκελετικούς μύες “lactate shuttle”.

Το φαινόμενο «Reverse Warburg», όρος πολύ πρόσφατος στη βιβλιογραφία, εμφανίστηκε για πρώτη φορά με τις μελέτες που παρουσίασε ο καθηγητής P. Lisanti το 2009 και αφορούσαν στην πλειονότητα τους, τον καρκίνο του μαστού. Σύμφωνα με αυτό το πρωτοποριακό μοντέλο η αερόβια γλυκόλυση, η διάσπαση δηλαδή της γλυκόζης παρά την παρουσία φυσιολογικής μερικής τάσης οξυγόνου, συμβαίνει στα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και συγκεκριμένα στους CAFs και όχι στα ίδια τα καρκινικά κύτταρα όπως υποστηριζόταν από την

επιστημονική κοινότητα επί δεκαετίες. Η ονομασία του φαινομένου αυτού από τους ερευνητές, δηλαδή το «The Reverse Warburg Effect», τονίζει την σπουδαιότητα της ανακάλυψης αυτής, έρχεται δηλαδή σε αντιδιαστολή με το συμβατικό «Warburg Effect, το οποίο είχε αρχικά περιγραφεί και δήλωνε τη μετατροπή αυτή της γλυκόζης σε γαλακτικό εντός των καρκινικών κυττάρων^{160,164}.

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να τροποποιούν τη συμπεριφορά των κυττάρων που τα περιβάλλει, δηλαδή του μικροπεριβάλλοντος τους. Η έκκριση από αυτά υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) προκαλεί οξειδωτικό στρες (ψευδοϋποξία) στα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος και ιδιαίτερα στους CAFs με αποτέλεσμα την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS). Το αντίκτυπο της δημιουργίας των ROS στον κυτταρικό μεταβολισμό έχει μελετηθεί σε αρκετό αριθμό εργασιών²⁰⁴. Συμμετέχουν όχι μόνο στις διαδικασίες της κυτταρικής απόπτωσης αλλά και στην κινητοποίηση των αμυντικών μηχανισμών του οργανισμού καθώς και στην προώθηση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, με τελική συνέπεια τον καθοριστικό τους ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό. Ένα παράδειγμα από τις σημαντικές λειτουργίες των ROS διαφαίνεται από σε μια μελέτη των αιμοπεταλίων (PLT) τα οποία συμμετέχουν στην περίπλοκη διαδικασία της ιστικής επούλωσης και τα οποία με την έκκριση των ROS προάγουν την κινητοποίηση και προσέλκυση και άλλων αιμοπεταλίων προς την περιοχή του τραυματισμού για επίτευξη τελικά της επούλωσης. Όσον αφορά και την παρούσα εργασία οι ROS που παράγονται στους ινοβλάστες (CAFs) που υπάρχουν στο μικροπεριβάλλον του καρκινικού στρώματος, προάγουν τη μεταγραφή των NFκB και HIF1-α. Η ενεργοποίηση του συγκεκριμένου σηματοδοτικού μηχανισμού έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη μιτοχονδριοφαγία/αυτοφαγία, την αερόβια γλυκόλυση και την έκκριση φλεγμονωδών παραγόντων. Η κυτταρική αυτή προσαρμογή στους ινοβλάστες, η οποία προκαλείται από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, δημιουργεί την

περίσσεια του γαλακτικού οξέως που χρησιμοποιείται τελικά από τα καρκινικά αυτά κύτταρα για κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών. Ο σηματοδοτικός αυτός μηχανισμός προκαλεί και την αύξηση της μεταγραφής της MCT4 η οποία σκοπό έχει τη μεταφορά του παραγόμενου γαλακτικού οξέως εκτός του κυτταροπλάσματος²⁰⁵⁻²⁰⁶.

Ακόμα ένα σημαντικό αντίκτυπο από την ενεργοποίηση του μικροπεριβάλλοντος των καρκινικών είναι και η παραγωγή παραγωγή νουκλεοτιδίων, λιπαρών οξέων και διάφορων αμινοξέων όπως είναι η γλουταμίνη. Τα καταβολικά αυτά προϊόντα έχουν σαν τελικό αποτέλεσμα την αύξηση των μιτοχονδρίων, την αύξηση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) και την αντίσταση στην αυτοφαγία στα ίδια τα καρκινικά κύτταρα. Όλοι αυτοί οι παράγοντες συνεργάζονται για να δημιουργηθεί η αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στη κυτταρική απόπτωση που προκαλούν τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Συνεπώς τα καρκινικά κύτταρα τροποποιώντας τη συμπεριφορά των κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος τους, επιτυγχάνουν την πρόσληψη από αυτά θρεπτικών ουσιών όπως είναι το γαλακτικό οξύ που είναι απαραίτητα για τον κυτταρικό μεταβολισμό τους, αλλά παράλληλα αυξάνουν και τον ίδιο το δικό τους μεταβολισμό και την αντίσταση τους στον κυτταρικό θάνατο. Οι κυτταρικές αυτές διεργασίες οι οποίες πραγματοποιούνται σε μικροσκοπικό επίπεδο έχουν τελικά σημαντικό αντίκτυπο στην επέκταση των κακοηθειών άρα και στην τελική έκβαση των ασθενών αυτών²⁰⁷.

Συγκεκριμένα η αερόβια γλυκόλυση που πραγματοποιείται στους ινοβλάστες (CAFs) του στρώματος των καρκινικών κυττάρων παράγει γαλακτικό οξύ το οποίο μεταφέρεται με τη χρήση της MCT4 εκτός των κυττάρων αυτών και στη συνέχεια προσλαμβάνεται από μια άλλη MCT η οποία βρίσκεται στη μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε διέγερση και έχουν αυξημένη δραστηριότητα όσον αφορά την οξειδωτική φωσφορυλίωση χρησιμοποιούν τα γαλακτικό οξύ ως πρώτη ύλη για την παραγωγή ενέργειας.

Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό οι ινοβλάστες θρέφουν τα καρκινικά κύτταρα και συμβάλλουν στη επέκταση και μεταστατική ικανότητα του όγκου.

Σκοπός της πραγματοποίησης της μελέτης για τον ορθοκολικό καρκίνο με ηπατικές μεταστάσεις ήταν ο καθορισμός της σχέσης των πιο πάνω δεδομένων στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν ακόμα στοιχεία για την ύπαρξη του φαινομένου «Reverse Warburg» όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Αν υπάρχει αυτό το φαινόμενο τότε τα επίπεδα της MCT4 πρέπει να είναι αυξημένα στους ασθενείς με χειρότερη πρόγνωση. Η μελέτη της έκφρασης της MCT4 έγινε με ανοσοϊστοχημεία, αξιολογήθηκε τελικά με ημιποσοτική μέθοδο και δημιουργήθηκαν δύο μεγάλες κατηγορίες ασθενών. Στην πρώτη κατηγορία ήταν οι ασθενείς στους οποίους τα ιστολογικά παρασκευάσματα της ηπατεκτομής είχαν ασθενή έκφραση της MCT4 στα κύτταρα του στρώματος και στη δεύτερη κατηγορία οι ασθενείς οι οποίοι έκφραζαν την MCT4 σε υψηλά επίπεδα. Υψηλή έκφραση της MCT4 δηλώνει και την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών εκείνων μονοπατιών κατά τα οποία παρά τη φυσιολογική μερική τάση του οξυγόνου στα κύτταρα του στρώματος, λαμβάνει χώρα η αερόβια γλυκόλυση και όχι οξειδωτική φωσφορυλίωση όπως θα αναμενόταν.

Η σύγκριση των δύο ομάδων ασθενών σε συνάρτηση με τη συνολική τους επιβίωση (OS) και το διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS), ανέδειξε ότι η ομάδα των ασθενών στους οποίους υπήρχε υψηλή έκφραση της MCT4 στα κύτταρα του στρώματος και συγκεκριμένα στους CAFs βρίσκονταν σε στατιστικά σημαντική δυσμενέστερη θέση. Σημαντικό στοιχείο των αποτελεσμάτων της μελέτης αυτής ήταν ότι η έκφραση της MCT4 στα ίδια τα καρκινικά κύτταρα δεν σχετιζόταν με μειωμένη επιβίωση ή μειωμένο διάστημα ελεύθερο νόσου.

Οι ασθενείς οι οποίοι εμφάνιζαν ισχυρή χρώση στα κύτταρα του στρώματος για την MCT4 είχαν μέσο χρόνο συνολικής επιβίωσης (OS) 56 μήνες, σε αντίθεση με τους ασθενείς οι οποίοι είχαν ασθενή χρώση στα κύτταρα του στρώματος για την MCT4, οι οποίοι εμφάνιζαν μέσο χρόνο συνολικής επιβίωσης (OS) 68 μήνες.

Στα τρία χρόνια ο χρόνος συνολικής επιβίωσης (OS) στην ομάδα των ασθενών με ισχυρή χρώση για την MCT4 ήταν 61% ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για την ομάδα των ασθενών με ασθενή χρώση για την MCT4 ήταν 89%. Η διαφορά αυτή όσον αφορά το χρόνο συνολικής επιβίωσης (OS) παρέμενε χωρίς ιδιαίτερη διακύμανση και κατά τη σύγκριση ανάμεσα στις δύο ομάδες ασθενών στα πέντε χρόνια παρακολούθησης. Τα ποσοστά αυτά για το χρόνο συνολικής επιβίωσης (OS) στα πέντε χρόνια ήταν 37% στην ομάδα των ασθενών με ισχυρή χρώση για την MCT4 και το αντίστοιχο ποσοστό για την ομάδα των ασθενών με ασθενή χρώση για την MCT4 ήταν 78%. Συμπερασματικά η πενταετής συνολική επιβίωση είναι 41% υψηλότερη στους ασθενείς οι οποίοι εκφράζουν σε χαμηλά επίπεδα στην κυτταρική μεμβράνη των CAFs τους την πρωτεΐνη MCT4. Τα αποτελέσματα αυτά δικαιολογούν το χαρακτηρισμό της MCT4 ως ένα νέο μοριακό δείκτη ο οποίος αξιολογεί την πρόγνωση των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο και ηπατικές μεταστάσεις.

Δευτερεύοντα αποτελέσματα που προήλθαν από τη μελέτη μας και αφορούν την προγνωστικοποίηση των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο και ηπατικές μεταστάσεις ήταν η διασύνδεση της συνολικής επιβίωσης με την κατανομή των ηπατικών μεταστάσεων και στους δύο λοβούς και την απουσία μετεγχειρητικής χημειοθεραπείας.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στην παρούσα μελέτη έρχονται σε συμφωνία και με άλλες έρευνες οι οποίες σύνδεσαν την έκφραση της MCT4 με τη τελική έκβαση των κακοηθειών

σε διάφορα όργανα. Υπάρχουν μελέτες στη βιβλιογραφία για τον καρκίνο του προστάτη, του μαστού, του στομάχου, του επιθηλιακού καρκίνου κεφαλής και τραχήλου και του παχέος εντέρου, μια σύνοψη των οποίων εκτίθεται πιο κάτω. Παράλληλα γίνεται προσπάθεια σύγκρισης των αποτελεσμάτων που υπάρχουν στη βιβλιογραφία με τα δικά μας αποτελέσματα.

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποια άλλη μελέτη στη διεθνή βιβλιογραφία η οποία να επιχειρήσει τη διασύνδεση της MCT4 με τη πρόγνωση των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο και ηπατικές μεταστάσεις. Με βάση αυτή την επισήμανση τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης είναι μοναδικά και η σύγκριση τους μπορεί να γίνει μόνο με αποτελέσματα άλλων μελετών που διερεύνησαν το ρόλο της MCT4 στην πρόγνωση άλλων μορφών καρκίνου.

Οι Nelma Pértega-Gomes και συνεργάτες, το 2014, σε μελέτη την οποία πραγματοποίησαν σε 480 ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε ριζική προστατεκτομή χωρίς προηγούμενη ορμονοθεραπεία, απέδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούσαν την αερόβια γλυκόλυση για κάλυψη των μεταβολικών τους αναγκών. Απέδειξαν την ύπαρξη του φαινομένου «Reverse Warburg» στους ινοβλάστες (CAFs) του καρκινικού στρώματος προσδιορίζοντας την έκφραση της MCT4 και της CAIX (Carbonic anhydrase IX). Οι μεταβολικές αυτές προσαρμογές των κυττάρων αυτών ήταν παρούσες από τα αρχικά στάδια του καρκίνου, γεγονός που υπονοεί τη συμμετοχή τους στις διεργασίες επέκτασης της κακοήθειας. Τέλος στην έρευνα τους συνέδεσαν την υψηλή έκφραση της MCT4 στους ινοβλάστες (CAFs) και τη ταυτόχρονη υψηλή έκφραση της MCT1 στη μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων με χαμηλότερη συνολική επιβίωση. Τα δύο αυτά γεγονότα αποδεικνύουν το μεταβολικό συνεταιρισμό μεταξύ ινοβλαστών (CAFs) και καρκινικών κυττάρων, που έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά γαλακτικού οξέως στα κύτταρα του καρκίνου του προστάτη και τη χρησιμοποίησή του για τις μεταβολικές τους ανάγκες. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συνάδουν με τα δικά

μας κατά τα οποία παρατηρήσαμε μειωμένη συνολική επιβίωση (OS) και μειωμένο διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) στους ασθενείς που έκφραζαν στους ινοβλάστες (CAFs) του καρκινικού στρώματος υψηλά επίπεδα MCT4²⁰⁸.

Ο Baenke F. και συνεργάτες, το 2015, δημοσίευσαν τη μελέτη τους που αφορούσε τη συμμετοχή της MCT4 στις κυτταρικές διεργασίες που επισυμβαίνουν στον καρκίνο του μαστού. Η μελέτη αυτή στηρίχτηκε σε 17 σειρές ασθενών με καρκίνο του μαστού και απέδειξε το σημαντικό ρόλο της MCT4 στον κυτταρικό μεταβολισμό και στην επιβίωση και εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων. Επίσης κατά τη μελέτη αυτή, η αναστολή της MCT4 προκαλούσε στα καρκινικά κύτταρα εξάρτηση από τη μιτοχονδριακή αναπνοή και το μεταβολισμό της γλουταμίνης. Απέδειξαν ακόμα ότι η έκφραση της MCT4 ρυθμίζεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-Akt και ότι εκφράζεται περισσότερο στους HER2 (+) καρκίνους του μαστού. Η υπερέκφραση της MCT4 συνδέθηκε επίσης και με χειρότερη επιβίωση στους ασθενείς αυτούς²⁰⁹.

Οι Ji Yun Lee και συνεργάτες, το 2016, μελέτησαν το ρόλο που διαδραματίζουν οι μεταφορείς των μονοκαρβοξυλασών (MCTs) στον καρκίνο του στομάχου. Αρχικά απέδειξαν την υπερέκφραση της MCT4 και MCT1 σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του στομάχου. Η MCT4 ήταν ιδιαίτερα αυξημένη σε κυτταρικές σειρές οι οποίες προέρχονταν από όγκους οι οποίοι παρουσιάστηκαν αρχικά με μεταστάσεις και κακοήθη ασκίτη. Η συγκεκριμένη παρατήρηση διασυνδέει την έκφραση της MCT4 με τη χειρότερη πρόγνωση των ασθενών. Στη συνέχεια απέδειξαν *in vitro* ότι με τη χρήση αναστολέων των μεταφορέων των μονοκαρβοξυλασών (siMCT1, 2, or 4) σε κυτταρικές σειρές από καρκίνο του στομάχου, εντός 72 ωρών, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυτών μειωνόταν σε μεγάλο βαθμό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου όπου δεν υπήρχε ο αναστολέας. Στη συνέχεια προχώρησαν τη μελέτη τους *in vivo*, με τη χρήση ποντικών στα οποία είχαν προηγουμένως εμφυτεύσει κύτταρα από καρκίνο του

στομάχου. Με τη χρήση αναστολέων των μεταφορέων των μονοκαρβοξυλασών παρατήρησαν σημαντική μείωση του μεγέθους των όγκων μέσα σε μία εβδομάδα από τη χορήγηση του αναστολέα. Απέδειξαν ακόμα τη συνεργική δράση των αναστολέων των MCTs με χημειοθεραπευτικά σχήματα (συγκεκριμένα με την 5-FU) όσον αφορά τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων²¹⁰.

Οι Pinheiro C και συνεργάτες το 2008, μελέτησαν την έκφραση των μεταφορέων των μονοκαρβοξυλασών σε νεοπλασματικές και μη παθήσεις του τραχήλου της μήτρας. Ανέλυσαν δεδομένα από 29 ασθενείς με χρόνια τραχηλίτιδα, 30 ασθενείς με χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές βλάβες, 32 ασθενείς με υψηλού βαθμού διαφοροποίησης πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές βλάβες, 49 ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα, 51 ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και 30 ασθενείς με αδενοπλάκωδες καρκίνωμα. Τα αποτελέσματα τους ανέδειξαν σημαντική αύξηση της έκφρασης των MCTs από τις προ-διηθητικές προς τις διηθητικές βλάβες εκ πλακωδών κυττάρων καθώς και από το φυσιολογικό αδενικό επιθήλιο προς το αδενοκαρκίνωμα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά με τη θεωρία της ύπαρξης άμεσης συσχέτισης των MCTs με την ανάπτυξη των διαφόρων μορφών νεοπλασιών²¹¹.

Οι Witkiewicz και συνεργάτες, το 2012, διερεύνησαν την προγνωστική αξία του επιπέδου έκφρασης της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης MCT4 στο στρώμα 181 ασθενών με τριπλά αρνητικών καρκίνων του μαστού (ER - ; PR - ; HER2 -). Η έρευνα αυτή κατέδειξε ότι όσο πιο υψηλή ήταν η έκφραση της MCT4 στο στρώμα τόσο πιο κακή ήταν η πρόγνωση των ασθενών. Έτσι η 10 ετής επιβίωση των ασθενών με υψηλή, μέτρια και καθόλου έκφραση του MCT4 στο στρώμα ήταν 17.7%, 75.5% και 96.9% αντίστοιχα. Το επίπεδο έκφρασης του MCT4 στο στρώμα ήταν αντιστρόφως ανάλογο με το επίπεδο έκφρασης στο ίδιο διαμέρισμα της caveolin-1 (p-value 5×10^{-15}), της οποίας η προγνωστική αξία στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού είχε δειχθεί

από την ίδια ομάδα στο παρελθόν¹⁹². Η διαφορά στη συνολική επιβίωση για τον καρκίνο του μαστού ανάμεσα στις ομάδες οι οποίες έκφραζαν ή όχι την MCT4 είναι μεγαλύτερη στην έρευνα αυτή σε σχέση με τα δικά μας αποτελέσματα.

Παρόμοια αποτελέσματα με τη δική μας μελέτη δημοσίευσαν το 2013, οι Joseph M. Curry και συνεργάτες όσον αφορά το ρόλο που διαδραματίζει η MCT4 στον καρκίνο εκ πλακωδών κυττάρων της κεφαλής και του τραχήλου (HNSCC). Απέδειξαν με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας ότι τα ψηλότερα επίπεδα έκφρασης της MCT4 στους ινοβλάστες συνδέονταν με χειρότερη πρόγνωση για τους ασθενείς αυτούς. Επίσης συσχέτισαν την ύπαρξη οξειδωτικού στρες στους ινοβλάστες (MCT4+) με πιο προχωρημένο στάδιο κατά TNM και πρότειναν πέρα από τη χρησιμοποίηση των αποτελεσμάτων αυτών για προγνωστικοποίηση των ασθενών, την εισαγωγή αντιοξειδωτικών παραγόντων στη θεραπεία της συγκεκριμένης μορφής καρκίνου²¹⁸.

Μια έρευνα μελέτησε τη σχέση της έκφρασης της MCT4 στον καρκίνο εκ διαυγών κυττάρων του νεφρού (ccRCC). Στη μελέτη αυτή, οι Pascale Fisel και συνεργάτες το 2013, μελέτησαν τη προγνωστική αξία της έκφρασης της MCT4 ως προς τη συνολική επιβίωση των ασθενών καθώς επίσης και τις περιοχές του DNA οι οποίες λόγω αλλοιώσεων μεθυλίωσης προκαλούσαν την αύξηση της MCT4. Ο πληθυσμός της μελέτης αφορούσε 207 ασθενείς με καρκίνο νεφρού εκ διαυγών κυττάρων. Τα δεδομένα των ασθενών αυτών συγκρίθηκαν με δεδομένα από 482 ασθενείς με ccRCC τους οποίους το γονιδίωμα είχε χαρτογραφηθεί σε προηγούμενη μελέτη (The Cancer Genome Atlas -TCGA). Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μεθυλίωση του γονιδίου *SLC16A3* μείωνε τη μεταγραφή της MCT4 και το τελικό αποτέλεσμα των διεργασιών αυτών συνδέθηκε με καλύτερη πρόγνωση για τους ασθενείς αυτούς. Όπως και στα δικά μας αποτελέσματα η αυξημένη έκφραση της MCT4 συνδέθηκε με χειρότερη επιβίωση στους ασθενείς αυτούς²¹⁹.

Μια μελέτη με διαφορετικά αποτελέσματα δημοσιεύτηκε από τους Tineke W.H. Meijer, το 2012, και αφορούσε τις διαφορές στο μεταβολικό προφίλ των καρκινικών κυττάρων που προέρχονται από αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα και από μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα εκπλακωδών κυττάρων πνεύμονα. Κατά τη μελέτη αυτή αξιολογήθηκε η σχέση της υποξίας και της γλυκόλυσης, όπως αυτή εκφράζεται από τους κυτταρικούς δείκτες GLUT1 και MCT4 καθώς επίσης και τη θέση των κυττάρων αυτών σε σχέση με τις αγγειακές δομές. Η μελέτη αυτή κατέληξε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει διαφορά στον τρόπο με τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα του αδenoκαρκινώματος καλύπτουν τις ενεργειακές τους ανάγκες σε σχέση με αυτά που προέρχονται από επιθηλιακό καρκίνο. Στους καρκίνους από επιθηλιακά κύτταρα υπήρχε αύξηση στην έκφραση των GLUT1 υποδοχέων σε σχέση με τα αδenoκαρκινώματα. Επίσης στους καρκίνους από επιθηλιακά κύτταρα υπήρχε αύξηση των GLUT1 και MCT4 στα κύτταρα που βρίσκονταν μακριά από τα τροφοφόρα αγγεία σε αντίθεση με τα αδenoκαρκινώματα στα οποία η MCT4 ήταν αυξημένη σε κύτταρα που βρίσκονταν δίπλα από αγγειακές δομές. Επίσης τα μεν αδenoκαρκινώματα χρησιμοποιούν την αερόβιο γλυκόλυση για παραγωγή του ATP, αποτέλεσμα το οποίο συνάδει και με τα δικά μας αποτελέσματα για τον ορθοκολικό καρκίνο με ηπατικές μεταστάσεις, σε αντίθεση με τους καρκίνους από επιθηλιακά κύτταρα οι οποίοι χρησιμοποιούν την οξειδωτική φωσφορυλίωση και την αναερόβια γλυκόλυση όταν υπάρχουν συνθήκες υποξίας. Η αύξηση της MCT4 στα αδenoκαρκινώματα του πνεύμονα συνδέθηκε με χειρότερη πρόγνωση για τους ασθενείς²²⁰.

Ο Yukito G, και συνεργάτες μελέτησαν την έκφραση της MCT4 στον καρκίνο του παχέως εντέρου και τη συσχέτιση της με το κλινικό στάδιο και κατ'επέκταση με την πρόγνωση των ασθενών αυτών. Ειδικότερα ανέλυσαν την έκφραση της MCT4 και του VEGF (vascular endothelial growth factor) σε ιστοπαθολογικά δείγματα ασθενών με καρκίνο παχέως εντέρου που

είχαν υποβληθεί προηγουμένως σε θεραπευτική κολεκτομή. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το μέγεθος του όγκου ήταν με στατιστικά σημαντικό τρόπο μικρότερο ($p=0.0031$) και η νόσος λιγότερο προχωρημένη ($p=0.0017$) στους ασθενείς οι οποίοι δεν έκφραζαν την MCT4 και ταυτόχρονα έκφραζαν τον VEGF σε σύγκριση με τους ασθενείς οι οποίοι ήταν MCT4(+)/VEGF(-). Επίσης κατά την εργασία τους συμπέραναν ότι στον καρκίνο του παχέος εντέρου ο VEGF εμπλέκεται στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης της νόσου ενώ η έκφραση της MCT4 παρουσιάζεται με την πρόοδο της νόσου. Η έκφραση αυτή της MCT4 συνδέθηκε με αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού του όγκου καθώς επίσης και με τη δυνατότητα του για επέκταση και μετάσταση²⁵⁷.

Από τα πιο πάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι η MCT4 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας αξιόπιστος μοριακός δείκτης για την πρόγνωση αρκετών μορφών καρκίνου. Η προσαρμογή των κυττάρων του στρώματος που περιβάλλει τα καρκινικά κύτταρα σε αερόβια γλυκόλυση, και η τροφοδοσία των καρκινικών κυττάρων με μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέως, ωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους και κατά συνέπεια την επέκταση της κακοήθειας. Η χρήση όμως της MCT4 δεν περιορίζεται μόνο στον καθορισμό της πρόγνωσης. Σημαντικό στοιχείο όπως θα αναλυθεί παρακάτω είναι οι δυνατότητες που δημιουργούνται για νέες θεραπευτικές παρεμβάσεις όσον αφορά τις κακοήθειες.

4.1 Θεραπευτικές προσεγγίσεις σχετιζόμενες με την MCT4, το «Reverse Warburg Effect» και το «Stromal-Epithelial Metabolic Coupling»

Όσα έχουν αναφερθεί κατά τη συζήτηση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας μπορούν να συνοψιστούν σε μια πρόταση ως εξής: Τα καρκινικά κύτταρα προάγοντας το οξειδωτικό στρες στους CAFs οδηγούν τα τελευταία σε αερόβια γλυκόλυση και αυτοφαγία/

μιτοχονδριοφαγία με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένας μεταβολικός συνεταιρισμός CAFs/καρκινικών κυττάρων που ευνοεί την ανάπτυξη των τελευταίων. Η διακοπή αυτής της συνέργειας σε οποιοδήποτε σημείο της αλληλουχίας των γεγονότων θα μπορούσε να επηρεάσει αρνητικά την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, όπως έχει αποδειχτεί και *in vivo* σε πειραματόζωα.

Η ιδέα της στοχοποίησης του κυτταρικού μεταβολισμού με τη δημιουργία των κατάλληλων εκείνων φαρμάκων τα οποία θα διακόπτουν συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια με αποτέλεσμα να τερματίζονται οι κυτταρικές εκείνες προσαρμογές που προκαλούν στα καρκινικά κύτταρα την ικανότητα πολλαπλασιασμού και επέκτασης αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας στις μέρες μας.

Αυτή η διαπίστωση μας φέρνει στο μείζον ζήτημα που απασχολεί την επιστημονική κοινότητα στις μέρες μας που δεν είναι άλλο από την θεραπεία των πασχόντων από κακοήθειες. Δηλαδή τίθεται σαφώς το ερώτημα κατά πόσο η διακοπή αυτού του μεταβολικού συνεταιρισμού μεταξύ καρκινικών κυττάρων και των φυσιολογικών κυττάρων του στρώματος θα μπορούσε να προβεί προς όφελος ενός καρκινοπαθούς.

Οι δυνητικοί φαρμακευτικοί στόχοι που θα μπορούσαν να διακόψουν την μεταβολική σχέση CAFs/καρκινικών κυττάρων είναι αρκετοί μια σύνοψη των οποίων γίνεται πιο κάτω:

1)Αναστολή της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου από τα καρκινικά κύτταρα και γενικότερα αναστολή του οξειδωτικού στρες στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Κάτι τέτοιο θα διέκοπτε την αλληλουχία των γεγονότων σε πολύ αρχικό στάδιο, με δεδομένο ότι το οξειδωτικό στρες είναι η γενεσιουργός αιτία όλων των μεταβολών που οδηγούν στο μεταβολικό συνεταιρισμό CAFs/καρκινικών κυττάρων.

2)Αναστολή της ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1 και NF-κB. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται σαν συνέπεια του οξειδωτικού στρες που προκαλείται στους CAFs από τα καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα να τους οδηγήσουν στην αυτοφαγία/μιτοχονδριοφαγία και την αερόβια γλυκόλυση.

3)Αναστολή της αυτοφαγίας στους CAFs ή ενίσχυση της αυτοφαγίας στα καρκινικά κύτταρα. Κάτι τέτοιο θα σταματούσε τον μεταβολικό συνεταιρισμό CAFs/καρκινικών κυττάρων

4)Αναστολή της γλυκόλυσης στους CAFs ή αναστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα καρκινικά κύτταρα

5)Αναστολή της μεταφοράς γαλακτικού/πυρουβικού οξέος από τους CAFs στα καρκινικά κύτταρα αναστέλλοντας είτε τη δράση των μεταφορέων MCT4 στους CAFs είτε των μεταφορέων MCT1 στα καρκινικά κύτταρα. Κάτι τέτοιο θα ήταν καταστροφικό τόσο για τους CAFs στους οποίους θα συγκεντρώνονταν μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος όσο και για τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα που θα στερούνταν τα απαραίτητα για την οξειδωτική τους φωσφορυλίωση τελικά προϊόντα της γλυκόλυσης.

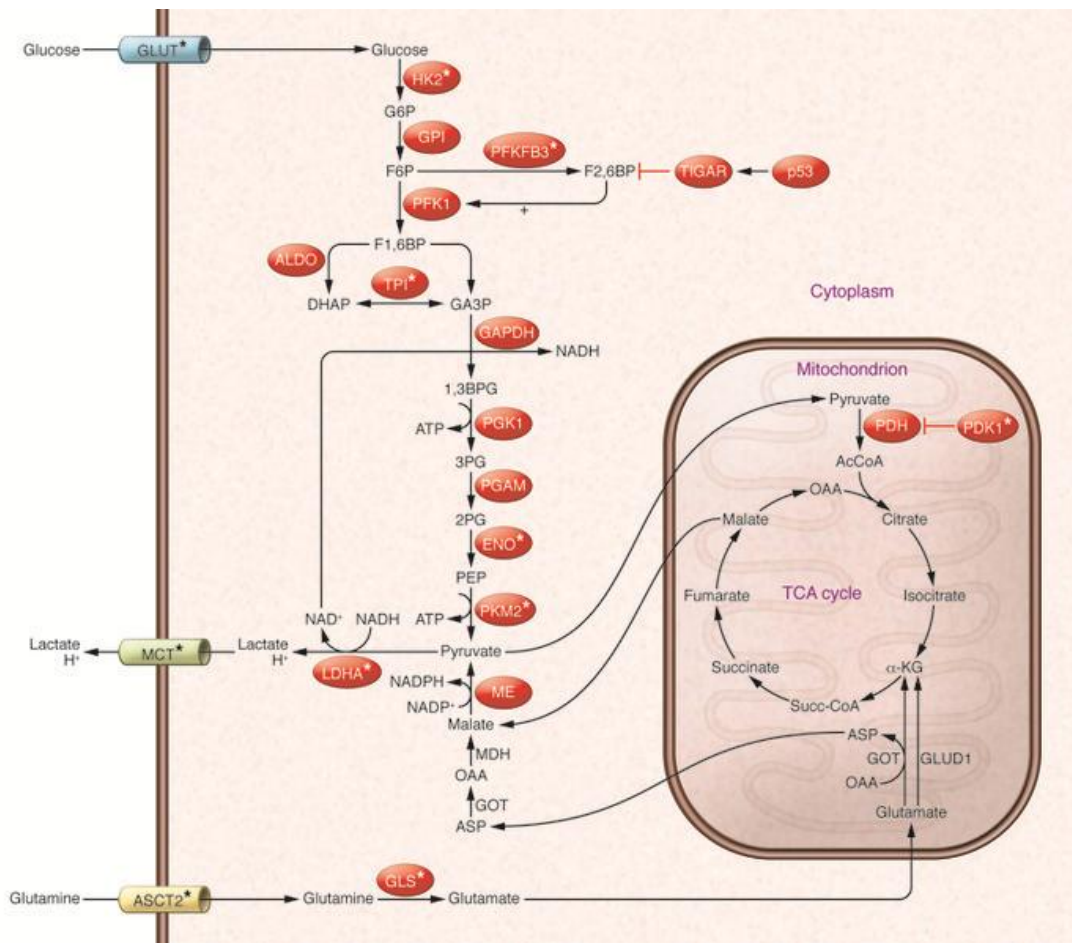
Όλο και περισσότερα στοιχεία μαζεύονται όσον αφορά την αντικαρκινική δράση παραγόντων οι οποίοι επιτελούν οποιοδήποτε από τους πιο πάνω στόχους. Υπάρχουν ήδη αρκετές μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν την in vivo αντι-καρκινική δράση πολλών αντι-οξειδωτικών φαρμάκων όπως είναι η N-ακετυλο κυστεΐνη, η βιταμίνη C και άλλων²²¹. Ακόμα έχουμε αναφέρει ότι τα καρκινικά κύτταρα προάγουν το οξειδωτικό στρες στους CAFs μέσω της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου και ότι η διεργασία αυτή καταστέλλεται με την προσθήκη σε συν-καλλιέργεια CAFs/καρκινικών κυττάρων καταλάσης η οποία απενεργοποιεί αυτή την ενεργή μορφή οξυγόνου¹⁴⁵. Η πιο πάνω παρατήρηση θα μπορούσε να εξηγήσει τις ευεργετικές

επιπτώσεις που έχει η χορήγηση καταλάσης όσον αφορά την μείωση των υποτροπών και των μεταστάσεων σε πειραματόζωα²²²⁻²²⁵.

Το γαλακτικό οξύ όπως έχει αναλυθεί διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην παροχή της απαιτούμενης ενέργειας για τον πολλαπλασιασμό και την επέκταση των καρκινικών κυττάρων.

Η αύξηση της MCT4 στους ινοβλάστες, όπως αποδείξαμε και στη δική μας εργασία αυξάνει τη μεταφορά του γαλακτικού οξέως προς τα καρκινικά κύτταρα.

Η αερόβια γλυκόλυση και η γλουταμινόλυση στα κύτταρα παρουσιάζεται στην Εικόνα 18.



Εικόνα 18: Οι ογκοπρωτεΐνες προκαλούν τη μεταγραφή των γονιδίων εκείνων που προκαλούν τη γλυκόλυση και τη γλουταμινόλυση με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή γαλακτικού

οξέως. Η μη φυσιολογική ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μηχανισμού PI3K/AKT και οι ογκοπρωτεΐνες HIF-1α και MYC ρυθμίζουν την μεταγραφή των GLUT, HK2, TPI, ENO και LDHA καθώς επίσης και της MCT4 η οποία μεταφέρει το παραγόμενο γαλακτικό οξύ εκτός του κυττάρου. Ο HIF-1α προκαλεί τη μεταγραφή του PFKFB3, το οποίο με τη σειρά του ευνοεί την παραγωγή μιας αλλοστερικής μορφής του PFK1. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 προκαλεί την έκφραση του TIGAR, το οποίο αποφωσφορυλιώνει το F2,6BP, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση του PFK1 με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της γλυκόλυσης.

Στη μελέτη μας επικεντρωθήκαμε στη έκφραση της MCT4 και τη συσχέτιση της με την επέκταση της κακοήθειας όσον αφορά τον ορθοκολικό καρκίνο με ηπατικές μεταστάσεις. Απώτερος σκοπός από την εργασία μας είναι και η διασύνδεση των αποτελεσμάτων που έχουμε εξάγει με την δημιουργία νέων θεραπευτικών σχημάτων για τη βελτίωση της πρόγνωσης αυτών των ασθενών.

Η αναστολή των μεταφορέων των μονοκαρβοξυλασών (MCTs) αποτελεί ένα πολύπλοκο και πολυπαραγοντικό τομέα στην προσπάθεια ανεύρεσης νέων φαρμάκων κατά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και εξάπλωσης των καρκινικών κυττάρων. Μια υπόθεση αναφέρει ότι η αναστολή των MCTs θα έχει άμεση επίδραση στη μεταφορά των μονοκαρβοξυλασών και στο pH των κυττάρων. Έχει αποδειχθεί ότι η αναστολή της MCT1 προκαλεί μείωση του ενδοκυττάρου pH με τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Επειδή η MCT1 έχει αμφίδρομη δράση, η αναστολή της δράσης της προκαλεί ταυτόχρονα οξέωση και στον εξωκυττάριο χώρο. Αν και οι συνθήκες αυτές συνδέονται συνήθως με πιο επιθετικό φαινότυπο, η οξέωση επιτρέπει την πρόσληψη περισσότερου γαλακτικού οξέως και πιθανόν να αυξάνει τη δράση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων τα οποία δρουν καλύτερα σε όξινο περιβάλλον²⁴⁶.

Η δεύτερη υπόθεση σχετίζεται άμεσα με την παρούσα μελέτη και τον μεταβολικό συνεταιρισμό των καρκινικών κυττάρων με τους ινοβλάστες (CAFs) του στρώματος. Αναστέλλοντας τις MCTs άρα και την πρόσληψη του γαλακτικού οξέως, αίρεται το πλεονέκτημα που έχουν τα καρκινικά κύτταρα να τρέφονται με γαλακτικό οξύ σε συνθήκες υποξίας μακριά από τα τροφοφόρα αγγεία, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο κυτταρικός τους πολλαπλασιασμός και κατά συνέπεια η επέκταση του όγκου²⁴⁷.

Ο τρίτος μηχανισμός διαμέσου του οποίου μπορούμε να παρέμβουμε θεραπευτικά στις διεργασίες που επιτελούνται από τις MCTs είναι η καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου τους. Σε μια μελέτη η καταστολή του γονιδίου της MCT4 με τη χρήση siRNA αποδείχθηκε ότι μείωνε τη μετανάστευση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων σε καλλιέργειες MDA-MB-231 κυττάρων σε πολύ υψηλό ποσοστό το οποίο έφτανε το 85%. Σε μια άλλη μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε από τον Philip και συνεργάτες, αναδείχθηκε η ταυτόχρονη ανοσοκατακρήμνιση και εντοπισμός της MCT4 και της β1-ιντεγκρίνης στο άκρο της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων που μεταναστεύουν²⁴⁸. Τα στοιχεία αυτά σε συνδυασμό με την συνέκφραση της MCT4 με το CD147, πιθανολογούν τη συμμετοχή της MCT4 σε ένα μηχανισμό που εξαρτάται από την ιντεγκρίνη κατά τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα σχηματίζουν τοπικές συμφύσεις που τελικά οδηγούν στη μετανάστευση τους και τελικά στη δημιουργία μεταστατικών εστιών^{248,249}.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες οι οποίες επικεντρώθηκαν στην αναστολή της MCT1 και της MCT2 καθώς επίσης και στο αποτέλεσμα της αναστολής αυτής στην εξέλιξη της κακοήθειας. Σύμφωνα με μια μελέτη η αναστολή της MCT1 στο γλοιοβλάστωμα (GBM), είτε με γενετική τροποποίηση είτε με την χρήση ενός αναστολέα των MCTs όπως είναι ένα μικρό μόριο το οποίο ονομάζεται α-κυανο-4-υδροξυ-εστέρας (CHC) εμποδίζει τον κυτταρικό

πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, μειώνει την ικανότητα μετάστασης και αυξάνει την επιβίωση. Στους ξενιστές στους οποίους χορηγήθηκε ο CHC είχε παρατηρηθεί μείωση του ενδοκρανιακού δυναμικού ογκογένεσης²³⁷⁻²³⁸.

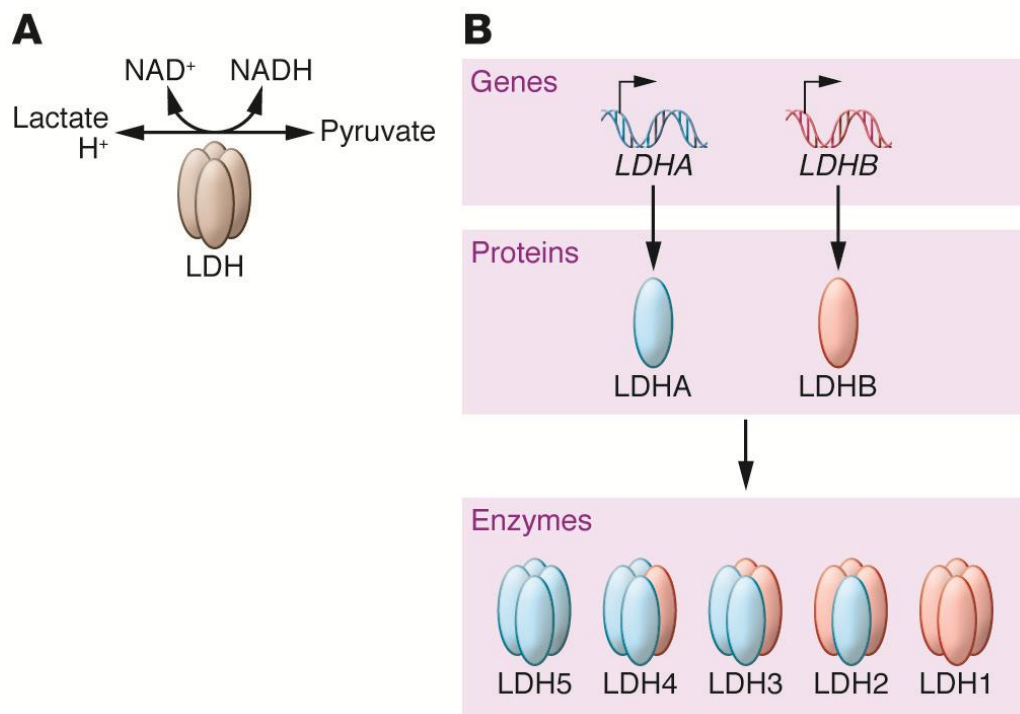
Επιπρόσθετα στοιχεία για την χρήση των αναστολέων των MCTs προήλθαν από μελέτες οι οποίες χρησιμοποίησαν ένα εκλεκτικό αναστολέα MCT1/MCT2, ο οποίος είχε αρχικά αναπτυχθεί από την AstraZeneca για την αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενεργοποιημένων T-κυττάρων (αναστολέας AR-C155858). Ο αναστολέας αυτός μείωνε τη ογκογενετική ικανότητα των τροποποιημένων Ras-ινοβλαστών άρα και τον πολλαπλασιασμό και επέκταση των καρκινικών κυττάρων. Στη συνέχεια αναπτύχθηκε ένας δεύτερης γενιάς αναστολέας MCT1/MCT2, ο οποίος ονομάστηκε AZD3965 και η χρήση του δοκιμάστηκε σε φάση I κλινικών μελετών για την αναστολή προχωρημένων συμπαγών όγκων και διάχυτου λεμφώματος από B-λεμφοκύτταρα. Αυτά τα φάρμακα απέτυχαν να εμποδίσουν τις τροποποιήσεις οι οποίες προκαλούνται από τα καρκινικά κύτταρα στους ινοβλάστες (CAFs) λόγω της επαγωγής από τον HIF-1a σε συνθήκες υποξίας της MCT4. Η αδυναμία των φαρμάκων αυτών να προσδεθούν και να αναστείλουν και την MCT4, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τη δημιουργία και επέκταση του καρκίνου, τα έκανε αναποτελεσματικά στη χρήση τους σε όγκους οι οποίοι εκφράζουν την MCT4. Από τις μελέτες αυτές διαφάνηκε η ανάγκη για δημιουργία και αναστολέων της MCT4²³⁹⁻²⁴¹.

Υπάρχουν κάποια μόρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για να αναστείλουν τις MCTs και τα οποία προκαλούν σε μελέτες που έγιναν και αναστολή της MCT4. Στη έρευνα τους οι Lim KS και συνεργάτες αφού πρώτα απέδειξαν ότι η υπερέκφραση της MCT4 στα γλοιοβλαστώματα συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση των ασθενών προχώρησαν σε in vitro αναστολή της MCT4. Αυτό έγινε με την επιμόλυνση κυτταρικών σειρών από γλοιοβλάστωμα με ιούς οι οποίοι

έκφραζαν shRNAs (short-hairpin RNAs) κατά της MCT4. Η αναστολή της MCT4 γινόταν σε ποσοστό 50-80% σε συνθήκες υποξίας και συνδέθηκε με αυξημένη απόπτωση και μειωμένη έκφραση του CD133 (stem cell marker). Επίσης η απώλεια έκφρασης της MCT4 σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος που εμφυτεύθηκαν *in vivo* σε ξενιστές συσχετίστηκε με μικρότερη ενδοκρανιακή ανάπτυξη του όγκου. Το εντυπωσιακό χαρακτηριστικό της μελέτης αυτής ήταν ότι παρά την απώλεια έκφρασης της MCT4 η οποία συμμετέχει ενεργά στη μεταφορά του γαλακτικού οξέως το ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο pH των κυττάρων δεν είχε διαφοροποιηθεί γεγονός που υπονοεί την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα κύτταρα αυτά με μηχανισμό ο οποίος δε σχετίζεται με τη μεταφορά του γαλακτικού οξέως. Για να εντοπίσουν το μηχανισμό αυτό χρησιμοποίησαν ανάλυση του DNA σε νευρώνες μιας ομάδας ελέγχου καθώς και σε νευρώνες στους οποίους είχε προστεθεί το shRNA (αναστολή έκφρασης της MCT4). Κατάφεραν να εντοπίσουν μια σημαντική μείωση στην έκφραση του Hypoxia-Inducible Factor (HIF) στα κύτταρα στα οποία δεν εκφραζόταν η MCT4²⁵⁰. Η εργασία αυτή απέδειξε τη σπουδαιότητα της MCT4 όσον αφορά τις κυτταρικές διεργασίες που καταλήγουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη αλλά ταυτόχρονα απέδειξε και την πολυπλοκότητα που υπάρχει για την εφαρμογή των αναστολέων της MCT4 ως θεραπευτικό μέσο.

Πέρα από την παρέμβαση στις κυτταρικές διεργασίες οι οποίες αφορούν τους μεταφορείς των μονοκαρβοξυλασών, στη βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες που προσπάθησαν να διακόψουν άλλα σημεία του κυτταρικού μεταβολισμού, στην προσπάθεια ανεύρεσης νέων θεραπευτικών σχημάτων τα οποία να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης και το μεταστατικό τους δυναμικό. Ο κυτταρικός μεταβολισμός με την πολυπλοκότητα του αποτελεί πρόσφορο πεδίο έρευνας στην προσπάθεια ανεύρεσης νέων φαρμάκων κατά της ανάπτυξης των διαφόρων μορφών κακοηθειών.

Η δεϋδρογενάση του γαλακτικού οξέως (LDH) καταλύει τη μετατροπή του γαλακτικού οξέως σε πυρουβικό οξύ και αντίστροφα. Υπάρχουν δύο ισομορφές της LDH, η LDHA και η LDHB. Αυξημένα επίπεδα της LDHA παρουσιάζονται σε μεγάλο αριθμό όγκων και συνδέονται σε κάποιες μορφές κακοήθειας με χειρότερη πρόγνωση. Η συσχέτιση της LDHB με τον καρκίνο είναι πιο περίπλοκη αλλά βρίσκεται και αυτή αυξημένη στον καρκίνο του πνεύμονα και των όρχεων. Η LDHB εκφράζεται σε όλους τους ιστούς περισσότερο όμως στις μυϊκές ίνες της καρδιάς ενώ η LDHA βρίσκεται κυρίως στους σκελετικούς μύες και σε γλυκολυτικά κύτταρα. Η εκλεκτική αναστολή της λειτουργίας της δράσης της LDHB in vivo σε μελέτες όπου καρκινικά κύτταρα μαστού είχαν εμφυτευθεί σε ποντίκια, προκάλούσε μείωση του συνολικού μεγέθους του όγκου²²⁷. Κατά τον ίδιο τρόπο η χρησιμοποίηση του FX11, ενός αναστολέα της LDHA προκάλούσε μείωση του μεγέθους των όγκων παγκρέατος και λεμφωμάτων σε ξενιστές²²⁷⁻²³¹.



Εικόνα 19: (A) Η LDH καταλύει τη μετατροπή του γαλακτικού οξέως σε πυρουβικού με ταυτόχρονη μετατροπή του NAD⁺ σε NADH (B) Οι ισομορφές της LDH

Table 1
LDH and MCT1/MCT2 inhibitors

Molecule	Target	K_i	Off target	Reference
AT-101 (gossypol)	LDHA	1.9 μ M	Inhibits NADH-dependent enzymes (e.g., GAPDH)	50, 51
	LDHB	1.4 μ M (NADH)		
FX-11	LDHA	0.05 μ M		37
	LDHB	20 μ M (NADH)		
Galloflavin	LDHA	5.4 μ M		55
	LDHB	15.6 μ M (pyruvate)		
N-hydroxyindole based	LDHA	5–10 μ M (NADH, pyruvate)		58
AZD3965	MCT1	2.3 nM	Lactate transport in muscle, brain, and liver	84
	MCT2	<10 nM		

The dissociation constant (K_i) for LDH is shown for pyruvate and/or NADH, as indicated.

Εικόνα 20: Ανατολεις των MCTs και της LDH

Συμπερασματικά φαίνεται ότι η παρέμβαση στους κυτταρικούς μηχανισμούς παραγωγής γαλακτικού οξέως σε οποιοδήποτε σημείο του μεταβολισμού του προκαλεί ευνοϊκά αποτελέσματα όσον αφορά τη μείωση της επέκτασης των διαφόρων μορφών κακοηθειών.

Η ουσία chloroquine αναστέλλοντας τη δράση των λυσοσωμάτων αναστέλλει την αυτοφαγία και πιθανολογείται ότι οι αντικαρκινικές τις ιδιότητες οφείλονται σε αυτή τη δράση της, δηλαδή στην αναστολή της αυτοφαγίας στους CAFs²⁵¹. Με ακριβώς αντίθετο μηχανισμό λειτουργίας διεγείροντας δηλαδή την αυτοφαγία οι αναστολεις του mTOR εμφανίζουν και αυτοί με τη σειρά τους αντικαρκινικές ιδιότητες με επικρατέστερη θεωρία για τη δράση τους την διέγερση της αυτοφαγίας στα καρκινικά κύτταρα²⁵².

Η μετορμίνη, ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο φάρμακο στο σακχαρώδη διαβήτη, κερδίζει όλο και περισσότερη προσοχή όσον αφορά τόσο την χημειοπροφύλαξη έναντι του καρκίνου όσο και τη πιθανή αντικαρκινική της δράση. Οι δράσεις αυτές της μετορμίνης θα μπορούσαν να αποδοθούν στην ικανότητα της να αναστέλλει τη δράση του συμπλέγματος I της αναπνευστικής αλυσίδας και ως συνέπεια την αναστολή με το μηχανισμό αυτό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Κάτι τέτοιο θα ήταν καταστροφικό για τα καρκινικά κύτταρα που όπως έχει αναπτυχθεί σε αυτή την ανασκόπηση εξαρτώνται άμεσα από την οξειδωτική φωσφορυλίωση για την παραγωγή της απαραίτητης για την επιβίωση τους ενέργειας^{253,254}.

Όλοι οι πιο πάνω φαρμακευτικοί παράγοντες και πολλοί άλλοι ακόμα που έχουν μελετηθεί ή βρίσκονται υπό μελέτη θα μπορούσαν πιθανότατα να αποτελέσουν την θεραπευτική λύση σε καρκινοπαθείς που αναπτύσσουν αντίσταση στη θεραπεία με παράγοντες που αναστέλλουν τη νεοαγγειογένεση. Θα μπορούσε ο μηχανισμός διαμέσου του οποίου αναπτύσσεται τέτοια αντίσταση να είναι η κάλυψη των μεταβολικών αναγκών των καρκινικών κυττάρων με τους μεταβολίτες με τους οποίους τους τροφοδοτούν οι CAFs. Όπως έχει αποδειχτεί τα καρκινικά κύτταρα είναι ικανά να διατηρούν τις κυτταρικές τους λειτουργίες σε σημεία τα οποία βρίσκονται σε σημαντική απόσταση από τα τροφοφόρα αγγεία, σε σημεία δηλαδή όπου επικρατούν συνθήκες υποξίας. Αυτό επιτυγχάνεται με την τροποποίηση των κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος τους ώστε να παράγουν γαλακτικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια προσλαμβάνουν για κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών. Κάτι τέτοιο θα σήμαινε ότι τα καρκινικά κύτταρα σταματούν να εξαρτώνται από τη νεοαγγειογένεση για την ανεύρεση των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη τους, δόγμα στο οποίο στηρίζεται σήμερα μεγάλος αριθμός χημειοθεραπευτικών σχημάτων. Αν όμως οι αναστολείς της νεοαγγειογένεσης συνδυάζονταν με κάποιο φαρμακευτικό παράγοντα ο οποίος θα σταματούσε

το μεταβολικό συνεταιρισμό CAFs/καρκινικών κυττάρων τότε τα καρκινικά κύτταρα πραγματικά δεν θα είχαν διέξοδο στην κάλυψη των μεταβολικών τους αναγκών. Στο σημείο αυτό τοποθετείται και η σπουδαιότητα της δικής μας εργασίας κατά την οποία αποδείχτηκε ο συσχετισμός των μεταφορέων της μονοκαρβοξυλάσης (MCTs) και ιδιαίτερα της MCT4 η οποία μεταφέρει το παραγόμενο από τους CAFs γαλακτικό οξύ εκτός του κυτταροπλάσματος προς τον εξωκυττάριο χώρο. Το γαλακτικό οξύ στη συνέχεια προσλαμβάνεται με τη βοήθεια άλλων μεταφορέων των μονοκαρβοξυλασών από τα καρκινικά κύτταρα τα οποία το χρησιμοποιούν στον κυτταρικό μεταβολισμό τους. Η διακοπή της αλληλουχίας αυτών των γεγονότων με κάποιο αναστολέα της MCT4 θα τερμάτιζε αυτή την αλληλουχία γεγονότων και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί συνεργικά με τα υπάρχοντα χημειοθεραπευτικά σχήματα.

Όπως και για την προγνωστική αξία των δεικτών που σχετίζονται με τις κυτταρικές διεργασίες «Reverse Warburg Effect» και «Stromal-Epithelial Metabolic Coupling» έτσι και για την αντικαρκινική αξία των φαρμακευτικών ουσιών που αναστέλλουν αυτές τις διεργασίες χρειάζεται ακόμη πολλή μελέτη.

5. Συμπεράσματα

Με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, αποδείχθηκε ότι η θεωρία του μεταβολικού συνεταιρισμού των ινοβλαστών (CAFs) με τα καρκινικά κύτταρα βρίσκει εφαρμογή στον καρκίνο του παχέος εντέρου με ηπατικές μεταστάσεις. Η υπερέκφραση της MCT4 στα κύτταρα του στρώματος και ειδικά στους ινοβλάστες οι οποίοι σχετίζονται με τον καρκίνο (CAFs) αποδεικνύει την παραγωγή σε μεγάλες ποσότητες στα κύτταρα αυτά γαλακτικού οξέως παρά τη φυσιολογική μερική τάση οξυγόνου. Οι αυξημένες ποσότητες της MCT4 όπως αποδείχτηκε με την ανοσοϊστοχημική χρώση, οφείλονται στην ανάγκη των CAFs να μεταφέρουν εκτός του κυτταροπλάσματος τους την περίσσεια του παραγόμενου γαλακτικού οξέως. Η εκτροπή αυτή του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού που επισυμβαίνει στους ινοβλάστες οφείλεται στο οξειδωτικό στρες που προκαλούν τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα σε αυτούς για να χρησιμοποιήσουν τα τελικά προϊόντα που παράγονται από την εκτροπή αυτή για κάλυψη των μεταβολικών τους αναγκών. Η «επιβολή» αυτή που προκαλούν τα καρκινικά κύτταρα στο μικροπεριβάλλον τους είναι καθοριστική για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους ακόμα και σε συνθήκες υποξίας, δηλαδή σε περιοχές που βρίσκονται μακριά από τα τροφοφόρα αγγεία του όγκου. Τα καρκινικά κύτταρα με το μηχανισμό αυτό δεν εξαρτώνται αποκλειστικά στη νεοαγγειογένεση που συμβαίνει εντός του όγκου για να καλύψουν τις ενεργειακές τους ανάγκες. Το τελικό αποτέλεσμα αυτών των κυτταρικών τροποποιήσεων είναι βεβαίως επιβαρυντικό για τον ίδιο τον ασθενή με καρκίνο του παχέος εντέρου και ηπατικές μεταστάσεις.

Οι δυσμενείς δράσεις της MCT4 δεν περιορίζονται μόνο στη μεταφορά του γαλακτικού οξέως από τους CAFs προς τα καρκινικά κύτταρα αλλά συμμετέχει και με άλλους μηχανισμούς στην αντιαποπτωτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων καθώς και στην ικανότητα τους για

μετάσταση. Επίσης φαίνεται ότι προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από τα χημειοθεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται σήμερα.

Η αυξημένη έκφραση της MCT4 στους CAFs συνδέθηκε με μειωμένη συνολική επιβίωση και μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου στους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και ηπατικές μεταστάσεις. Τα στοιχεία αυτά συνδέουν το θεωρητικό υπόβαθρο και τα ερωτήματα που έθεσε η ερευνητική αυτή πρόταση με την κλινική πράξη. Πράγματι η MCT4 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης για τον καρκίνο του παχέος εντέρου με ηπατικές μεταστάσεις. Τα αυξημένα επίπεδα της δηλώνουν και χειρότερη πρόγνωση για τους ασθενείς αυτούς και άρα την ανάγκη για τη θεραπευτική ομάδα που είναι υπεύθυνη για τους ασθενείς αυτούς να τροποποιήσει την παρεχόμενη αγωγή.

Τέλος τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης τονίζουν την αναγκαιότητα για δημιουργία εκλεκτικών αναστολέων της MCT4 και τη χρησιμοποίησή τους στην κλινική πράξη. Οι αναστολείς αυτοί θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στους ασθενείς οι οποίοι προηγουμένως έχουν προγνωστικοποιηθεί δυσμενώς με βάση τα επίπεδα έκφρασης της MCT4, ως συμπληρωματική θεραπεία, η οποία σε συνδυασμό με τα υπάρχοντα χημειοθεραπευτικά σχήματα θα μπορούσε να λειτουργήσει ευεργετικά για τους ασθενείς.

Τα *in vitro* και *in vivo* αποτελέσματα που έχουν μέχρι σήμερα παρουσιαστεί, τονίζουν την μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων, όταν προστεθεί στην παρεχόμενη χημειοθεραπεία αναστολέας της MCT4.

Βιβλιογραφία

1. Drake Richard L., Vogl Wayne, Mitchell Adam W. M, (2006), *Gray's Anatomy, I & II, Second Edition*, BROKEN HILL PUBLISHERS, ISBN 9789603994732
2. Marie T. O'Toole (2009), *Mosby's Medical Dictionary, 8th edition*, Elsevier. ISBN 9780323052900
3. Hansen J.T. , Lambert D.R (2011), *Ανατομία του Netter, Βασική Κλινική Ανατομία Τόμος I*, Εκδόσεις Πασχαλίδη, ISBN 9789604890590
4. Bruce M. K. and Bruce A. S, (2004) *Berne & Levy, Physiology, Sixth Edition*, Elsevier, ISBN 9780323073622
5. Κωστάκης Α. (2005), *Σύγχρονη Χειρουργική, Διάγνωστική και Θεραπευτική*, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη, ISBN: 960-399-249-6
6. Doherty Gerard M., Way Lawrence W., Κωστάκης Αλκιβιάδης Ι., Μπράμης Ιωάννης, (2008), *Σύγχρονη Χειρουργική, Διάγνωση και Θεραπεία*, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη, ISBN: 960-399-546-0
7. Keith Moore (2013). *Κλινική Ανατομία*. Broken Hill - Π.Χ. Πασχαλίδης, σελ. 290-297, 419-420. ISBN 9789963716074.
8. Parfrey PS, Dicks E, Parfrey O, McNicholas PJ, Noseworthy H, Woods MO, Negriin C, Green J. Evaluation of a Population Based Approach to Familial Colorectal Cancer. *Clin Genet*. 2016 Oct 3. PMID:27696385
9. Fatima A. Hagggar, Robin P. Boushey, Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors, *Clin Colon Rectal Surg*. 2009 Nov; 22(4): 191–197.

10. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC: American Institute for Cancer Research; 2007
11. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D M. GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2004
12. Labianca R, Beretta G D, Mosconi S, Milesi L, Pessi M A. Colorectal cancer: screening. *Ann Oncol.* 2005;16(Suppl 2):ii127–ii132.
13. John D. Potter, David Hunter (2009), *Genetics of colorectal cancer*, Chapter 1, pages 5-25, Springer, ISBN: 978-0-387-09567-7
14. Brenner, H., Hoffmeister, M., Brenner, G., et al. Expected reduction of colorectal cancer incidence within 8 years after introduction of the German screening colonoscopy programme: estimates based on 1,875,708 screening colonoscopies. *European Journal of Cancer* 2009, 45: 2027-2033
15. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F.: GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [online]. International Agency for Research on Cancer, Lyon (France) 2013. Available from www: <http://globocan.iarc.fr>
16. Harland Austin, S. Jane Henley, Jessica King, Lisa C. Richardson, Christie Ehemann, Changes in colorectal cancer incidence rates in young and older adults in the United States: what does it tell us about screening, *Cancer Causes & Control*, February 2014, Volume 25, Issue 2, pp 191–201

17. Patrice J. Morin, Kenneth W. Kinzler and Andrew B. Sparks, β -Catenin Mutations: Insights into the APC Pathway and the Power of Genetics, *Cancer Research*, October 2016 Volume 76, Issue 19
18. Douglas A. Corley, Christopher D. Jensen, Amy R. Marks, et al., Adenoma Detection Rate and Risk of Colorectal Cancer and Death, *N Engl J Med* 2014; 370:1298-1306, April 3, 2014, DOI: 10.1056/NEJMoa1309086
19. Dulai PS, Sandborn WJ, Gupta S, Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease: a review of disease epidemiology, pathophysiology, and management, *Cancer Prev Res (Phila)*. 2016 Sep 27. PMID: 27679553
20. Marc J. Gunter, Michael F. Leitzmann, Obesity and colorectal cancer: epidemiology, mechanisms and candidate genes, *The Journal of Nutritional Biochemistry* Volume 17, Issue 3, March 2006, Pages 145–156
21. Wang N, Khankari NK, Cai H, Li HL, Yang G, Gao YT, Xiang YB, Shu XO, Zheng W, Pre-diagnosis Body Mass Index and Waist-Hip Circumference Ratio in Association with Colorectal Cancer Survival. *Int J Cancer*. 2016 Oct 5. doi: 10.1002/ijc.30459 PMID:27706816
22. Katherine T Mills, Charles F Bellows, Aaron E Hoffman, et al., “Diabetes and colorectal cancer prognosis: a meta-analysis”, *Dis Colon Rectum*. 2013 Nov; 56(11): 1304–1319. , doi: 10.1097/DCR.0b013e3182a479f9
23. Marije Oostindjer, Gro V. Amdam, Jan Alexander, et al : The role of red and processed meat in colorectal cancer development: a perspective, *Meat Science*, Volume 97, Issue 4, August 2014, Pages 583–596

24. E. Van Cutsem, A. Cervantes, B. Nordlinger ,D. Arnold Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, Annals of Oncology Advance Access published September 4, 2014
25. Nanji S, Tsang ME, Wei X, Booth CM Outcomes after repeat hepatic resection for recurrent metastatic colorectal cancer: a population-based study, Am J Surg. 2016 Sep 6. pii: S0002-9610(16)30512-8.
26. Forgacz K, Agrawal AK, Sawicki T, Marek GW. Second-Line Chemotherapy of Advanced Colorectal Cancer: Predictive and Prognostic Factors Adv Clin Exp Med. 2016 Jul-Aug;25(4):725-32. doi: 10.17219/acem/59959.
27. Park JW, Lim SB, Kim DY, et. al, Carcinoembryonic antigen as a predictor of pathologic response and a prognostic factor in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy and surgery. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009 Jul 1;74(3):810-7. Epub 2008 Dec 26. PMID: 19101093
28. Bondi J, Pretorius M, Bukho Im I, et al, Large scale genomic instability in colon adenocarcinomas and correlation with patient outcome. APMIS 2009, Oct ;117(10):730-6. PMID: 19775341
29. Loriot Y, Mordant P, Deutsch E, Olausson KA, Soria JC, Are RAS mutations predictive markers of resistance to standard chemotherapy? Nat Rev Clin Oncol. 2009 Sep;6(9):528-34. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.106. Epub 2009 Jul 14.
30. Corman ML(2005) : *Carcinoma of the Colon. Colon & Rectal Surgery*, 5th edition, chapter 22, p. 767-804
31. Rice M (2006): *What's coming up in Colorectal Cancer ?* Cancer World, 10 : 19-21.

32. Wong JH, Severino R, Honnebier MB, Tom P, Namiki TS. Number of nodes examined and staging accuracy in colorectal carcinoma. *J Clin Oncol*. 1999 Sep;17(9):2896-900
33. Joseph NE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Wang H, Mayer RJ, MacDonald JS, et al. Accuracy of determining nodal negativity in colorectal cancer on the basis of the number of nodes retrieved on resection. *Ann Surg Oncol*. 2003 Apr;10(3):213-8.
34. Scabini S, Ferrando V, Number of lymph nodes after neoadjuvant therapy for rectal cancer: How many are needed? *World J Gastrointest Surg*. 2012 Feb 27;4(2):32-5. doi: 10.4240/wjgs.v4.i2.32
35. Sun Jin Park, Kil Yeon Lee, Si Young Kim, Clinical Significance of Lymph Node Micrometastasis in Stage I and II Colon Cancer, *Cancer Res Treat*. 2008 Jun; 40(2): 75–80, PMID: PMC2697481
36. Andreas E. Bembenek, Robert Rosenberg, Elke Wagler, et al, Sentinel Lymph Node Biopsy in Colon Cancer: A Prospective Multicenter Trial, *Ann Surg*. 2007 Jun; 245(6): 858–863, doi: 10.1097/01.sla.0000250428.46656.7e, PMID: PMC1876954
37. Ron G. Landmann, Martin R. Weiser, Surgical Management of Locally Advanced and Locally Recurrent Colon Cancer, *Clin Colon Rectal Surg*. 2005 Aug; 18(3): 182–189, doi: 10.1055/s-2005-916279, PMID: PMC2780089
38. Jean-Nicolas Vauthey; Choti, Michael A; Helton, W Scott. AHPBA/SSO/SSAT Consensus Conference on Hepatic Colorectal Metastases: Rationale and Overview of the Conference, *Annals of Surgical Oncology* 13.10 (Oct 2006): 1259-60.
39. Gallinger S, Biagi JJ, Fletcher GG, Nhan C, Ruo L, McLeod RS, Liver resection for colorectal cancer metastases. *Curr Oncol*. 2013 Jun;20(3):e255-65. doi: 10.3747/co.20.1341

40. George A Poultsides, Richard D Schulick, Timothy M Pawlik, Hepatic resection for colorectal metastases: the impact of surgical margin status on outcome, *HPB (Oxford)*. 2010 Feb; 12(1): 43–49. doi: 10.1111/j.1477-2574.2009.00121.x, PMID: PMC2814403
41. Bridget N. Fahy , Craig P. Fischer, Synchronous resection of colorectal primary and hepatic metastasis, *J Gastrointest Oncol*. 2012 Mar; 3(1): 48–58, doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2012.004, PMID: PMC3397641
42. Khurum Khan, Anita Wale, Gina Brown, Ian Chau, Colorectal cancer with liver metastases: Neoadjuvant chemotherapy, surgical resection first or palliation alone? *World J Gastroenterol*. 2014 Sep 21; 20(35): 12391–12406. Published online 2014 Sep 21. doi: 10.3748/wjg.v20.i35.12391, PMID: PMC4168073
43. Verwaal VJ, Bruin S, Boot H, van Slooten G, van Tinteren H. 8-year follow-up of randomized trial: cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2008;15:2426–2432.
44. de Cuba EM, Kwakman R, Knol DL, Bonjer HJ, Meijer GA, Te Velde EA. Cytoreductive surgery and HIPEC for peritoneal metastases combined with curative treatment of colorectal liver metastases: Systematic review of all literature and meta-analysis of observational studies. *Cancer Treat Rev*. 2013;39:321–327.
45. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Schlemmer A, Rehak P, Vieth M, Hoefler G, Langner C, Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer*. 2012 Feb 1;118(3):628-38. doi: 10.1002/cncr.26310. Epub 2011 Jul 12

46. Derwinger K, Kodeda K, Bexe-Lindskog E, Taflin H, Tumour differentiation grade is associated with TNM staging and the risk of node metastasis in colorectal cancer. *Acta Oncol.* 2010;49(1):57-62. doi: 10.3109/02841860903334411
47. Puerta-García E, Cañadas-Garre M, Calleja-Hernández MÁ, Molecular biomarkers in colorectal carcinoma. *Pharmacogenomics.* 2015;16 (10):1189-222. doi: 10.2217/ PGS.15.63. Epub 2015 Aug 3.
48. C. Richard Boland, Ajay Goel, Microsatellite Instability in Colorectal Cancer , *Gastroenterology.* 2010 Jun; 138(6): 2073–2087.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.064, PMID: PMC3037515
49. Kralovanszky J, Koves I, Orosz Z et al . Prognostic significance of the thymidylate biosynthetic enzymes in human colorectal tumors . *Oncology* 2002; 2:167-174
50. C Giessen, L Fischer von Weikersthal, R P Laubender, et al, Evaluation of prognostic factors in liver-limited metastatic colorectal cancer: a preplanned analysis of the FIRE-1 trial, *Br J Cancer.* 2013 Sep 17; 109(6): 1428–1436. Published online 2013 Aug 20. doi: 10.1038/bjc.2013.475, PMID: PMC3776986
51. Byam J, Reuter NP, Woodall CE, Scoggins CR, et al, Should hepatic metastatic colorectal cancer patients with extrahepatic disease undergo liver resection/ablation?, *Ann Surg Oncol.* 2009 Nov;16(11):3064-9. doi: 10.1245/s10434-009-0693-0
52. Carpizo DR, D'Angelica M, Liver resection for metastatic colorectal cancer in the presence of extrahepatic disease. *Lancet Oncol.* 2009 Aug;10(8):801-9. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70081-6.

53. Dominique Elias, Charles Honoré, Diane Goéré, et al, Hepatic Resection for Extrahepatic Metastatic Disease: When Is It Reasonable? *Current Colorectal Cancer Reports*, April 2015, Volume 11, Issue 2, pp 78–83
54. Alvaro Arjona-Sánchez, Francisco Javier Medina-Fernández, et al, Peritoneal metastases of colorectal origin treated by cytoreduction and HIPEC: An overview. *World J Gastrointest Oncol.* 2014 Oct 15; 6(10): 407–412. Published online 2014 Oct 15. doi: 10.4251/wjgo.v6.i10.407
55. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 2012;21:309–22. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022
56. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:392–401.
57. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
58. Ronnov-Jessen L, Bissell MJ. Breast cancer by proxy: can the microenvironment be both the cause and consequence? *Trends Mol Med* 2009; 15:5-13.
59. Orimo A and Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 5: 1597–1601, 2006..
60. Gabbiani, G., Ryan, G. B., & Majne, G. (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, 27(5), 549–550.
61. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., & Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(5), 349–363
62. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315: 1650–1659, 1986.

63. Komuro T, Hashimoto Y Three-dimensional structure of the rat intestinal wall (mucosa and submucosa). *Arch Histol Cytol.* 1990 Mar;53(1):1-21.
64. Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC. Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 Jul;289(1):G2-7.
65. Jiang H, Edgar BA. Intestinal stem cells in the adult *Drosophila* midgut. *Exp Cell Res.* 2011 Nov 15;317(19):2780-8. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.07.020. Epub 2011 Aug 11.
66. Upadhyay M, Samal J, Kandpal M, Singh OV, Vivekanandan P. The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacol Ther.* 2013 Mar;137(3):318-30. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.11.003. Epub 2012 Nov 16.
67. Hasebe, T., Tamura, N., Okada, N., Hojo, T., Akashi-Tanaka, S., Shimizu, C., et al. (2010). p53 expression in tumor-stromal fibroblasts is closely associated with the nodal metastasis and outcome of patients with invasive ductal carcinoma who received neoadjuvant therapy. *Human Pathology*, 41(2), 262–270.
68. Nakao, M., Ishii, G., Nagai, K., Kawase, A., Kenmotsu, H., KonNo, H., et al. (2009). Prognostic significance of carbonic anhydrase IX expression by cancer-associated
69. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science (New York, NY)* 123: 309–314, 1956.
70. Pasteur L. Experiments and novel views on the nature of fermentation. *Comp Rend Acad Sci* 89: 1260–1264, 1861
71. Nelson D., Cox M., (2011), *Lehninger Βασικές Αρχές Βιοχημείας*, Broken Hill Publishers, ISBN: 9789604892204
72. Devlin Thomas M (2009), *Βιοχημεία-Κλινικοί Συσχετισμοί*, Broken Hill Pubeshers, ISBN: 9603998259

73. Moreno-Sa'nchez R, Rodri'guez-Enri'quez S, Mari'n-Herna'ndez A, and Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 274: 1393–1418, 2007
74. Ozzello L. Ultrastructure of the human mammary gland. *Pathol Annu* 6: 1–59, 1971.
75. Di Chiro, G., DeLaPaz, R. L., Brooks, R. A., Sokoloff, L., Kornblith, P. L., Smith, B. H., Patronas, N. J., Kufta, C. V., Kessler, R. M., Johnston, G. S., Manning, R. G., & Wolf, A. P. (1982). Glucose utilization of cerebral gliomas measured by [18F] fluorodeoxyglucose and positron emission tomography. *Neurology* 32, 1323–1329.
76. Upadhyay M, Samal J, Kandpal M, Singh OV, Vivekanandan P. The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacol Ther.* 2013 Mar;137(3):318-30. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.11.003. Epub 2012 Nov 16.
77. Sakamoto, T., Niiya, D., & Seiki, M. (2011). Targeting the Warburg effect that arises in tumor cells expressing membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 286, 14691–14704.
78. Buller, C. L., Loberg, R. D., Fan, M. H., Zhu, Q., Park, J. L., Vesely, E., Inoki, K., Guan, K. L., & Brosius, F. C., III (2008). A GSK-3/TSC2/mTOR pathway regulates glucose uptake and GLUT1 glucose transporter expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C836–C843.
79. Duvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., Vander Heiden, M. G., MacKeigan, J. P., Finan, P. M., Clish, C. B., Murphy, L. O., & Manning, B. D. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell* 39, 171–183.
80. Ohh M. Ubiquitin pathway in VHL cancer syndrome. *Neoplasia* 2006; 8: 623–9
81. Gottlieb E, Tomlinson IP. Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 857–66

82. Pollard PJ, Briere JJ, Alam NA et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2231–9
83. Osthus RC, Shim H, Kim S et al. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* 2000; 275: 21797–800.
84. M. Hollstein, M. Hergenhahn, Q. Yang, H. Bartsch, Z.Q. Wang, P. Hainaut New approaches to understanding p53 gene tumor mutation spectra *Mutat. Res.*, 431 (1999), pp. 199–209
85. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*. 2006 Jul 14;126(1):107-20.
86. Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23, 537–548.
87. Schwartzberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* 2004; 64: 2627–33
88. Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 611–8.
89. Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM p53 regulates mitochondrial respiration. *Science*. 2006 Jun 16; 312(5780):1650-3.
90. Zhang, C., Lin, M., Wu, R., Wang, X., Yang, B., Levine, A. J., Hu, W., & Feng, Z. (2011). Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16259–16264.

91. Demetrius, L. A., Coy, J. F., & Tuszynski, J. A. (2010). Cancer proliferation and therapy: the Warburg effect and quantum metabolism. *Theor Biol Med Model* 7, 2
92. Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, Hiller K, Jewell CM, Johnson ZR, Irvine DJ, Guarente L, et al. 2012. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* 481: 380–384.
93. Wise DR, Ward PS, Shay JE, Cross JR, Gruber JJ, Sachdeva UM, Platt JM, Dematteo RG, Simon MC, Thompson CB. 2011. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc Natl Acad Sci* 108: 19611–19616
94. Pedersen, P. L. (2007). Warburg, me and Hexokinase 2: multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the “Warburg Effect”, i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J Bioenerg Biomembr* 39, 211–222.
95. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, A., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Publishers.
96. Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. New York: W.H Freeman & Co.
97. Coller HA, Grandori C, Tamayo P et al. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3260–5.
98. Jason M. Tennessen, Keith D. Baker, Geanette Lam, Janelle Evans, Carl S. Thummel
The *Drosophila* Estrogen-Related Receptor Directs a Metabolic Switch That Supports Developmental Growth Cell Metab. 2011 February 2; 13(2): 139–148.
doi: 10.1016/j.cmet.2011.01.005

99. Ariazi EA, Clark GM, Mertz JE Estrogen-related receptor alpha and estrogen-related receptor gamma associate with unfavorable and favorable biomarkers, respectively, in human breast cancer. *Cancer Res.* 2002 Nov 15; 62(22):6510-8.
100. Yu S, Wong YC, Wang XH, Ling MT, Ng CF, Chen S, Chan FL Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor-beta suppresses in vitro and in vivo growth of prostate cancer cells via p21(WAF1/CIP1) induction and as a potential therapeutic target in prostate cancer. *Oncogene.* 2008 May 22; 27(23):3313-28.
101. Ashford TP, Porter KR. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol* 1962;12: 198–202.
102. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000;290: 1717–21.
103. Kelekar A. Introduction to the review series Autophagy in Higher Eukaryotes—a matter of survival or death. *Autophagy* 2008;4:555–6.
104. Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 2010;12:814–22
105. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21: 2861–2873, 2007.
106. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, and Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451: 1069–1075, 2008.
107. Jung CH, Ro SH, Cao J, et al. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 2010;584:1287–95.
108. Meijer AJ, Codogno P. Signaling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol Aspects Med* 2006;27:411–25.

109. Neufeld TP. TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22:157–68..
110. Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 505–510, 2005
111. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Ge'linas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, and White E. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 10: 51–64, 2006.
112. Apel A, Zentgraf H, Bu'chler MW, et al. Autophagy—a double-edged sword in oncology. *Int J Cancer* 2009;125:991–5.
113. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:5308–16.
114. Roy S, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis. *Semin Immunopathol* 2010;32: 383–96
115. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 2007;21:1367–81
116. Shingu T, Fujiwara K, Bogler O, Akiyama Y, Moritake K, Shinojima N, Tamada Y, Yokoyama T, Kondo S. Inhibition of autophagy at a late stage enhances imatinib-induced cytotoxicity in human malignant glioma cells. *Int J Cancer* 2009;124:1060–71.
117. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 2004;6:1221–8.
118. Hippert MM, O'Toole PS, Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Res* 2006;66:9349–51

119. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, Thomas-Tikhonenko A, Thompson CB. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 2007;117:326–36.
120. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5510–5514.
121. Berra, E., Roux, D., Richard, D. E., and Pouyssegur, J. Hypoxia-inducible factor- α (HIF-1 α) escapes O₂-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. (2001)*EMBO Rep.*2, 615–620
122. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. (2001) *Science* 292, 468–472
123. Pan Y, Mansfield KD, Bertozzi CC, et al. Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 2007;27:912–25.
124. Semenza, G. L. HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: how animal **cells** signal hypoxia to the nucleus. (2001)*Cell* 107, 1–3
125. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 2006; 3:187-97.

126. Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, et al. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IκappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFκappaB activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:18154-9
127. Bonello S, Zahringer C, BelAiba RS, et al. Reactive oxygen species activate the HIF-1α promoter via a functional NFκappaB site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:755–61.
128. Jung Y, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Liu ZG, Neckers L. Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappaB activation. *Biochem J* 2003; 370:1011-7.
129. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. NFκappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1α. *Nature* 2008; 453:807-11.
130. Pantuck AJ, An J, Liu H, Rettig MB. NFκappaB-dependent plasticity of the epithelial to mesenchymal transition induced by Von Hippel-Lindau inactivation in renal cell carcinomas. *Cancer Res* 2010; 70:752-61.
131. An J, Rettig MB. Mechanism of von Hippel-Lindau protein-mediated suppression of nuclear factor kappa B activity. *Mol Cell Biol* 2005; 25:7546-56.
132. Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Lin Z, et al. Cytokine production and inflammation drive autophagy in the tumor microenvironment: role of stromal caveolin-1 as a key regulator. *Cell Cycle* 2011;10:1784–93
133. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006; 3:177-85.

134. Witkiewicz, A. K., Whitaker-Menezes, D., Dasgupta, A., Philp, N. J., Lin, Z., Gandara, R., Sneddon, S., Martinez-Outschoorn, U. E., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2012). Using the “reverse Warburg effect” to identify high-risk breast cancer patients: stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle* 11, 1108–1117.
135. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* 2009;29:2570–81.
136. Maiuri MC, Le TG, Criollo A, et al. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 2007;26: 2527–39.
137. Jung CH, Jun CB, Ro SH, et al. ULK-Atg13- FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 2009;20: 1992–2003.
138. Martinez-Outschoorn UE, Trimmer C, Lin Z, et al. Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival: role of hypoxia, HIF1 induction and NFkappaB activation in the tumor stromal microenvironment. *Cell Cycle* 2010;9:3515–33.
139. Perkins ND, Gilmore TD. Good cop, bad cop: the different faces of NFkappaB. *Cell Death Differ.*2006;13:759–772.
140. Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene.* 2006;25:6717–6730
141. Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, et al. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:18154-9
142. Martinez-Outschoorn UE, Balliet RM, Rivadeneira DB, Chiavarina B, Pavlides S, Wang C, et al. Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: A

new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells. *Cell Cycle* 2010; 9:3256-3276.

143. Pavlides S, Tsirigos A, Migneco G, et al. The autophagic tumor stroma model of cancer: role of oxidative stress and ketone production in fueling tumor cell metabolism. *Cell Cycle* 2010;9: 3485–505.

144. Sotgia F, Martinez-Outschoorn UE, Howell A, et al. Caveolin-1 and cancer metabolism in the tumor microenvironment: markers, models, and mechanisms. *Annu Rev Pathol* 2012;7:423–67.

145. Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, et al. The autophagic tumor stroma model of cancer or “battery-operated tumor growth”: a simple solution to the autophagy paradox. *Cell Cycle* 2010;9:4297–306

146. Bonello S, Zahringer C, BelAiba RS, et al. Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:755–61.

147. Jung Y, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Liu ZG, Neckers L. Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappaB activation. *Biochem J* 2003; 370:1011-7.

148. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. NFkappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 2008; 453:807-11.

149. Pantuck AJ, An J, Liu H, Rettig MB. NFkappaBdependent plasticity of the epithelial to esenchymal transition induced by Von Hippel-Lindau inactivation in renal cell carcinomas. *Cancer Res* 2010; 70:752-61.

150. An J, Rettig MB. Mechanism of von Hippel-Lindau protein-mediated suppression of nuclear factor kappa B activity. *Mol Cell Biol* 2005; 25:7546-56.
151. Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Lin Z, et al. Cytokine production and inflammation drive autophagy in the tumor microenvironment: role of stromal caveolin-1 as a key regulator. *Cell Cycle* 2011;10:1784–93
152. Lisanti MP, Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Pestell RG, Howell A, and Sotgia F. Hydrogen peroxide fuels aging, inflammation, cancer metabolism and metastasis: the seed and soil also needs “fertilizer.” *Cell Cycle* 10: 2440–2449, 2011.
153. Pavlides S, Tsirigos A, Migneco G, et al. The autophagic tumor stroma model of cancer: role of oxidative stress and ketone production in fueling tumor cell metabolism. *Cell Cycle* 2010;9: 3485–505.
154. Liu CJ, Tsai MM, Hung PS, Kao SY, Liu TY, Wu KJ, et al. miR-31 ablates expression of the HIF regulatory factor FIH to activate the HIF pathway in head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2010; 70:1635-44.
155. Garcia CK, Goldstein JL, Pathak RK, Anderson RG, Brown MS (Mar 1994). "Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle". *Cell*. **76** (5): 865–73. doi:10.1016/0092-8674(94)90361-1. PMID 8124722
156. Garcia CK, Li X, Luna J, Francke U (Sep 1994). "cDNA cloning of the human monocarboxylate transporter 1 and chromosomal localization of the SLC16A1 locus to 1p13.2-p12". *Genomics*. **23** (2): 500–3. doi:10.1006/geno.1994.1532. PMID 7835905
157. Mohammed S. Ullah, Andrew J. Davies, Andrew P. Halestrap, The Plasma Membrane Lactate Transporter MCT4, but Not MCT1, Is Up-regulated by Hypoxia through a HIF-1 α -

dependent Mdoi: 10.1074/jbc.M511397200 April 7, 2006 *The Journal of Biological Chemistry* 281, 9030-9037.

158. Vincent AS, Phan TT, Mukhopadhyay A, Lim HY, Halliwell B, Wong KP. Human skin keloid fibroblasts display bioenergetics of cancer cells. *J Invest Dermatol* 2008; 128:702-9.

159. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008; 452:230-3.

160. Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, Casimiro MC, Chenguang W, Fortina P, and Addya S. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell cycle* 8: 3984–4001, 2009.

161. Pavlides S, Tsirigos A, Vera I, Flomenberg N, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Howell A, Sotgia F, and Lisanti MP. Transcriptional evidence for the “Reverse Warburg Effect” in human breast cancer tumor stroma and metastasis: similarities with oxidative stress, inflammation, Alzheimer’s disease, and “Neuron-Glia Metabolic Coupling.” *Aging (Albany, NY)* 2: 185–199, 2010.

162. Bonuccelli G, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Pavlides S, Pestell RG, Fatatis A, Witkiewicz AK, Heiden MGV, Migneco G, Chiavarina B, Frank PG, Capozza F, Flomenberg N, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, and Lisanti MP. The reverse Warburg effect: glycolysis inhibitors prevent the tumor promoting effects of caveolin-1 deficient cancer associated fibroblasts. *Cell Cycle* 9: 1960–1971, 2010.

163. Sotgia F, Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Flomenberg N, Birbe RC, Witkiewicz AK, Howell A, Philp NJ, Pestell RG, Lisanti MP. Mitochondrial metabolism in

cancer metastasis: visualizing tumor cell mitochondria and the "reverse Warburgeffect" in positive lymph node tissue. *Cell Cycle*. 2012 Apr 1;11(7):1445-54. doi: 10.4161/cc.19841. Epub 2012 Apr 1.

164. Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Trimmer C, Flomenberg N, Wang C, Pavlides S, Pestell RG, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer cells metabolically "fertilize" the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect: implications for PET imaging of human tumors. *Cell Cycle*. 2011 Aug 1;10(15):2504-20. Epub 2011 Aug 1.

165. Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Ertel A, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Birbe RC, Howell A, Pavlides S, Gandara R, Pestell RG, Sotgia F, Philp NJ, and Lisanti MP. Evidence for a stromal-epithelial "lactate shuttle" in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle* 10: 1772– 1783, 2011.

166. Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, and Lisanti MP. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev* 84: 1341–1379, 2004.

167. Cohen AW, Razani B, Schubert W, Williams TM, Wang XB, Iyengar P, Brasaemle DL, Scherer PE, and Lisanti MP. Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 53: 1261–1270, 2004.

168. Cohen AW, Schubert W, Brasaemle DL, Scherer PE, and Lisanti MP. Caveolin-1 expression is essential for proper nonshivering thermogenesis in brown adipose tissue. *Diabetes* 54: 679–686, 2005

169. Brooks GA. Lactate: link between glycolytic and oxidative metabolism. *Sports Med*. 2007;37(4-5):341-3.

170. Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch.* 2004 Feb;447(5):619-28. Epub 2003 May 9.
171. Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Bröer S. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J.* 2000 Aug 15; 350 Pt 1():219-27.
172. Bergersen LH. Review. Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience.* 2007 Mar 2; 145(1):11-9.
173. Pellerin L and Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10625–10629, 1994.
174. Tsacopoulos M and Magistretti PJ. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16: 877–885, 1996.
175. Magistretti PJ. Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. *Am J Clin Nutr* 90: 875S–880S, 2009.
176. Magistretti PJ. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *Exp Physiol* 96: 407–410, 2011.
177. Magistretti PJ and Pellerin L. The contribution of astrocytes to the ¹⁸F-2-deoxyglucose signal in PET activation studies. *Mol Psychiatry* 1: 445–452, 1996.
178. Cirri P, Chiarugi P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2012 Jun;31(1-2):195-208. doi: 10.1007/s10555-011-9340-x

179. Pavlides S, Tsigirgos A, Vera I, Flomenberg N, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Howell A, Sotgia F, and Lisanti MP. Transcriptional evidence for the ‘‘Reverse Warburg Effect’’ in human breast cancer tumor stroma and metastasis: similarities with oxidative stress, inflammation, Alzheimer’s disease, and ‘‘Neuron-Glia Metabolic Coupling.’’ *Aging (Albany, NY)* 2: 185–199, 2010
180. Bonuccelli G, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Pavlides S, Pestell RG, Fatatis A, Witkiewicz AK, Heiden MGV, Migneco G, Chiavarina B, Frank PG, Capozza F, Flomenberg N, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, and Lisanti MP. The reverse Warburg effect: glycolysis inhibitors prevent the tumor promoting effects of caveolin-1 deficient cancer associated fibroblasts. *Cell Cycle* 9: 1960–1971, 2010.
181. Migneco G, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Castello- Cros R, Pavlides S, Pestell RG, Fatatis A, Flomenberg N, Tsigirgos A, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, and Lisanti MP. Glycolytic cancer associated fibroblasts promote breast cancer tumor growth, without a measurable increase in angiogenesis: evidence for stromalepithelial metabolic coupling. *Cell Cycle* 9: 2412–2422, 2010.
182. Wang X, Allen TD, May RJ, Lightfoot S, Houchen CW, Huycke MM *Enterococcus faecalis* induces aneuploidy and tetraploidy in colonic epithelial cells through a bystander effect. *Cancer Res.* 2008 Dec 1; 68(23):9909-17.
183. Heegaard NH, Harris CC. 2010. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 31:37–49
184. Hakem R. 2008. DNA-damage repair: the good, the bad, and the ugly. *EMBO J.* 27:589–605

185. Bae JY, Ahn SJ, Han W, Noh DY Peroxiredoxin I and II inhibit H₂O₂-induced cell death in MCF-7 cell lines. *J Cell Biochem.* 2007 Jul 1; 101(4):1038-45
186. Els L. van Persijn van Meerten, Hans Gelderblom, and Johan L. Bloem: RECIST revised: implications for the radiologist. A review article on the modified RECIST guideline *Eur Radiol.* 2010 Jun; 20(6): 1456–1467. Published online 2009 Dec 22. doi: 10.1007/s00330-009-1685-y, PMID: PMC2872013
187. Witkiewicz AK, Dasgupta A, Nguyen KH, Liu C, Kovatich AJ, Schwartz GF, Pestell RG, Sotgia F, Rui H, and Lisanti MP. Stromal caveolin-1 levels predict early DCIS progression to invasive breast cancer. *Cancer Biol Ther* 8: 1071–1079, 2009
188. Witkiewicz AK, Dasgupta A, Sotgia F, Mercier I, Pestell RG, Sabel M, Kleer CG, Brody JR, and Lisanti MP. An absence of stromal caveolin-1 expression predicts early tumor recurrence and poor clinical outcome in human breast cancers. *Am J Pathol* 174: 2023–2034, 2009
189. Witkiewicz AK, Dasgupta A, Sammons S, Er O, Potoczek MB, Guiles F, Sotgia F, Brody JR, Mitchell EP, and Lisanti MP. Loss of stromal caveolin-1 expression predicts poor clinical outcome in triple negative and basal-like breast cancers. *Cancer Biol Ther* 10: 135, 2010.
190. Sloan EK, Ciocca DR, Pouliot N, Natoli A, Restall C, Henderson MA, Fanelli MA, Cuello-Carrión FD, Gago FE, and Anderson RL. Stromal cell expression of caveolin-1 predicts outcome in breast cancer. *Am J Pathol* 174: 2035– 2043, 2009.
191. Koo JS, Park S, Kim SI, Lee S, and Park BW. The impact of caveolin protein expression in tumor stroma on prognosis of breast cancer. *Tumour Biol* 32: 787–799, 2011
192. Sloan EK, Ciocca DR, Pouliot N, Natoli A, Restall C, Henderson MA, Fanelli MA, Cuello-Carrión FD, Gago FE, and Anderson RL. Stromal cell expression of caveolin-1 predicts outcome in breast cancer. *Am J Pathol* 174: 2035– 2043, 2009.

193. Koo JS, Park S, Kim SI, Lee S, and Park BW. The impact of caveolin protein expression in tumor stroma on prognosis of breast cancer. *Tumour Biol* 32: 787–799, 2011
194. Qian N, Ueno T, Kawaguchi-Sakita N, Kawashima M, Yoshida N, Mikami Y, Wakasa T, Shintaku M, Tsuyuki S, Inamoto T, and Toi M. Prognostic significance of tumor/ stromal caveolin-1 expression in breast cancer patients. *Cancer Sci* 102: 1590–1596, 2011
195. El-Gendi SM, Mostafa MF, El-Gendi AM. Stromal caveolin-1 expression in breast carcinoma. Correlation with early tumor recurrence and clinical outcome. *Pathol Oncol Res.* 2012 Apr;18(2):459-69.
196. Di Vizio D, Morello M, Sotgia F, Pestell RG, Freeman MR, and Lisanti MP. An absence of stromal caveolin-1 is associated with advanced prostate cancer, metastatic disease and epithelial Akt activation. *Cell cycle (Georgetown, TX)* 8: 2420–2424, 2009.
197. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfor K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 2000; 60:916-21.
198. Schwickert G, Walenta S, Sundfor K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis. *Cancer Res* 1995; 55:4757-9.
199. Cheong, H., Lu, C., Lindsten, T., and Thompson, C.B.). Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat. Biotechnol* 2012, 30, 671–678.
200. 13. Bergersen LH. Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience* 2007; 145:11-9. 14. Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem* 2005; 94:1-14.

201. 15. Magistretti PJ. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol* 2006; 209:2304-11.
202. 16. Magistretti PJ. Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. *Am J Clin Nutr* 2009; 90:875-80
203. 17. Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1 is upregulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J Biol Chem* 2006; 281:9030-7
204. Rada B, Leto TL. "Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases". *Contributions to Microbiology (PDF)*. *Contributions to Microbiology* 2008 **15**: 164–87. doi:10.1159/000136357. ISBN 978-3-8055-8548-4. PMC: 2776633. PMID 18511861. — Review
205. Brooker RJ, *Genetics: analysis and principles* (4th ed.). McGraw-Hill Science. ISBN 978-0-07-352528-0, 2011.
206. 20. Gomes N, Vizcaíno JR, Pinheiro C, Baltazar F: Monocarboxylate transporters 2 and 4 are upregulated in prostate carcinoma. *Virchows Arch* 2009, 455(Supplement: Suppl. 1):233.
207. Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Ko YH, Goldberg AF, Flomenberg N, Wang C, et al. Understanding the metabolic basis of drug resistance: therapeutic induction of the Warburg effect kills cancer cells. *Cell Cycle* 2011; 10:2521-8; PMID:21768775; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.15.165>
208. Nelma Pértega-Gomes, José R Vizcaíno, Jan Attig, Sarah Jurmeister, Carlos Lopes, Fátima Baltazar A lactate shuttle system between tumour and stromal cells is associated with poor prognosis in prostate cancer *BMC Cancer*. 2014; 14: 352. Published online 2014 May 21. doi: 10.1186/1471-2407-14-352 PMID: PMC4039335

209. Baenke F, Dubuis S, Brault C, Weigelt B, Dankworth B, Griffiths B, Jiang M, Mackay A, Saunders B, Spencer-Dene B, Ros S, Stamp G, Reis-Filho JS, Howell M, Zamboni N, Schulze A, Functional screening identifies MCT4 as a key regulator of breast cancer cell metabolism and survival. *J Pathol*. 2015 Oct;237(2):152-65. doi: 10.1002/path.4562. Epub 2015 Jun 4.
210. Ji Yun Lee, InKyoung Lee, Won Jin Chang, et al, MCT4 as a potential therapeutic target for metastatic gastric cancer with peritoneal carcinomatosis, Oct 2015, *Oncotarget*, Vol. 7, No. 2
211. Pinheiro C¹, Longatto-Filho A, Ferreira L, et al, Increasing expression of monocarboxylate transporters 1 and 4 along progression to invasive cervical carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2008 Oct;27(4):568-74. doi: 10.1097/PGP.0b013e31817b5b40.
212. Sondenaa K, Quirke P, Hohenberger W, et al. The rationale behind complete mesocolic excision (CME) and a central vascular ligation for colon cancer in open and laparoscopic surgery : proceedings of a consensus conference. *Int J Colorectal Dis* 2014; 29(4):419-28.
213. Hagness M, Foss A, Line PD, et al. Liver transplantation for nonresectable liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg* 2013; 257(5):800-6
214. Chang GJ, Kaiser AM, Mills S, et al. Practice parameters for the management of colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2012; 55(8):831-43.
215. 12. Hohenberger W, Weber K, Matzel K, et al. Standardized surgery for colonic cancer: complete mesocolic excision and central ligation--technical notes and outcome. *Colorectal Dis* 2009; 11(4):354-64; discussion 364-5.
216. 13. Killeen S, Mannion M, Devaney A, et al. Complete mesocolic resection and extended lymphadenectomy for colon cancer: a systematic review. *Colorectal Dis* 2014; 16(8):577-94.
217. 14. Willaert W, Ceelen W. Extent of surgery in cancer of the colon: is more better? *World J Gastroenterol* 2015; 21(1):132-8.

218. Joseph M. Curry, Madalina Tuluc, Diana Whitaker-Menezes, et al, Cancer metabolism, stemness and tumor recurrence, MCT1 and MCT4 are functional biomarkers of metabolic symbiosis in head and neck cancer, *Cell Cycle* , Volume 12, 2013 - Issue 9
219. Pascale Fisel, Stephan Kruck, Stefan Winter, et al, DNA Methylation of the *SLC16A3* Promoter Regulates Expression of the Human Lactate Transporter MCT4 in Renal Cancer with Consequences for Clinical Outcome, *Clinical Cancer Research*, September 2013 Volume 19, Issue 18
220. Tineke W.H. Meijer, Olga C.J. Schuurbijs, Johannes H.A.M. Kaanders, et al, Differences in metabolism between adeno- and squamous cell non-small cell lung carcinomas: Spatial distribution and prognostic value of GLUT1 and MCT4, *Lung Cancer*, June 2012, Volume 76, Issue 3, Pages 316–323
221. Gao P, Zhang H, Dinavahi R, Li F, Xiang Y, Raman V, et al. HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. *Cancer Cell* 2007; 12:230-8.
222. Hyoudou K, Nishikawa M, Kobayashi Y, Umeyama Y, Yamashita F, and Hashida M. PEGylated catalase prevents metastatic tumor growth aggravated by tumor removal. *Free Radic Biol Med* 41: 1449–1458, 2006
223. Nishikawa M. Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Lett* 266: 53–59, 2008.
224. Nishikawa M and Hashida M. Inhibition of tumour metastasis by targeted delivery of antioxidant enzymes. *Expert Opin Drug Deliv* 3: 355–369, 2006.
225. Nishikawa M, Hashida M, and Takakura Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 319–326, 2009.

226. McClelland ML, et al. Lactate dehydrogenase B is required for the growth of KRAS-dependent lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 2013;19(4):773–784.
227. Rodriguez S, et al. Expression profile of genes from 12p in testicular germ cell tumors of adolescents and adults associated with i(12p) and amplification at 12p11.2-p12.1. *Oncogene.* 2003;22(12):1880–1891.
228. Leiblich A, et al. Lactate dehydrogenase-B is silenced by promoter hypermethylation in human prostate cancer. *Oncogene.* 2006;25(20):2953–2960.
229. Thangaraju M, Carswell KN, Prasad PD, Ganapathy V. Colon cancer cells maintain low levels of pyruvate to avoid cell death caused by inhibition of HDAC1/HDAC3. *Biochem J.* 2009;417(1):379–389.
230. Maekawa M, Taniguchi T, Ishikawa J, Sugimura H, Sugano K, Kanno T. Promoter hypermethylation in cancer silences LDHB, eliminating lactate dehydrogenase isoenzymes 1–4. *Clin Chem.* 2003;49(9):1518–1520.
231. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell.* 2006;9(6):425–434.
232. Le A, et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(5):2037–2042.
233. Xie H, et al. LDH-A inhibition, a therapeutic strategy for treatment of hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(3):626–635.
234. Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN, Halestrap AP. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J.* 2000;19(15):3896–3904.

235. Ovens MJ, Manoharan C, Wilson MC, Murray CM, Halestrap AP. The inhibition of monocarboxylate transporter 2 (MCT2) by AR-C155858 is modulated by the associated ancillary protein. *Biochem J.* 2010;431(2):217–225.
236. Gallagher SM, Castorino JJ, Wang D, Philp NJ. Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cancer Res.* 2007;67(9):4182–4189.
237. Mathupala SP, Parajuli P, Sloan AE. Silencing of monocarboxylate transporters via small interfering ribonucleic acid inhibits glycolysis and induces cell death in malignant glioma: an in vitro study. *Neurosurgery.* 2004;55(6):1410–1419.
238. Colen CB, Seraji-Bozorgzad N, Marples B, Galloway MP, Sloan AE, Mathupala SP. Metabolic remodeling of malignant gliomas for enhanced sensitization during radiotherapy: an in vitro study. *Neurosurgery.* 2006;59(6):1313–1323.
239. Murray CM, et al. Monocarboxylate transporter MCT1 is a target for immunosuppression. *Nat Chem Biol.* 2005;1(7):371–376.
240. Ovens MJ, Davies AJ, Wilson MC, Murray CM, Halestrap AP. AR-C155858 is a potent inhibitor of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 that binds to an intracellular site involving transmembrane helices 7-10. *Biochem J.* 2010;425(3):523–530.
241. Le Floch R, et al. CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(40):16663–16668.
242. Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 2004;447(5):619–628.

A thorough review on monocarboxylate transporters of the SLC16A family. [PubMed: 12739169]

243. Poortmans, JR. Principles of exercise biochemistry. 3. Karger Publishers; Basel, Switzerland: 2003.

244. Morris ME, Felmlee MA. Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters: characterization, function and role in the transport of the drug of abuse γ - hydroxybutyric acid. AAPS J 2008;10(2):311–321. [PubMed: 18523892]

245. Deora AA, Philp N, Hu J, Bok D, Rodriguez-Boulan E. Mechanisms regulating tissue-specific polarity of monocarboxylate transporters and their chaperone CD147 in kidney and retinal epithelia. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102(45):16245–16250.

246. Wang Q, Morris ME. The role of monocarboxylate transporter 2 and 4 in the transport of γ -hydroxybutyric acid in mammalian cells. Drug Metab Dispos 2007;35(8):1393–1399. [PubMed:17502341]

247. Sonveaux P, Vegran F, Schroeder T, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. J Clin Invest 2008;118(12):3930–3942. [PubMed: 19033663]

248. Gallagher SM, Castorino JJ, Wang D, Philp NJ. Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. Cancer Res 2007;67(9):4182–4189. [PubMed: 17483329]

249. Gallagher SM, Castorino JJ, Philp NJ. Interaction of monocarboxylate transporter 4 with β 1-integrin and its role in cell migration. Am J Physiol Cell Physiol 2009;296(3):C414–C421. [PubMed:19073896]

250. Lim KS, Lim KJ, Price AC, et al, Inhibition of monocarboxylate transporter-4 depletes stem-like glioblastoma cells and inhibits HIF transcriptional response in a lactate-independent

- manner. *Oncogene*. 2014 Aug 28;33(35):4433-41. doi: 10.1038/onc.2013.390. Epub 2013 Sep 30.
251. Hu C, Solomon VR, Ulibarri G, Lee H. The efficacy and selectivity of tumor cell killing by Akt inhibitors are substantially increased by chloroquine. *Bioorg Med Chem* 2008; 16:7888-93.
252. Ost A, Svensson K, Ruishalme I, Brannmark C, Franck N, Krook H, et al. Attenuated mTOR signaling and enhanced autophagy in adipocytes from obese patients with type 2 diabetes. *Mol Med* 2010; 16:235-46
253. Li D, Yeung SC, Hassan MM, Konopleva M, Abbruzzese JL (2009) Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 137:482–488
254. Decensi A, Puntoni M, Goodwin P, Cazzaniga M, Gennari A, Bonanni B, Gandini S. Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010 Nov;3(11):1451-61. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0157. Epub 2010 Oct 12.
255. Gervaz P, Rubbia-Brandt L, Andres A, et al. Neoadjuvant chemotherapy in patients with stage IV colorectal cancer: a comparison of histological response in liver metastases, primary tumors, and regional lymph nodes. *Ann Surg Oncol* 2010; 17(10):2714-9.
256. 69. de Jong MC, van Dam RM, Maas M, et al. The liver-first approach for synchronous colorectal liver metastasis: a 5-year single-centre experience. *HPB : The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 2011; 13(10):745-752.
257. YUKITO GOTANDA, YOSHITO AKAGI, AKIHIKO KAWAHARA, et al, Expression of Monocarboxylate Transporter (MCT)-4 in Colorectal Cancer and its Role: MCT4 Contributes

to the Growth of Colorectal Cancer with Vascular Endothelial Growth Factor , *Anticancer Research July 2013 vol. 33 no. 7 2941-2947*

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: Η δημοσίευση της έρευνας

Monocarboxylate transporter 4 as a prognostic biomarker in patients with colorectal cancer and liver metastases

[Christos Petrides](#), [Kyriakos Neofytou](#), [Georgios Agrogiannis](#), [Athanasios Petrou](#), [Anastasios Angelou](#), [Nikolaos Kavantzias](#), [Alexandros Papalambros](#), [Evangelos Felekouras](#), [Theodoros Liakakos](#), [Emmanouel Pikoulis](#)

Nicosia General Hospital, University Hospital, Rik Avenue 39, Apt 301, Aglantzia, Nicosia 2122, Cyprus

Open Access

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijso.2016.10.001>

Abstract

Objective

This study aims to validate the prognostic significance of the expression of Monocarboxylate Transporter 4 (MCT4) in patients with colorectal liver metastases (CRLM). This study investigated the correlation between MCT4 expression in stromal and tumor cells of colorectal liver metastases (CRLM) with disease-free (DFS) and overall survival (OS) in liver-only colorectal metastases treated with liver resection following neoadjuvant chemotherapy.

Methods

This is a retrospective study of 107 patients with colorectal liver metastases. MCT4 expression in both stromal and tumor cells was studied by immunohistochemistry. The staining was scored

semiquantitatively as weak or strong. DFS and OS were calculated using both Kaplan–Meier and multivariate Cox-regression methods

Results

Specimens from 57 patients (53.27%) showed weak levels of stromal MCT4 staining, whereas 50 patients (46.73%) showed strong levels of MCT4 staining. From the statistical analysis, strong stromal MCT4 expression was associated with decreased DFS (HR 1.79; 95% CI, 1.12–2.85; P=0.014) and OS (HR 3.81 95% CI, 1.88–7.72; P<0.001) in univariate analysis. This finding remained significant in multivariate analysis for both DFS and OS (HR 1.95; 95% CI, 1.19–3.17; P=0.007, and HR 4.38; 95% CI, 2.15–8.92; P<0.001 respectively). Tumeur MCT4 expression was not associated with DFS and OS. Five-years DFS and OS rates were 43% and 78% respectively in patients with weak and 15% and 37% respectively in patients with strong stromal MCT4 expression.

Conclusion

Our results indicated that strong expression of stromal MCT4 in CRLM was associated with poor prognosis in patients who undergo liver resection for liver-only colorectal metastases. This finding could be furthermore validated in independent studies and MCT4 could be used as a new biomarker in CRLM and creates the possibility of new studies in targeted therapies.

Keywords:

MCT4, CRLM, Colorectal cancer prognosis

1. Introduction

Globally, more than one million people are diagnosed with colorectal cancer every year resulting in about 715,000 deaths as of 2010 which is significantly higher compared to 490,000 deaths in 1990 [1]. Since 2012, it is the second most common cause of cancer in women (9.2% of diagnoses) and the third most common in men (10.0% of diagnoses) [2]. Its prevalence is higher in developed than developing countries. Current therapy is a combination of surgery and chemotherapy. Recent advances in chemotherapy have improved overall survival of patients with colorectal cancer, especially the subgroup with metastases, but overall survival still remains relatively low [3]. Patients with resectable colorectal cancer liver metastases have five-year overall survival of 35–58%. However, these patients have high recurrence rate and only about 15% will be disease free ten years after liver resection [4]. Identifying prognostic factors of recurrence could help better therapy planning. In addition, research for new therapies is evolving and elective molecules that could be targeted are a promising area of investigation [5].

To date, a number of prognostic factors such as grade (tumor differentiation), N-status, large bowel obstruction, operation, primary tumor resection, location, number and size of liver lesions, extrahepatic transfer, preoperative CEA level and chemotherapy have been evaluated [6].

Monocarboxylate transporter 4 (MCT4), also known as solute carrier family 16a member, is a membrane transporting protein that in humans are encoded by the SLC16A3 gene [7]. Northern and Western blotting and EST database analyses showed MCT4 to be widely expressed in glycolytic tissues such as white skeletal muscle fibers, astrocytes, white blood cells, chondrocytes, and some mammalian cell lines. Due to this selective expression, it has been identified that MCT4 serves lactate export from the cytoplasm, produced by glycolysis. The

MCT family counts 14 members and only MCT1-MCT4 catalyze the trans membrane proton-coupled transport of lactate [8].

The “reverse Warburg” effect is a two compartment model of cancer cells energy metabolism that was first thorough studied in humans as a concern to breast cancer. According to this model, glycolytic tumor stroma (cancer-associated fibroblasts, CAF's) transfers energy-rich nutrients, such as lactate, to tumor cells, which is the first step in initiating mitochondrial metabolism in these cancer cells [9].

Using the “reverse Warburg” effect, we considered that MCT4 could be a new biomarker for the clinical outcome of patients with colorectal cancer and liver metastases. MCT4 is the major membrane transporter responsible for L-Lactate efflux-export from glycolytic cells and as such is a biomarker of oxidative stress and aerobic glycolysis in the tumor stroma. As proved in breast cancer, MCT4 is overexpressed in stromal fibroblasts, and this overexpression is associated with poor overall survival [10].

We used immunochemistry to investigate the level of expression of MCT4 in the stroma that surrounds cancer cells of colorectal liver metastases. The level of MCT4 expression was then associated with the clinicopathological features of these patients.

2. Materials and methods

2.1. Patient selection and clinical information

We derived our data from two retrospectively surgical databases: 1st Department of Surgery, Laiko General Hospital, University of Athens, Greece and Nicosia General Hospital, University

Hospital, Cyprus. Patients who underwent liver resection between January 2001 and December 2012 for CRLM were identified. Eligible patients for the study were patients without extra-hepatic disease, who received neoadjuvant chemotherapy, had a complete tumor resection, did not deceased because of postoperative complications and finally had adequate tissue samples for the evaluation of MCT4 expression.

Exclusion of extra-hepatic disease was performed preoperatively as routine with chest, abdomen and pelvis computed tomography. Resectability was evaluated from an interdisciplinary board constituted by a surgical expert, an oncologist, and a radiologist. All resections were initiated with a curative intent.

All institutional electronic records were evaluated for each patient and data were collected regarding: a) standard demographics, b) primary colorectal tumor, c) CRLM characteristics, d) preoperative chemotherapy, e) response to preoperative chemotherapy, f) liver resection g) DFS and the OS.

2.2. Immunohistochemical staining

Immunohistochemical staining for MCT4 was performed on 3 μ m thick formalin-fixed paraffin sections, using a two-step technique after overnight heating at 37°C and subsequent deparaffinization in xylene and rehydration through graded alcohols. After the quenching of the endogenous peroxidase activity, using methanol hydrogen peroxide solution (0.3% in TBS for 30min) we proceeded to microwave-mediated antigen retrieval in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at pH 9.0 for 10min. Subsequently, sections were incubated overnight at 4°C with

the primary antibodies (MCT4, clone sc-50329, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA). A two-step technique (Quanto, Thermo – Fischer Scientific Inc., USA) was used. Diaminobenzidine was used as a chromogen. Finally, sections were counterstained with hematoxylin and mounted. As positive controls, we used placenta (MCT4) sections previously known to be highly immunoreactive for the studied markers. Negative controls had the primary antibody omitted and replaced by nonimmune normal serum from the same species as the primary antibody or TBS.

2.3. Immunohistochemical evaluation

The evaluation of the immunohistochemical staining was performed by a pathologist (G.A.) through light microscopic observation, who was unaware of the clinical data of each patient. The immunoexpression of MCT4 both membranous and cytoplasmic was localized to stromal fibroblasts, tumor cells, endothelial cells of blood vessels, adipocytes, and smooth muscle cells. MCT4, mainly membranous, showed more narrow expression in stromal fibroblasts, tumor cells, and inflammatory cells. Immunoreactivity for MCT4 was estimated in a semiquantitative manner by the evaluation of staining intensity (score 0: no staining, score 1: weak staining, score 2: moderate staining and score 3: strong staining) and the extent of positive tumor cells over the total number of tumor cells (score 0: no staining, score 1: <25% of tumor stained, score 2: 25–50% of tumor stained, score 3: 50–75% of tumor stained, score 4: >75% of tumor stained). For both stromal and tumor cells, a total (staining intensity plus staining extend) equal or less of 5 was categorized as weak expression, while a total higher than 5 was categorized as the strong expression.

2.4. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences software (SPSS), version 17.0. The primary and secondary endpoints of the study were DFS and OS respectively. DFS was calculated from the date of hepatectomy to the date of disease recurrence and was censored at the last follow-up or at the time of death if the patients remained tumor free at that time. OS was calculated from the time of hepatectomy to the date of cancer-related death and was censored at last follow-up or at the time of unrelated to cancer death. Chi-square test was used for calculating the association between patients' and tumor's categorical characteristics and stromal and tumor cells MCT4 expression. The impact of these features on DFS and OS was analyzed using the Kaplan–Meier method. Survival outcomes between groups were compared with the log-rank test. A P value of less than 0.05 was considered statistically significant. Factors that were associated with the DFS or the OS ($P > 0.1$) in univariate analysis were used for the performance of the multivariate Cox-regression analysis.

3. Results

A total of 107 patients were enrolled. The demographic characteristics of the patients and the characteristics of CRLM at diagnosis are shown in [Table 1](#). The stromal MCT4 expression was strong in 50 patients (46.7%). Immunohistochemistry staining is shown in [Image 1](#), [Image 2](#). As demonstrated in [Table 1](#), there was no statistically significant difference in patient's and CRLM's characteristics between patients with weak and strong stromal MCT4 expression. The median follow-up period was 39 months (2 to 102 months). During the follow-up period, 72 patients (67.3%) developed tumor recurrence and 38 (35.5%) patients died due to progressive disease.

Within the group of patients with strong stromal MCT4 expression of the recurrence rate was much higher, as 40 out of 50 (80%) patients developed tumor recurrence. The corresponding rate for the group of patients with weak stromal MCT4 expression was 56.1% (80% vs 56.1%, $P=0.009$). The cancer-related death occurred in 27 of 50 (54%) patients with strong stromal MCT4 expression and in 11 of 57 (19%) patients with weak stromal MCT4 expression ($P<0.001$). (Fig. 1)

Table 1 Relationships between baseline clinicopathologic characteristics and Stromal MCT4 expression.				
		Stromal MCT4 expression		P-value
Parameter	Total	Weak	Strong	
Age at operation				
≤ 65 yr	67(62.6%)	34(59.6%)	33(66%)	
>65 yr	40(37.4%)	23(40.4%)	17(34%)	0.551
Gender				
Female	42(39.3%)	22(38.6%)	20(40%)	
Male	65(60.7%)	35(61.4%)	30(60%)	0.999
No. of metastasis at diagnosis				
≤ 3	81(75.7%)	43(75.4%)	38(76%)	
>3	26(24.3%)	14(24.6%)	12(24%)	0.999
Distribution of lesions				
Unilobar	69(64.5%)	35(61.4%)	34(68%)	
Bilobar	38(35.5%)	22(38.6%)	16(32%)	0.546
Size of largest metastases				

≤ 5 cm	83(77.6%)	46(80.7%)	37(74%)	
>5 cm	24(22.4%)	11(19.3%)	13(26%)	0.473
Timing of metastasis				
Synchronous	75(70.1%)	39(68.4%)	36(72%)	
Metachronous	32(29.9%)	18(31.6%)	14(28%)	0.833
Type of neoadjuvant chemotherapy				
Oxaliplatin-based chemotherapy	68(63.6%)	39(68.4%)	29(58%)	
Irinotecan- based chemotherapy	38(35.5%)	18(31.6%)	20(40%)	
Unknown	1(0.9%)	0(0%)	1(2%)	0.417
Preoperative administration of bevacizumab				
No	64(59.8%)	35(61.4%)	29(58%)	
Yes	43(40.2%)	22(38.6%)	21(42%)	0.436
Response to neoadjuvant chemotherapy ^a				
Responders ^a	97(90.7%)	53(93%)	44(88%)	
Progression	10(9.3%)	4(7%)	6(12%)	0.377
No. of segments removed				
≤ 3	52(48.6%)	30(52.6%)	22(44%)	
>3	55(51.4%)	27(47.4%)	28(56%)	0.440
Primary tumor in situ at the time of hepatectomy				
No	88(82.2%)	47(82.5%)	41(82%)	
Yes ^b	19(17.8%)	10(17.5%)	9(18%)	0.999
Adjuvant chemotherapy				
Yes	80(74.8%)	43(75.4%)	37(74%)	
No	27(25.2%)	14(24.6%)	13(26%)	0.999
Tumeur MCT4 expression				
Weak	55(51.4%)	29(50.9%)	26(52%)	
Strong	51(47.7%)	27(47.3%)	24(48%)	
Unknown	1(0.9%)	1(1.8%)	0(0%)	0.999

aRadiologic complete response or radiologic partial response or stable disease (according to RECIST).

b15 patients underwent synchronous resection of primary tumor and CRLM and 4 patients were managed with the 'liver first' approach.

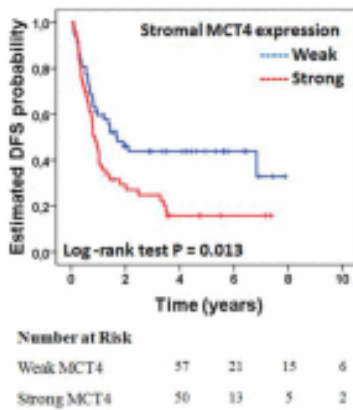


Fig. 1: Patients with strong stromal MCT4 expression had worse DFS than patients with weak stromal MCT4 expression.

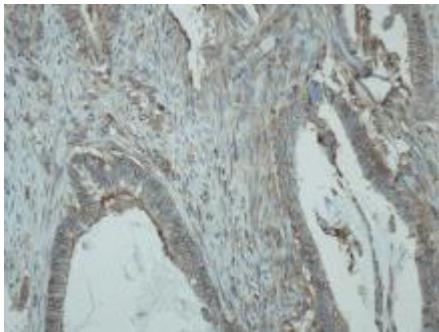


Image 1: Strong mct4 expression in cancer and in stromal cells.

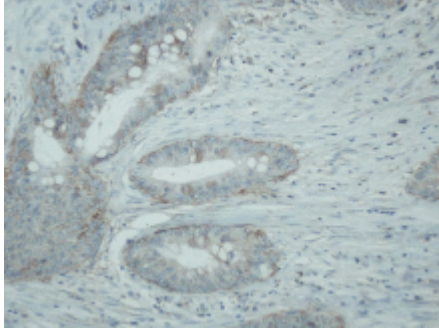


Image 2: Weak mct4 expression in cancer and in stromal cells.

Univariate analyses ([Table 2](#)) demonstrated that more than 3 liver metastases at diagnosis (HR 2.27; 95% CI, 1.36–3.80; $P=0.002$), bilobar distribution of lesions (HR 2.41; 95% CI, 1.47–3.94; $P<0.001$), disease progression during neoadjuvant chemotherapy according to RECIST criteria [11] (HR 3.84; 95% CI, 1.91–7.71; $P<0.001$), no adjuvant-post hepatectomy chemotherapy (HR 2.27; 95% CI, 1.34–3.84; $P=0.002$), and strong stromal MCT4 expression (HR 1.79; 95% CI, 1.12–2.85; $P=0.014$) were associated with a decreased DFS. Tumor cells MCT4 expression was not associated with DFS (HR 0.70; 95% CI, 0.43–1.12; $P=0.145$). Patients with strong stromal MCT4 expression had a median DFS of 10.5 months compared to a DFS of 20.4 months for the patients with weak stromal MCT4 expression. Three and 5-years DFS rates were 25% and 15% respectively in patients with strong stromal MCT4 expression and 43% and 35% respectively in patients with weak stromal MCT4 expression. Regarding OS, univariate analysis ([Table 2](#)) revealed that bilobar distribution of lesions (HR 2.87; 95% CI, 1.49–

5.54; P=0.002), no adjuvant-post hepatectomy chemotherapy (HR 3.04; 95% CI, 1.54–5.99; P=0.001), and strong stromal MCT4 expression (HR 3.81; 95% CI, 1.88–7.72; P<0.001) were associated with decreased OS (Fig.2). Tumor cells MCT4 expression was not associated with OS (HR 1.02; 95% CI, 0.53–1.95; P=0.946). Patients with strong stromal MCT4 expression had a median OS of 56 months, and median OS was not reached in patients with weak stromal MCT4 expression. Three and five years OS rates were 61% and 37% respectively in patients with strong stromal MCT4 expression and 89% and 78% respectively in patients with weak stromal MCT4 expression.

Table 2 Baseline clinicopathologic characteristics and their association with DFS and OS in univariate analysis and multivariate analysis.								
Parameter	DFS				OS			
	Univariate analysis		Multivariate analysis		Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR(95% CI)	P-value	HR(95% CI)	P-value	HR(95% CI)	P-value	HR(95% CI)	P-value
Age at operation								
≤ 65 yr	1(referent)				1(referent)		1(referent)	
>65 yr	0.89(0.52–1.46)	0.665			1.64(0.86–3.12)	0.130		
Gender								

Female	1(referent)				1(referent)			
Male	1.50(0.91– 2.47)	0.104			1.31(0.66– 2.61)	0.428		
No. of metastasis at diagnosis								
≤ 3	1(referent)		1(referent)		1(referent)			
>3	2.27(1.36– 3.80)	0.002	1.67(0.94– 2.96)	0.076	1.63(0.79– 3.37)	0.182		
Distribution of lesions								
Unilobar	1(referent)		1(referent)		1(referent)		1(referent)	
Bilobar	2.41(1.47– 3.94)	<0.001	2.05(1.15– 3.65)	0.015	2.87(1.49– 5.54)	0.002	2.59(1.23– 5.45)	0.012
Size of largest metastases								
≤ 5 cm	1(referent)				1(referent)			
>5 cm	1.18(0.67– 2.07)	0.550			1.37(0.64– 2.92)	0.407		
Timing of metastasis								
Synchronous	1(referent)				1(referent)			
Metachronous	0.70(0.41– 1.19)	0.191			0.77(0.38– 1.56)	0.473		
Type of neoadjuvant chemotherapy								
Oxaliplatin-based chemotherapy	1(referent)				1(referent)			
Irinotecan- based chemotherapy	1.48(0.92– 2.39)	0.102			1.27(0.64– 2.50)	0.485		
Preoperative administration of bevacizumab								
No	1(referent)		1(referent)		1(referent)			
Yes	1.59(0.99– 2.54)	0.052	1.57(0.96– 2.56)	0.073	1.12(0.58– 2.15)	0.727		
Response to neoadjuvant chemotherapy								
Responders ^a	1(referent)		1(referent)		1(referent)			

Progression	3.84(1.91– 7.71)	<0.001	3.60(1.62– 7.99)	0.002	2.14(0.82– 5.56)	0.118		
No. of segments removed								
≤ 3	1(referent)				1(referent)			
>3	1.40(0.87– 2.24)	0.155			1.23(0.65– 2.35)	0.514		
Primary tumor in situ at the time of hepatectomy								
No	1(referent)				1(referent)			
Yes ^b	1.59(0.89– 2.84)	0.117			1.16(0.51– 2.66)	0.712		
Adjuvant chemotherapy								
Yes	1(referent)		1(referent)		1(referent)		1(referent)	
No	2.27(1.34– 3.84)	0.002	1.47(0.79– 2.70)	0.217	3.04(1.54– 5.99)	0.001	2.10(0.98– 4.48)	0.055
Tumeur MCT4 expression								
Weak	1(referent)				1(referent)			
Strong	0.70(0.43– 1.12)	0.145			1.02(0.53– 1.95)	0.946		
Stromal MCT4 expression								
Weak	1(referent)		1(referent)		1(referent)		1(referent)	
Strong	1.79(1.12– 2.85)	0.014	1.95(1.19– 3.17)	0.007	3.81(1.88– 7.72)	<0.001	4.38(2.15– 8.92)	<0.001

Abbreviation: CI, confidence interval; DFS, disease free survival; HR, hazards ratio; OS, overall survival; PRS, post recurrence survival.

^aRadiologic complete response or radiologic partial response or stable disease (according to RECIST).

^b15 patients underwent synchronous resection of primary tumor and CRLM and 4 patients were managed with the ‘liver first’ approach.

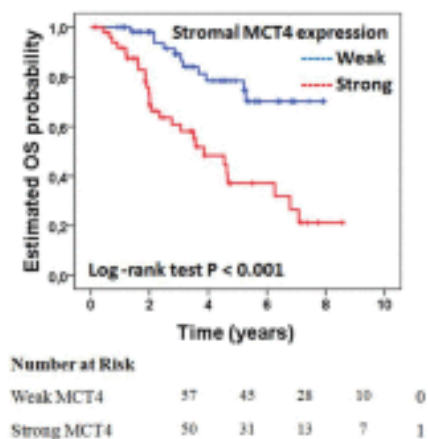


Fig.2: Patients with strong stromal MCT4 expression had worse OS than patients with weak stromal MCT4 expression.

Multivariate analysis for DFS was adjusted for a number of CRLM: distribution of CRLM, preoperatively administration of Bevacizumab, response to neoadjuvant chemotherapy, administration of adjuvant-post hepatectomy chemotherapy, and stromal MCT4 expression. For OS the multivariate analysis was adjusted for distribution of CRLM, administration of adjuvant-post hepatectomy chemotherapy, and stromal MCT4 expression. In multivariate analysis factors which remained statistically associated with DFS include bilobar distribution of lesions (HR 2.05; 95% CI, 1.15–3.65; P=0.015), progression during pre-operative chemotherapy (HR 3.60; 95% CI, 1.62–7.99; P=0.002), and strong stromal MCT4 expression (HR 1.95; 95% CI, 1.19–3.17; P=0.007) (See [Table 2](#)). Strong stromal MCT4 expression was the most significant factor associated with decreased OS on MVA (HR 4.38; 95% CI, 2.15 – 8.92, P<0.001), although

bilobal distribution of lesions (HR 2.59; 95% CI, 1.23–5.45; P=0.012) also remained statistically associated with overall survival in this analysis (see [Table 2](#)).

4. Discussion

It is now recognized that cancer cells display unique metabolic pathways that influence the biological behavior of the tumor and have prognostic and therapeutic consequences [12]. One of these types of metabolic adaption is the use of lactate for energy supply. A study of the literature suggests that MCT4 functions predominantly as a membrane transporter that removes lactate from a number of cells that use aerobic glycolysis for energy metabolism and have no functional mitochondria [13]. MCT4 is expressed at high levels in white skeletal muscle fibers, specifically in fast-twitch fibers (type 2 muscle fibers) and at lower levels in other tissues, such as testis, lung, and placenta, and in some cell types such as chondrocytes, leukocytes, and astrocytes [[14], [15]]. MCT4 expression is upregulated during hypoxia and is a well defined HIF1 target gene [[16], [17]]. After lactate is pushed out by MCT4, it is further taken by other MCT transporters in adjacent cells, such as slow-twitch fibers in muscle or neurons in the brain. To extract lactate from their micro-environment, slow-twitch muscle fibers use MCT1, while neurons use principally MCT2. MCT1 and MCT2 are similar in their structure and function [11]. This mechanism of nutrients exchange was named “neuroglia metabolic coupling” in the brain and “lactate shuttle” in skeletal muscle [16]. The reverse Warburg effect in human cancers cells was first proposed by Dr. Michael P. Lisanti and colleagues in 2009 after extensive research on breast cancer. According to this innovative model, aerobic glycolysis actually takes place in tumor-associated fibroblasts, and not in cancer cells themselves. Researchers called this new

observation “The Reverse Warburg Effect” to distinguish it from the conventional Warburg Effect, which was originally described to take place in tumor cells [[8](#)], [[9](#)], [[18](#)].

Tumor cells secrete hydrogen peroxide (H_2O_2) to induce oxidative stress (pseudohypoxia) which activates the production of reactive oxygen species (ROS). The effects of ROS on cell metabolism are well documented in a variety of studies [[19](#)]. These include not only participation in apoptosis but also a number of positive effects including the induction of host defense, mobilization of transporting systems and consequently control of cellular function. As an example, platelets involved in wound repair and blood homeostasis release ROS to recruit additional platelets to sites of injury [[20](#)], [[21](#)]. ROS increased production in stromal fibroblasts induces the activation of NF κ B and HIF1- α transcription factors. The final results of these cellular alterations are autophagy/mitophagy, inflammation and aerobic glycolysis. Through the same mechanism, oxidative stress increases the production of MCT4 [[18](#)].

The ‘stimulation’ of the stroma by the tumor cells also results in the production of nucleotides, fatty acids and amino acids, such as glutamine. These catabolites products stimulate mitochondrial biogenesis, oxidative phosphorylation (OXPHOS) and resistance in autophagy in epithelial cancer cells, protecting them against chemotherapy-induced apoptosis [[22](#)]. This succession of events has important consequences in tumor growth and inevitably in the clinical outcome of the patient. Aerobic glycolysis in cancer adjacent fibroblasts results in the production of high-energy metabolites (such as lactate and pyruvate), which can then be transferred with the aid of MCT4 and other MCT transporters to adjacent cancer cells undergoing oxidative mitochondrial metabolism for energy supply. The final outcome is the increased production of ATP in cancer cells, driving tumor growth and metastasis. In summary, this new paradigm states

that stromal fibroblasts are feeding cancer cells via the transfer of high-energy metabolites with the aid of a monocarboxylate transporter (MCT) [[23], [24]].

These new findings change what was believed for decades about cancer cell metabolism. Cancer cells themselves induce “The Reverse Warburg Effect” in their microenvironment by using oxidative stress to promote aerobic glycolysis, under conditions of normal oxygen supply. In our study, we investigated the compartment-specific expression of MCT4 in patients with CRLM and determined its potential association with overall clinical outcome. We proved that increased stromal MCT4 expression is associated with poor DFS and OS. In contrast, the expression of MCT4 in tumor cells had no correlation with the clinical outcome, thus had no prognostic value.

Our results are consistent with other studies which proved that increased lactic concentration in tumor cells correlate with poor clinical outcome. In addition, our results correlate with observations in breast, ovarian, prostate and head and neck cancer (HNSCC), where epithelial cancer cells have the ability to upregulate MCT4 expression in stromal cells at a distance, and high stromal MCT4 expression is associated with a poor prognosis [[25], [26], [27]].

As proved that MCT4 is a marker of oxidative stress and an overexpression in CRLM could be used in risk stratification and therapy planning. In addition to conventional chemotherapy, antioxidants or autophagy inhibitors could be considered to the group of patients with increased MCT4 expression [[28], [29]]. Development of MCT4 or other MCT transporters inhibitors should also be considered as an advanced step in cancer therapy.

Our results emphasize the importance of an evolving cancer microenvironment and suggest that therapy should target both neoplastic and stromal cells. The idea of targeting tumor

metabolism for cancer treatment has been extensively considered and is under investigation. Several trials targeted the results of Lonidamine and TLN232, which deplete hexokinase and pyruvate kinase respectively [30]. However, given the multiple downstream effects on tumor cell metabolism and the complicacy of these pathways, targeting any nutrient is challenging.

5. Conclusion

The elevated expression of MCT4 in cancer associated stroma provides a therapeutic window for disabling these transporters with small-molecule inhibitors. Additional research is needed to corroborate our results and following that MCT4 inhibitors could be added to current therapeutic protocols and evaluated in clinical practice. We believe that MCT4 inhibitors could be used as a new weapon in the treatment of colorectal cancer and liver metastases.

References

1. Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380: 2095–2128 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-023245604](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-023245604).
2. International Agency for Research on Cancer. World Cancer Report 2014. (World Health Organization)978-92-832-0432-9; 2014
3. Folprecht, G., Gruenberger, T., Bechstein, W., Raab, H.R., Weitz, J., Lordick, F. et al. Survival of patients with initially unresectable colorectal liver metastases treated with FOLFOX/cetuximab or FOLFIRI/cetuximab in a multidisciplinary concept (CELIM study). *Ann Oncol*. 2014; 25: 1018–1025 DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdu088> (Epub 2014 Feb 27)
4. Tomlinson, J.S., Jarnagin, W.R., DeMatteo, R.P., Fong, Y., Kornprat, P., Gonen, M. et al. Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 4575–4580
5. Rees, M., Tekkis, P.P., Welsh, F.K., O'Rourke, T., and John, T.G. Evaluation of long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: a multifactorial model of 929 patients. *Ann Surg*. 2008; 247: 125–135
6. Zhang, S., Gao, F., Luo, J., and Yang, J. Prognostic factors in survival of colorectal cancer patients with synchronous liver metastasis. *Colorectal Dis*. 2010; 12: 754–761 DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-1318.2009.01911.x>

7. Halestrap, A.P. and Price, N.T. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function, and regulation. *Biochem J.* 1999; 343: 281–299DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/0264-6021:343028110510291>. (PMC 1220552)
8. Bonen, A. The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. *Eur J Appl Physiol.* 2001; 86: 6–11
9. Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., Frank, P.G. et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle.* 2009; 8: 3984–4001DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/cc.8.23.1023819923890>.
10. Pavlides, S., Tsigirgos, A., Vera, I., Flomenberg, N., Frank, P.G., Casimiro, M.C. et al. Loss of stromal caveolin-1 leads to oxidative stress, mimics hypoxia and drives inflammation in the tumor microenvironment, conferring the “reverse Warburg effect”: a transcriptional informatics analysis with validation. *Cell Cycle.* 2009; 9: 2201–2219DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/cc.9.11.1184820519932>.
11. van Persijn van Meerten, E.L., Gelderblom, H., and Bloem, J.L. RECIST revised: implications for the radiologist. A review article on the modified RECIST guideline. *Eur Radiol.* 2010; 20: 1456–1467DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00330-009-1685-y> (Published online 2009 Dec 22; PMID: PMC2872013)
12. Cheong, H., Lu, C., Lindsten, T., and Thompson, C.B. Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat Biotechnol.* 2012; 30: 671–678
13. Bergersen, L.H. Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience.* 2007; 145: 11–19

14. Pierre, K. and Pellerin, L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation, and function. *J Neurochem.* 2005; 94: 1–14
15. Magistretti, P.J. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol.* 2006; 209: 2304–2311
16. Magistretti, P.J. Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. *Am J Clin Nutr.* 2009; 90: 875–880
17. Ullah, M.S., Davies, A.J., and Halestrap, A.P. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1 is upregulated by hypoxia through an HIF-1 α dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2006; 281: 9030–9037
18. Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Trimmer, C., Flomenberg, N., Wang, C., Pavlides, S. et al. Cancer cells metabolically “fertilize” the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect: implications for PET imaging of human tumors. *Cell Cycle.* 2011; 10: 2504–2520 <http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.15.16585.21778829>.
19. Rada, B. and Leto, T.L. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib Microbiol.* 2008; 15: 164–187 DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/00013635718511861>. (PMC: 2776633; Review)
20. Brooker, R.J. *Genetics: analysis and principles.* 4th ed. 978-0-07-352528-0 McGraw-Hill Science, ; 2011
21. Gomes, N., Vizcaíno, J.R., Pinheiro, C., and Baltazar, F. Monocarboxylate transporters 2 and 4 are upregulated in prostate carcinoma. *Virchows Arch.* 2009; 455: 233
22. Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Ko, Y.H., Goldberg, A.F., Flomenberg, N., Wang, C. et al. Understanding the metabolic basis of drug resistance: therapeutic induction of

- the Warburg effect kills cancer cells. *Cell Cycle*. 2011; 10: 2521–2528<http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.15.165.21768775>.
23. Martinez-Outschoorn, U.E., Balliet, R.M., Rivadeneira, D.B., Chiavarina, B., Pavlides, S., Wang, C. et al. Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: a new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells. *Cell Cycle*. 2010; 9: 3256–3276
24. Kalluri, R. and Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6: 392–401
25. Sloan, E.K., Ciocca, D.R., Pouliot, N., Natoli, A., Restall, C., Henderson, M.A. et al. Stromal cell expression of caveolin-1 predicts outcome in breast cancer. *Am J Pathol*. 2009; 174: 2035–2043
26. Brizel, D.M., Schroeder, T., Scher, R.L., Walenta, S., Clough, R.W., Dewhurst, M.W. et al. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001; 51: 349–353[http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3016\(01\)01630-3.11567808](http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3016(01)01630-3.11567808).
27. Mao, Y., Keller, E.T., Garfield, D.H., Shen, K., and Wang, J. Stromal cells in the tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metast Rev*. 2012; 32: 305–315
28. Curry, J.M., Tuluc, M., Whitaker-Menezes, D., Ames, J.A., Anantharaman, A., Butera, A. et al. Cancer metabolism, stemness and tumor recurrence. *Cell Cycle*. 2013; 12: 1371–1384DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/cc.24092>
29. Martinez-Outschoorn, U.E., Whitaker-Menezes, D., Pavlides, S., Chiavarina, B., Bonuccelli, G., Casey, T. et al. The autophagic tumor stroma model of cancer or “battery-operated tumor growth”: a simple solution to the autophagy paradox. *Cell Cycle*. 2010; 9: 4297–4306<http://dx.doi.org/10.4161/cc.9.21.13817.21051947>.

30. Tennant, D.A., Durán, R.V., and Gottlieb, E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10: 267–277