

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**



**Α΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗ ΝΟΣΟΛΟΓΙΑ**

**ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΛΑΪΚΟ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Π.Π. ΣΦΗΚΑΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

***«ΜΠΟΡΟΥΝ ΟΙ GLP-1 ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΟΥΝ ΩΣ  
ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ  
ΚΑΡΚΙΝΟΥ;»***

**ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ ΕΛΕΝΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΤΕΝΤΟΛΟΥΡΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ**

**ΑΘΗΝΑ 2021**

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**



**Α΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗ ΝΟΣΟΛΟΓΙΑ**

**ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΛΑΪΚΟ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Π.Π. ΣΦΗΚΑΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

***«ΜΠΟΡΟΥΝ ΟΙ GLP-1 ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΟΥΝ ΩΣ  
ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ  
ΚΑΡΚΙΝΟΥ;»***

**ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ ΕΛΕΝΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΤΕΝΤΟΛΟΥΡΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ**

**ΑΘΗΝΑ 2021**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

---

- 1)ΤΕΝΤΟΛΟΥΡΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ  
ΕΚΠΑ**
- 2)ΜΑΚΡΥΛΑΚΗΣ Κ., ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**
- 3)ΚΟΚΚΙΝΟΣ ΑΛ., ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο διευθυντή και καθηγητή μου κ.Ελευσινιώτη για την ώθηση και εμπιστοσύνη του να ασχοληθώ με το τολμηρό αυτό θέμα.

Από καρδιάς ευχαριστώ και τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Τεντολούρη για την έμπνευση που μου μετέδωσε μέσα από τα δύο αυτά χρόνια του μεταπτυχιακού και ακόμη περισσότερο για τον τρόπο που αγκάλιασε το θέμα της παρούσας εργασίας.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω βαθύ ευχαριστώ στην οικογένεια μου, την παλιά και την καινούρια, για την πίστη, την εμπιστοσύνη και τη στήριξη.

Τέλος, σημαντικό ρόλο στην διεκπεραίωση της εργασίας έπαιξε η επαφή με τους ασθενείς μου, οι ανάγκες των οποίων αποκτούν χαρακτήρα έμπνευσης για μένα!

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....                                        | 4  |
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....                                         | 5  |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....                                            | 9  |
| ABSTRACT.....                                            | 11 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ (ΗΚΚ).....          | 13 |
| 1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....                                   | 13 |
| 1.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ .....                            | 13 |
| 1.2.1 ΚΙΡΡΩΣΗ ΗΠΑΤΟΣ .....                               | 13 |
| 1.2.2 ΜΗ ΚΙΡΡΩΤΙΚΟ ΥΠΕΔΑΦΟΣ.....                         | 14 |
| 1.2.3 ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ .....        | 15 |
| 1.3 ΗΠΑΤΟΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ .....                             | 15 |
| 1.4 ΠΡΟΛΗΨΗ .....                                        | 17 |
| 1.4.1 ΠΡΟΛΗΨΗ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ..... | 17 |
| 1.4.2 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΛΗΨΗ.....                          | 18 |
| 1.4.3 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΡΟΠΟΥ ΖΩΗΣ .....                      | 19 |
| 1.5 ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ.....                                       | 19 |
| 1.5.1 ΥΠΕΡΗΧΟΣ.....                                      | 19 |
| 1.5.2 ΜΕΤΡΗΣΗ αFP .....                                  | 20 |
| 1.5.3 ΝΕΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....                               | 20 |
| 1.5.4 Η ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΗ ΚΙΡΡΩΤΙΚΩΝ.....   | 21 |
| 1.6 ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....                                        | 21 |
| 1.6.1 ΚΙΡΡΩΤΙΚΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ .....                          | 21 |
| 1.6.2 ΜΗ ΚΙΡΡΩΤΙΚΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ.....                        | 22 |
| 1.7 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ .....                                   | 23 |
| 1.8 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΗΚΚ .....                                   | 25 |
| 1.8.1 ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΙΑΣΗΣ.....                               | 25 |
| 1.8.2 ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ .....                         | 26 |
| 1.9 ΠΡΟΓΝΩΣΗ.....                                        | 27 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: GLP-1 ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ.....                         | 29 |
| 2.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ .....                              | 29 |
| 2.2 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ.....                            | 30 |
| 2.2.1 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΙΝΚΡΕΤΙΝΗΣ.....                      | 30 |
| 2.2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ, ΕΚΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ GLP-1.....          | 30 |

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ GLP-1 ΣΤΟ ΠΑΓΚΡΕΑΣ ΚΑΙ ΤΗ ΓΛΥΚΑΙΜΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ .....       | 32 |
| 2.3.1 ΕΚΚΡΙΣΗ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ .....                                        | 32 |
| 2.3.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ .....                                     | 33 |
| 2.3.3 ΕΚΚΡΙΣΗ ΓΛΥΚΑΓΟΝΗΣ .....                                        | 33 |
| 2.3.4. ΡΥΘΜΙΣΗ ΜΑΖΑΣ β-ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....                                 | 33 |
| 2.3.5 ΛΟΙΠΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗ ΓΛΥΚΑΙΜΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ .....                  | 33 |
| 2.4 GLP-1 ΑΝΑΛΟΓΑ.....                                                | 35 |
| 2.4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....                                        | 35 |
| 2.4.2 ΛΙΡΑΓΛΟΥΤΙΔΗ .....                                              | 36 |
| 2.5 ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ GLP-1.....                                  | 38 |
| 2.5.1 ΝΕΦΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ .....                                            | 38 |
| 2.5.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ NASH .....                                  | 39 |
| 2.5.3 ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΟΦΕΛΟΣ.....                                       | 39 |
| 2.5.4 ΑΠΩΛΕΙΑ ΒΑΡΟΥΣ .....                                            | 40 |
| 2.5.5 ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ.....                                             | 40 |
| 2.5.6 ΛΟΙΠΕΣ ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....                                 | 40 |
| 2.6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ GLP-1 .....                                  | 41 |
| 2.6.1 ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑ .....                                                | 41 |
| 2.6.2 ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ.....                                                  | 42 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ .....                   | 43 |
| 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....                                                    | 43 |
| 3.2 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ .....                        | 43 |
| 3.2.1 ΑΠΟΠΤΩΣΗ .....                                                  | 44 |
| 3.2.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ (SENESCENSE).....                             | 46 |
| 3.2.3 ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ.....                                                  | 47 |
| 3.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΝΕΚΡΩΣΗ Ή ΜΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ ..... | 48 |
| 3.3.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ .....                               | 48 |
| 3.4 ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ .....                                                | 50 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΟ ΗΚΚ .....                     | 52 |
| 4.1 HEPG2 κύτταρα .....                                               | 52 |
| 4.2 HCC-LM3 κύτταρα .....                                             | 53 |
| 4.3 Hepa 1-6.....                                                     | 53 |
| 4.4 HuH7.....                                                         | 54 |
| ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....                                                     | 55 |

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΚΟΠΟΣ.....                                                           | 55 |
| 5.1 ΕΝΑΥΣΜΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....                                              | 55 |
| 5.2 ΚΕΝΑ ΠΟΥ ΕΠΙΧΕΙΡΕΙΤΑΙ ΝΑ ΚΑΛΥΦΘΟΥΝ .....                                      | 56 |
| 5.3 ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....                                                         | 56 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΕΘΟΔΟΣ .....                                                         | 58 |
| 6.1 ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.....                                                  | 58 |
| 6.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΡΘΡΩΝ.....                                                           | 58 |
| 6.3 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ .....                                                       | 60 |
| 6.4 ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ 5 ΑΝΑΣΚΟΠΟΥΜΕΝΩΝ ΑΡΘΡΩΝ ΠΡΟΣ ΔΙΕΥΚΟΛΥΝΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΓΝΩΣΤΗ ..... | 60 |
| 6.5 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΟΜΟΙΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΣ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΕΡΓΑΣΙΩΝ .....                      | 61 |
| 6.6 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΡΘΡΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ.....                                     | 62 |
| 6.7 ΟΡΙΣΜΟΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ.....                                        | 64 |
| 6.8 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ .....                                              | 64 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....                                                     | 66 |
| 7.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ .....                                               | 66 |
| 7.2. ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....                                      | 67 |
| 7.3 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ GLP-1 ΑΝΑΛΟΓΟΥ.....                 | 68 |
| 7.4 ΟΓΚΟΛΥΣΗ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΝΕΚΡΩΣΗ .....                                              | 71 |
| 7.4.1 ΡΟΛΟΣ ΑΜΕΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΚΙΚΟΤΗΤΑΣ .....                                       | 71 |
| 7.4.2 ΡΟΛΟΣ ROS .....                                                             | 71 |
| 7.4.3 ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ IFN-γ .....                                                       | 71 |
| 7.4.4 ΡΟΛΟΣ NK ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....                                                     | 72 |
| 7.4.5 ΡΟΛΟΣ IL6/STAT3 .....                                                       | 73 |
| 7.5 ΑΠΟΠΤΩΣΗ .....                                                                | 74 |
| 7.6 ΓΗΡΑΝΣΗ (SENESCENCE).....                                                     | 75 |
| 7.7 ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ.....                                                                | 76 |
| 7.8 ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ .....                     | 77 |
| 7.9 ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ (REGROWTH).....                    | 79 |
| 7.10 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ.....                                                  | 80 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....                                                    | 82 |
| 8.1 ΚΥΡΙΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....                                                       | 82 |
| 8.1.1 ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....                                     | 82 |
| 8.1.2 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ .....                                              | 83 |

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| 8.1.3 ΟΓΚΟΛΥΣΗ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΝΕΚΡΩΣΗ .....                           | 84 |
| 8.1.4 ΑΠΟΠΤΩΣΗ .....                                             | 85 |
| 8.1.5 ΓΗΡΑΝΣΗ .....                                              | 86 |
| 8.1.6 ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ .....                                            | 86 |
| 8.1.7 ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ (REGROWTH)..... | 87 |
| 8.1.8 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ.....                                | 88 |
| 8.2 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗΣ .....        | 89 |
| 8.3 ΚΕΝΑ ΣΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....                                  | 90 |
| 8.4 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ.....                                     | 91 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....                                               | 92 |

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ:** Ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος (ΗΚΚ) είναι ο πέμπτος πιο συχνός καρκίνος και η τέταρτη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Η ευρεία χρήση των GLP-1 αγωνιστών, στη θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2) της στεατοηπατίτιδας (NASH) και της παχυσαρκίας που αποτελούν αναδυόμενους παράγοντες κινδύνου ΗΚΚ, οδήγησε στη συλλογή ενδείξεων περί πιθανής χημειοθεραπευτικής τους δράσης τον ΗΚΚ.

Σκοπός της παρούσας συστηματικής βιβλιογραφικής ανασκόπησης είναι να διερευνήσει την ύπαρξη πιθανής αντικαρκινικής επίδρασης των GLP-1 αγωνιστών στην εξέλιξη και τη μεταστατική συμπεριφορά του ΗΚΚ.

**ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ:** Διενεργήθηκε αναζήτηση σε διεθνείς βάσεις δεδομένων για την ανεύρεση άρθρων που εξέτασαν την επίδραση των GLP-1 αγωνιστών στο ΗΚΚ, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες PRISMA statement (Moher 2010). Βάσει κριτηρίων ένταξης και αποκλεισμού, συγκρεντρώθηκαν 5 εργασίες προς ανασκόπηση, περιλαμβάνουσες in vitro πειράματα σε κύτταρα ηπατώματος και in vivo σε ποντίκια.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Οι αγωνιστές GLP-1 ασκούν στατιστικά σημαντική αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ηπατώματος μέσω των μηχανισμών αυτοφαγίας, γήρανσης και ανοσολογικής νέκρωσης. Ακόμα, αναστέλλουν τη μετανάστευσή τους. Αμφιλεγόμενη είναι η δράση τους στην απόπτωση. Δρουν μέσω αναστολής και ενεργοποίησης σημαντικών μονοπατιών σηματοδότησης που συνδέονται με την ηπατοκαρκινογένεση, με σημαντικότερα αυτά των mTOR, TGF- $\beta$  και JNK.

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ :** Από την παρούσα ανασκόπηση φαίνεται οι GLP-1 αγωνιστές ασκούν χημειοθεραπευτική δράση στα κύτταρα ηπατώματος ανθρώπων ή ποντικών,

όταν αυτά επωάζονται σε κυτταροκαλλιέργειες, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευσή τους.

Για τη διευκρίνιση αυτών των ενδείξεων και άρα για την πιθανή τους χρήση σε χημειοθεραπευτικά στο ΗΚΚ, απαιτούνται καλά σχεδιασμένες μελέτες σε ανθρώπους.

**ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ** : ηπατοκυτταρικός καρκίνος, GLP-1 αγωνιστές, λιραγλουτίδη, αυτοφαγία, mTOR.

## **ABSTRACT**

**BACKGROUND-PURPOSE:** Hepatocellular carcinoma (HCC) ranks fifth as cause of cancer and fourth of cancer related death worldwide. Widespread use of GLP-1 agonists, for the treatment of diabetes mellitus type 2 (SD2), steatohepatitis and obesity which are emerging risk factors of HCC, has risen evidence for their potential beneficial use in treating HCC.

The purpose of this systematic review is to investigate whether GLP-1 agonists show anticancer effect on development and metastatic attitude of HCC.

**MATERIAL-METHOD:** Search was performed in global data bases for finding papers concerning the effect of GLP-1 agonists in treating HCC, according to the guide lines of PRISMA statement (Moher 2010). Based on inclusion and exclusion criteria, 5 papers were collected for systematic review, including in vitro experiments in hepatocellular carcinoma cell lines and in vivo ones in mice, No studies in patients with HCC were found.

**RESULTS :** GLP-1 agonists show a statistically significant effect on inhibiting the proliferation of hepatocellular carcinoma cell lines, through the mechanisms of autophagy, senescence and immune necrosis. Moreover, they suppress cell migration. The role of apoptosis is controversial. Their action is mediated via activation and inhibition of important signaling pathways, involved in hepatocarcinogenesis, including mTOR, TGF- $\beta$  and JNK.

**CONCLUSIONS:** This review indicates that GLP-1 agonists exhibit antitumor effect on hepatocellular carcinoma cell lines, when they grow in cultures, suppressing their proliferation and migration.

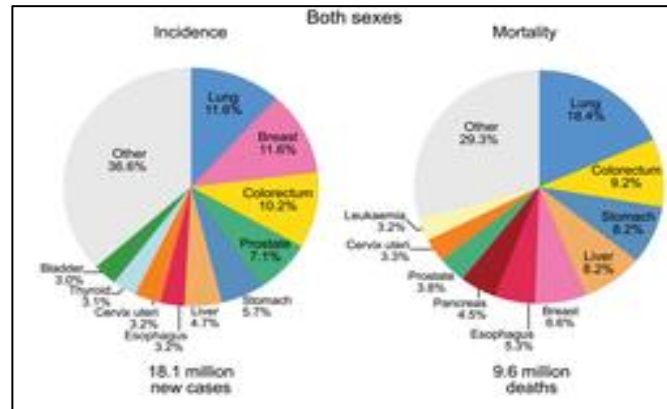
Well-designed studies in human with HCC are required to further clarify the results of this review.

**KEYWORDS:** Hepatocellular carcinoma, GLP-1 agonists, liraglutide, autophagy, mTOR.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ (ΗΚΚ)

### 1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο ΗΚΚ είναι ο 5<sup>ος</sup> σε συχνότητα διάγνωσης καρκίνος με περίπου 905.677 νέες περιπτώσεις το 2020 [1] και η 4<sup>η</sup> αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως, μετά από τον πνεύμονα, το παχύ έντερο και τον στομάχο, με 830.000 θανάτους το 2020. Είναι η 2<sup>η</sup> πιο θανατηφόρα κακοήθεια, μετά από αυτή του παγκρέατος, καθώς περίπου το 60-70% των περιπτώσεων διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο (εικόνα 4).



Εικόνα 1: κατανομή επίπτωσης και θνητότητας για τους 10 πιο συχνούς καρκίνους το 2018. Πηγή GLOBOCAN 2018.

Η επίπτωση και η θνητότητα του ΗΚΚ αυξάνονται σε πολλές περιοχές παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένων της Βόρειας και Λατινικής Αμερικής και της κεντρικής Ευρώπης. Στις ΗΠΑ δε, σε αντίθεση με το μειούμενο αριθμό θανάτων από κοινές κακοήθειες (πνεύμονας, μαστός, προστάτης), η θνητότητα του ΗΚΚ παρουσιάζει αύξηση κατά 0,5% στα έτη 2014-2018. Η εφαρμογή του εμβολίου της ηπατίτιδας Β και τα προγράμματα μαζικής ανίχνευσης και θεραπείας των φορέων της ηπατίτιδας C, έχουν αλλάξει την επιδημιολογία του ΗΚΚ, καθιστώντας την μη αλκοολική λιπώδη διήθηση ήπατος και τη στεατοηπατίτιδα κύριο παράγοντα κινδύνου ΗΚΚ (εικόνα 2).

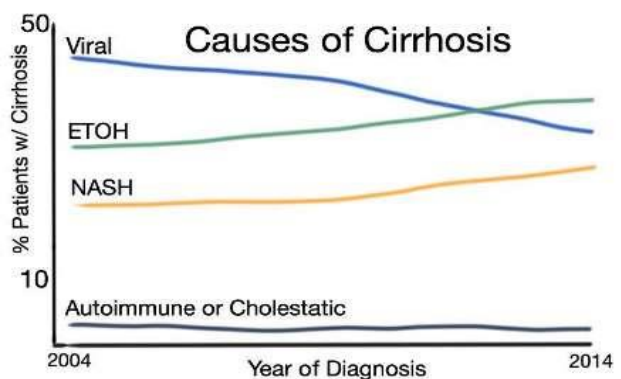
### 1.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

#### 1.2.1 ΚΙΡΡΩΣΗ ΗΠΑΤΟΣ

Ο πιο συχνός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη ΗΚΚ με ποσοστό 70-90% είναι η κίρρωση ήπατος κάθε αιτιολογίας, με το 1/3 των κίρρωτικών ασθενών να αναπτύσσουν ΗΚΚ κατά τη διάρκεια της ζωής τους και με την ετήσια επίπτωση να κυμαίνεται μεταξύ 1-8%.[2]. Τα κύρια αίτια κίρρωσης παγκοσμίως είναι οι ιογενείς ηπατίτιδες (HBV, HCV, HDV), η κατάχρηση αλκοόλ και η μη-αλκοολική-λιπώδης διήθηση του ήπατος (non alcoholic fatty liver disease, NAFLD). Στα πιο σπάνια αίτια συγκαταλέγονται η νόσος Wilson, η ανεπάρκεια α-1 αντιθρυψίνης, οι πορφυρίες, έκθεση σε αφλατοξίνη B1, το σύνδρομο Budd-Chiari, η αυτοάνοση ηπατίτιδα, η πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα και η πρωτοπαθής χολική σκλήρυνση. Η επιδημιολογία της κίρρωσης αλλάζει, επηρεάζοντας αυτή του ΗΚΚ, καθώς την παραδοσιακή πρωτοκαθεδρία των

ιογενών ηπατίτιδων, καταλαμβάνει πλέον η αυξανόμενη επίπτωση της NAFLD (εικόνα 2). Τέλος, είναι γνωστό ότι η ετήσια επίπτωση ΗΚΚ σε κίρρωτικούς ασθενείς που πάσχουν από

HCV(1.5%) και αιμοχρωμάτωση είναι μεγαλύτερη από αυτούς με κίρρωση λόγω αλκοόλ ή NAFLD.



Εικόνα 2: Trends in Characteristics, Mortality, and Other Outcomes of Patients With Newly Diagnosed Cirrhosis, 2019

### 1.2.2 ΜΗ ΚΙΡΡΩΤΙΚΟ ΥΠΕΔΑΦΟΣ

Ενώ το ΗΚΚ παραδοσιακά αναπτύσσεται σε υπέδαφος κίρρωσης, τα τελευταία χρόνια έγινε σαφές ότι μπορεί να αναπτυχτεί και σε πάσχοντες από χρόνια ηπατική νόσο πριν αυτή εξελιχθεί σε προχωρημένη ίνωση (κίρρωση) και κυρίως σε αυτούς που πάσχουν από HBV και NAFLD και δευτερευόντως αιμοχρωμάτωση. Και ενώ, το εμβόλιο κατά της ηπατίτιδας Β συντέλεσε τα μέγιστα στην αποτροπή της λοίμωξης

και άρα της εμφάνισης κίρρωσης και ΗΚΚ, η διαρκώς αυξανόμενη επίπτωση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2) και της παχυσαρκίας εκτοξεύει την επίπτωση της NAFLD, η οποία με τη σειρά της ευθύνεται για την αυξημένη επίπτωση του ΗΚΚ μεταξύ των μη κίρρωτικών ατόμων (εικόνα 2).

### **1.2.3 ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ**

Από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, εκτιμάται ότι περίπου το 10-30% των ασθενών με NAFLD θα αναπτύξουν ΗΚΚ, ενώ τις ΗΠΑ οι ασθενείς με NASH υπολογίζονται περί τους 6 εκατομμύρια[3]. Αν και η NAFLD έχει μικρότερη δυναμική εξέλιξης σε ΗΚΚ σε σχέση με άλλα αίτια (πχ HCV), η απόλυτη αριθμητική αύξηση των περιστατικών την καθιστά μείζονα παράγοντα κινδύνου.

Παράλληλα, η παχυσαρκία εκτιμάται ότι ευθύνεται για περίπου το 16% των περιπτώσεων ΗΚΚ την Ευρώπη (μελέτη EPIC)[4], ενώ ο συνδυασμός παχυσαρκίας με ΣΔ2 για το 37% στις ΗΠΑ[5].

### **1.3 ΗΠΑΤΟΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ**

Η ηπατοκαρκινογένεση είναι μια κλιμακωτή διαδικασία που χαρακτηρίζεται από προοδευτική κυτταρική και μοριακή αποδιαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων. Αναπτύσσεται στο έδαφος της χρόνιας ηπατικής βλάβης από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν πιο πάνω, οδηγώντας σε χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση η οποία με τη σειρά της προκαλεί επαναλαμβανόμενους κύκλους βλάβης των ηπατοκυττάρων, κυτταρικού θανάτου και αναγέννησης. Οι επαναλαμβανόμενοι αυτοί κύκλοι προωθούν αλλαγές τα σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και τον πολλαπλασιασμό καθώς και γενετικές και επιγενετικές μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά και ογκογόνα γονίδια. Η εκτροπή των μοριακών μηχανισμών, εξελίσσεται κατά τη διάρκεια μιας παρατεταμένης

προκαρκινικής περιόδου που μπορεί να κρατήσει για χρόνια ή δεκαετίες προτού επέλθει η μη-αντιστρεπτή καταστροφή του ηπατικού παρεγχύματος (κίρρωση) και δημιουργεί τις προϋποθέσεις εξαλλαγής και για αυτόνομου πολλαπλασιασμού των ηπατοκυττάρων.

Επιχειρείται μια σύντομη παρουσίαση των κύριων συντελεστών της ηπατοκαρκινογένεσης, προς βοήθεια του αναγνώστη να παρακολουθήσει το ειδικό μέρος της παρούσας εργασίας.

## **ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ**

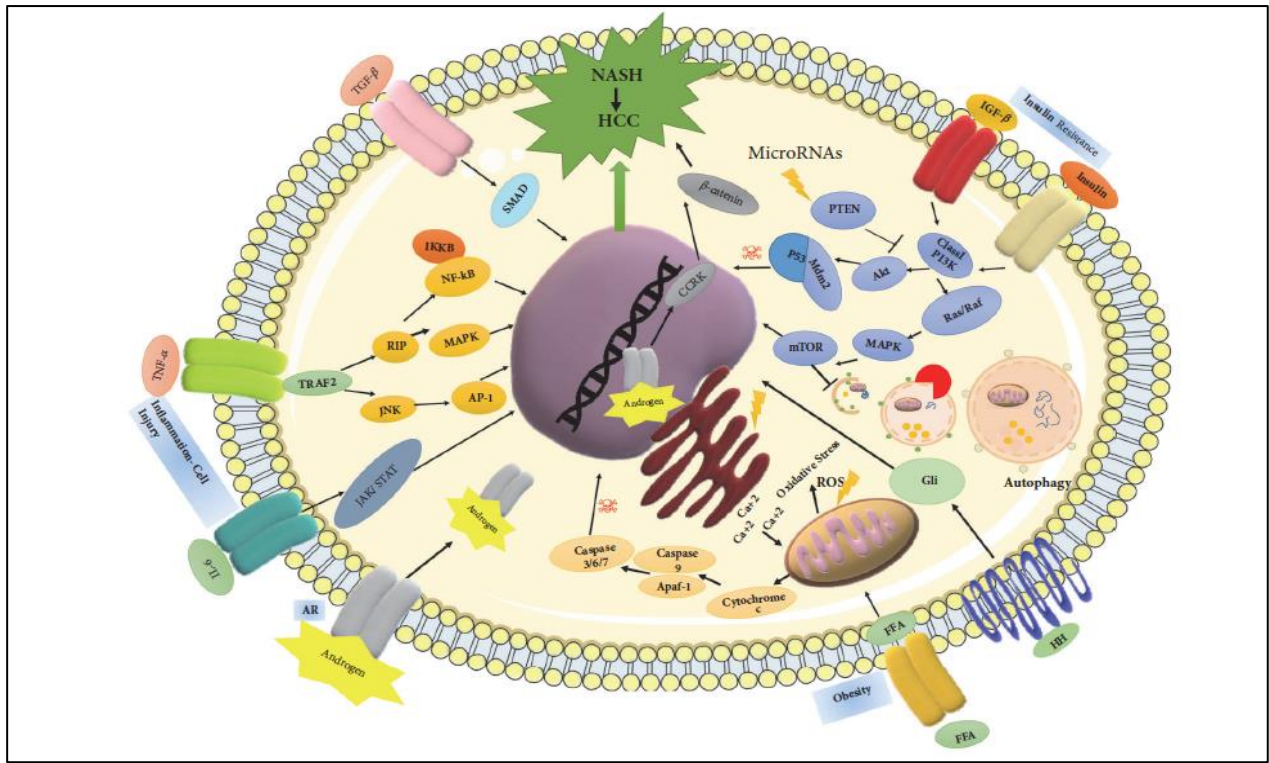
Στο φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον που δημιουργεί η χρόνια ηπατική βλάβη, λαμβάνουν χώρα μεταλλάξεις γονιδίων που κάτω από φυσιολογικές συνθήκες καταστέλλουν την καρκινογένεση στον άνθρωπο.

Οι μεταλλάξεις ογκοκατασταλτικών γονιδίων (p53, Rb/p16-retinoblastoma, PTEN-phosphatase tensin homolog και RUNX3-runt-related transcription factor 3) διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην εξέλιξη της ηπατοκαρκινογένεσης. Λιγότερο σημαντικό αλλά υπαρκτό ρόλο έχουν και οι μεταλλάξεις ογκογονιδίων (myc, K-ras και BRAF). Τέλος, άκρως σημαντική είναι η συμβολή της παθολογικής ενεργοποίησης των εμβρυικών και αναπτυξιακών σηματοδοτικών μονοπατιών της β-κατενίνης και της πρωτεΐνης Hedgehog[6].

## **ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

Αυξημένη έκφραση του TGF-α έχει παρατηρηθεί στο 81% των ΗΚΚ, ο οποίος ενεργοποιώντας τον υποδοχέα του(EGFR), οδηγεί στον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων[7]. Ίδια αποτελέσματα προκαλεί και η μετάλλαξη του

υποδοχέα του IGF-2 στο 25-55%, που οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του μιτογόνου αυτού αυξητικού παράγοντα.



Εικόνα 3 :μοριακοί μηχανισμοί ηπατοκαρκινογένεσης στη NASH, Ozlem Kutlu et al, Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2018.

## 1.4 ΠΡΟΛΗΨΗ

### 1.4.1 ΠΡΟΛΗΨΗ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

Με βάση την αιτιολογική σύνδεση του ΗΚΚ με την χρόνια ηπατική νόσο και την κίρρωση, είναι ευνόητο ότι κοινός παρονομαστής της πρόληψης είναι η αποφυγή και η θεραπεία ηπατοτοξικών παραγόντων.

Ο μαζικός εμβολιασμός του παγκόσμιου πληθυσμού με το εμβόλιο κατά της HBV, έχει μειώσει δραματικά τον αριθμό των μολύνσεων από τον ιό και ακολούθως την επίπτωση της κίρρωσης και του ΗΚΚ, που σχετίζονται με αυτήν.

Στα πλαίσια της πρόληψης εντάσσεται και η προσπάθεια που έχει ξεκινήσει από τους διεθνείς και εγχώριους υγειονομικούς φορείς για την προσυμπτωματική ανίχνευση (screening) των μολυσμένων με HCV ατόμων προκειμένου να λάβουν θεραπεία πριν το στάδιο της κίρρωσης.

Λαμβάνοντας υπόψη την αυξανόμενη επίπτωση της NAFLD, η οποία οδηγεί σε ανάπτυξη ΗΚΚ, η αυστηρή ρύθμιση της υπεργλυκαιμίας σε άτομα με ΣΔ2, η απώλεια βάρους και η αντιμετώπιση της στεατοηπατίτιδας (συντηρητικά ή φαρμακευτικά) είναι μέτρα πρόληψης ανάπτυξης ΗΚΚ.

#### **1.4.2 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΛΗΨΗ ΣΤΑΤΙΝΕΣ**

Οι ενδείξεις για την προστατευτική δράση των στατινών πληθαίνουν και παρέχονται από μελέτες παρατήρησης και πληθυσμιακές μελέτες. Σε μια μετανάλυση 10 μελετών που περιέλαβαν 1,6 εκατομμύρια ασθενείς, φάνηκε 37% μείωση του κινδύνου ανάπτυξης ΗΚΚ (odds ratio [OR] 0.63; 95%) σε αυτούς υπό στατίνη, συγκρινόμενοι με εκείνους που δεν ελάμβαναν στατίνη[8].

#### **ΑΣΠΙΡΙΝΗ**

Η μακροχρόνια και τακτική ( $\geq 2$  ταμπλέτες των 325 mg εβδομαδιαίως) λήψη ασπιρίνης συνδέεται με χαμηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης ΗΚΚ, σε αντίθεση με ασθενείς που δεν την λαμβάνουν τακτικά (aHR 0.51, 95% CI 0.34-0.77) [9]. Οι ασθενείς δε που πάσχουν από χρόνια ιογενή ηπατίτιδα και λαμβάνουν ασπιρίνη για καρδιολογικούς λόγους, φαίνεται να έχουν επιπλέον όφελος.

#### **ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗ**

Η λήψη μετφορμίνης συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης νεοπλασιών, μεταξύ των οποίων και το ΗΚΚ. Υπάρχουν μεταanalύσεις που αναφέρουν έως και 50% μείωση του κινδύνου[10].

#### **1.4.3 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΡΟΠΟΥ ΖΩΗΣ**

Υπάρχουν στοιχεία ότι η κατανάλωση καφέ, άσπρου κρέατος, ψαριών, λαχανικών, ω-3 λιπαρών και βιταμίνης Ε καθώς και η φυσική άσκηση μειώνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης νεοπλασιών, μεταξύ των οποίων και ΗΚΚ[11,12,13].

#### **1.5 ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ**

Η έννοια της επιτήρησης (surveillance) του ΗΚΚ αποσκοπεί στην ανίχνευση όγκου σε πρώιμο στάδιο, όταν και μπορούν να εφαρμοστούν οι διαθέσιμες θεραπείες ίασης (curative treatments) που επιβεβαιωμένα βελτιώνουν την επιβίωση[14].

##### **1.5.1 ΥΠΕΡΗΧΟΣ**

Ο ακρογωνιαίος λίθος της επιτήρησης σήμερα είναι η διενέργεια υπερήχου ήπατος στους κίρρωτικούς ασθενείς ανά 6 μήνες (χρόνος διπλασιασμού του όγκου του ΗΚΚ) με ή χωρίς τη σύγχρονη μέτρηση της αFP. Συγκεκριμένα, η ελληνική Εταιρία Μελέτης του Ήπατος προτείνει εξαμηνιαίο υπερηχογραφικό έλεγχο με συνοδό μέτρηση της αFP. Η ευαισθησία της μεθόδου για ανίχνευση ΗΚΚ σε οποιοδήποτε στάδιο είναι 84% (95%CI 76 – 92%), ενώ για το πρώιμο στάδιο κατέρχεται μόλις στο 47% (95%CI 33 – 61%), ενώ παραμένει χαμηλή σε παχύσαρκους και ασθενείς με NAFLD[15]. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η μη επεμβατική της φύση και άρα η καλή αποδοχή της από τους ασθενείς και το χαμηλό της κόστος. Μειονεκτήματα αποτελούν η εξάρτηση του αποτελέσματος από την εμπειρία του χειριστή και η χαμηλή ευαισθησία της για την ανίχνευση όγκου σε πρώιμο στάδιο.

### 1.5.2 ΜΕΤΡΗΣΗ aFP

Η aFP αποτελεί τον καλύτερα μελετημένο βιοδείκτη στο ΗΚΚ, έχοντας όμως πολύ χαμηλή ευαισθησία όταν χρησιμοποιείται μόνη της, περίπου στο 60%. Η ευαισθησία της για πρώιμη ανίχνευση ΗΚΚ σε συνδυασμό με τον υπέρηχο βρίσκεται στο 63%, (95% CI 48%–75%), σε αντίθεση με το 45%, (95% CI 30%– 62%) του υπερήχου μόνο[15].

Για την ελαχιστοποίηση των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, έχει προταθεί αντί για την απόλυτη τιμή της, να αξιολογείται η μεταβολή των τιμών της , που φαίνεται να ανιχνεύει με μεγαλύτερη ακρίβεια ασθενείς με πρώιμο ΗΚΚ[16,17].

Τέλος, γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης score που θα ενσωματώνουν μεταξύ των άλλων και την aFP . Το HES (HCC early detection screening) είναι ένα τέτοιο μοντέλο όπου συνυπολογίζει την πιο πρόσφατη τιμή της, το ρυθμό αλλαγής της και επιπλέον τη ηλικία και τις τιμές αίματος τρανσαμινασών και αιμοπεταλίων κάτι που φαίνεται να αυξάνει την ευαισθησία πρώιμης ανίχνευσης ΗΚΚ[18].

### 1.5.3 ΝΕΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η επιτήρηση των κίρρωτικών ασθενών με MRI ήπατος με ηπατοειδικά σκιαγραφικά φαίνεται να παρέχει σημαντικά υψηλότερη ευαισθησία από τον υπέρηχο (83.7% vs. 45.6%) για την ανίχνευση του πρώιμου ΗΚΚ[19]. Η MRI ήπατος είναι επίσης ελκυστικός τρόπος επιτήρησης και των μη κίρρωτικών ασθενών που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο εκδήλωσης ΗΚΚ, όπως των ασθενών με ΣΔ2, NAFLD, παχυσαρκία. Μειονέκτημα αποτελεί το υψηλό κόστος της μεθόδου, γεγονός που δεν την εντάσσει στα χρησιμοποιούμενα εργαλεία της επιτήρησης.

Παράλληλα γίνεται προσπάθεια ανακάλυψης νέων βιοδεικτών με βελτιωμένη ευαισθησία.

#### **1.5.4 Η ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΗ ΚΙΡΡΩΤΙΚΩΝ**

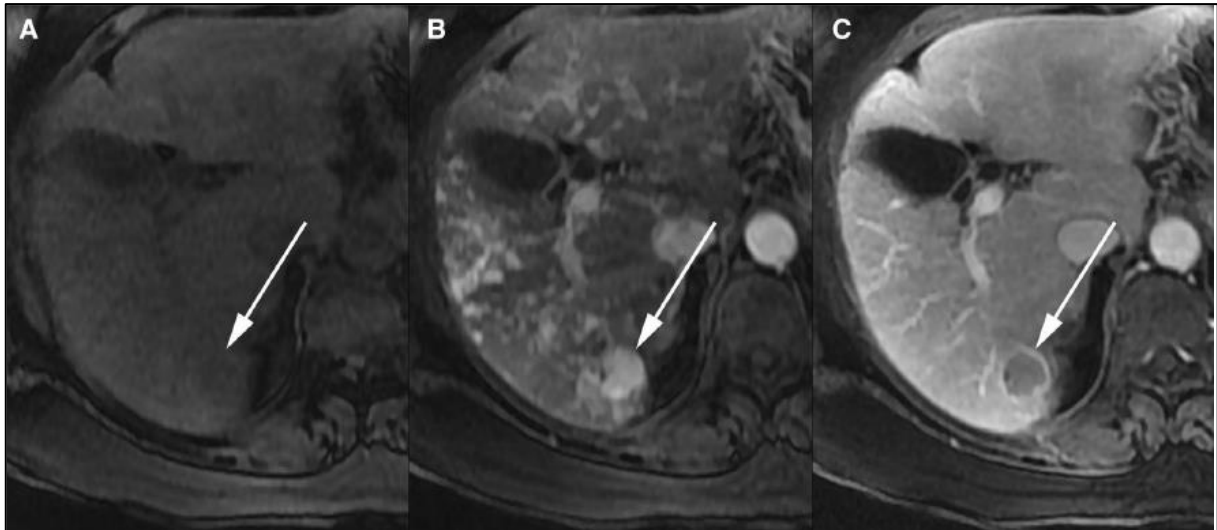
Η προφανής σκέψη για διενέργεια υπερήχου ή MRI ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε αυτούς τους ασθενείς στερείται ενδείξεων και κόστους-οφέλους. Η επικρατούσα αντίληψη και πρακτική είναι η ανάπτυξη μοντέλων κατηγοριοποίησης του κινδύνου εμφάνισης ΗΚΚ (χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου) σε μη κιρρωτικούς ασθενείς και αναλόγως να επιτηρούνται. Τέτοιο είναι το PAGE-B score για τους μη κιρρωτικούς ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β. Αν και δεν έχει δοθεί οριστική απάντηση, φαίνεται ότι στους ασθενείς με NAFLD, η απουσία/παρουσία ΣΔ2, η εκτίμηση του βαθμού ίνωσης μέσω δεικτών (ELF test, NAFLD score) ή ελαστογραφίας και παθολογοανατομικού υλικού μπορούν να κατηγοριοποιήσουν τους ασθενείς σε επίπεδα κινδύνου για ανάπτυξη ΗΚΚ.

#### **1.6 ΔΙΑΓΝΩΣΗ**

Η διαγνωστική προσέγγιση σε υποψία ΗΚΚ εξαρτάται από το μέγεθος της βλάβης και την παρουσία ή απουσία κίρρωσης. Οι σχετικές ελληνικές κατευθυντήριες οδηγίες συνάδουν με αυτές της Ευρωπαϊκής Εταιρίας Μελέτης του Ήπατος (EASL) και γι' αυτό αποτελούν αναφορά σε αυτήν την εργασία.

##### **1.6.1 ΚΙΡΡΩΤΙΚΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

Το gold standard της διάγνωσης του ΗΚΚ στους κιρρωτικούς ασθενείς είναι η ανεύρεση των χαρακτηριστικών ακτινολογικών σημείων (hallmark) του ΗΚΚ στον απεικονιστικό έλεγχο με αξονική ή μαγνητική, που είναι η πρόσληψη του σκιαγραφικού στην αρτηριακή φάση της απεικόνισης και η γρήγορη έκπλυσή του στην πυλαία φάση (εικόνα 4). Το πρωτόκολλο της αξονικής περιλαμβάνει 4 φάσεις με ανάδειξη σκιαγραφικής ενίσχυσης κατά την αρτηριακή φάση και έκπλυση κατά την πυλαία, ενώ το πρωτόκολλο της μαγνητικής αναδεικνύει αυξημένο σήμα της βλάβης στην T2 ακολουθία.



Εικόνα 4:τυπική εμφάνιση ΗΚΚ σε MRI ήπατος. Α) υπόηχη βλάβη προ έγχυσης σκιαγραφικού. Β) η βλάβη προσλαμβάνει σκιαγραφικό(hyperenhancement) κατά την αρτηριακή φάση. C)έκλυση σκιαγραφικού από τη βλάβη κατά την πυλαία φάση, Narsinh et al, 2017.

Η διαγνωστική ευαισθησία κυμαίνεται συναρτήσει του μεγέθους του όγκου, όμως η MRI επιδεικνύει μεγαλύτερη ευαισθησία από τη CT. Σε όγκους μικρότερους των 2 εκατοστών η διαγνωστική ευαισθησία είναι 62% και 48% αντίστοιχα, ενώ για όγκους άνω των 2 εκατοστών τα ποσοστά είναι 95% και 92% αντίστοιχα.

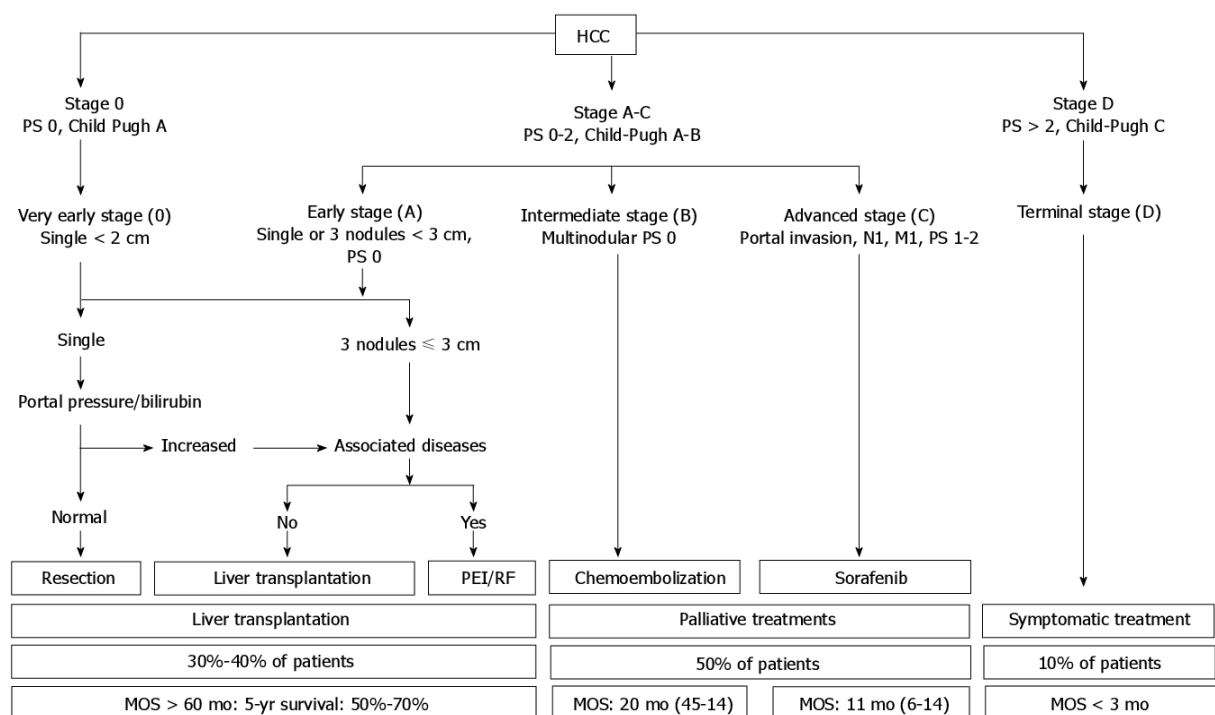
Η ανεύρεση τυπικού απεικονιστικού χαρακτήρα στις απεικονιστικές μεθόδους, ανεξαρτήτως τιμών α-φетоπρωτεΐνης, τεκμηριώνει τη διάγνωση ΗΚΚ, κάνοντας περιττή την παθολογοανατομική επιβεβαίωση. Η βιοψία αποκτά νόημα μόνο σε αμφιβολία του απεικονιστικού αποτελέσματος ή για ερευνητικούς λόγους.

### 1.6.2 ΜΗ ΚΙΡΡΩΤΙΚΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Στους μη κίρρωτικούς ασθενείς η επιβεβαίωση της διάγνωσης του ΗΚΚ οφείλει πάντα να είναι παθολογοανατομική ακόμα και μετά από συμβατά απεικονιστικά ευρήματα. Η ευαισθησία της βιοψίας ήπατος κυμαίνεται μεταξύ 70 και 90% και εξαρτάται από την τοποθεσία της βλάβης, το μέγεθός της και από την εμπειρία του εκτελεστή.

## 1.7 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Στους ασθενείς με ΗΚΚ, σε αντίθεση με τους περισσότερους συμπαγείς όγκους, συνυπάρχουν εξ αρχής δύο απειλητικές για τη ζωή οντότητες, ο καρκίνος και η κίρρωση περιπλέκοντας την πρόγνωση και τις θεραπευτικές δυνατότητες. Το πρόβλημα αυτό ήρθε να απαντήσει το σύστημα σταδιοποίησης της ΒΑΡΚΕΛΩΝΗΣ (Barcelona clinic liver cancer staging system ,BCLC), που βασίζεται στο μέγεθος και τον αριθμό των μαζών, την ηπατική λειτουργία (Child Pugh score) και τη φυσική κατάσταση του ασθενούς. Το BCLC θεωρείται ανώτερο σύστημα σταδιοποίησης του ΗΚΚ σε σύγκριση με το σύστημα TNM, καθώς ενσωματώνει την εκτίμηση της ηπατικής λειτουργίας στη λήψη θεραπευτικής απόφασης και παράλληλα έχει προγνωστική αξία. Προκύπτουν 5 στάδια (εικόνα 5).



**Εικόνα 5: Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging classification and treatment schedule, Modified from Llovet et al.**

**ΣΤΑΔΙΟ 0 ή πολύ πρώιμο ΗΚΚ:** περιλαμβάνει ασθενείς με μονήρη βλάβη, με καλά διατηρημένη ηπατική λειτουργία (Child Pugh score A) και απουσία πυλαίας

υπέρτασης. Είναι υποψήφιοι για θεραπεία ίασης με χειρουργική εκτομή. Μόνο 10% των ασθενών διαγιγνώσκονται σε αυτό το στάδιο.

ΣΤΑΔΙΟ Α ή πρώιμο ΗΚΚ: περιλαμβάνει ασθενείς με μια μονήρη βλάβη ή με το πολύ τρεις με τη μεγαλύτερη να είναι μικρότερη των 3 εκατοστών (κριτήρια Μιλάνου). Η ηπατική τους λειτουργία είναι μετρίως διατηρημένη (Child Pugh score A και B) και μπορεί να έχουν ή όχι πυλαία υπέρταση. Είναι υποψήφιοι για θεραπείες ίασης που περιλαμβάνουν τη χειρουργική εκτομή, την μεταμόσχευση ήπατος (liver transplantation, LT), το διαδερμικό καυτηριασμό με έγχυση αιθανόλης (percutaneous ethanol injection, PEI) και τον καυτηριασμό με ραδιοσυχνότητες (radiofrequency ablation, RF) .

ΣΤΑΔΙΟ Β ή ενδιάμεσο στάδιο: περιλαμβάνει ασθενείς με πολυεστιακό ΗΚΚ και καλή ή μέτρια ηπατική λειτουργία (Child Pugh score A και B) .Μπορούν να λάβουν θεραπεία συντήρησης, με σκοπό την παράταση της επιβίωσης όχι όμως την ίαση, με ενδοαρθριακό χημειοεμβολισμό, υπερεκλεκτικό ή μη, κλάδων της ηπατικής αρτηρίας (transarterial chemoembolization, TACE).

ΣΤΑΔΙΟ C ή προχωρημένο ΗΚΚ: περιλαμβάνει ασθενείς που μεταξύ των άλλων εμφανίζουν διήθηση της πυλαίας φλέβας ή/και μεταστάσεις ή/και συμπτώματα σχετιζόμενα με τον όγκο με καλή ή μέτρια ηπατική λειτουργία (Child Pugh score A και B). Μπορούν να λάβουν ανοσοθεραπευτικά φάρμακα (sorafenib) ως θεραπεία συντήρησης, με σκοπό την παράταση της επιβίωσης.

ΣΤΑΔΙΟ D ή τελικού σταδίου ΗΚΚ: περιλαμβάνει όλους εκείνους τους ασθενείς με σοβαρά επηρεασμένη ηπατική λειτουργία (Child Pugh score C), ανεξαρτήτως χαρακτηριστικών των βλαβών. Είναι υποψήφιοι μόνο για ανακουφιστική θεραπεία.

## **1.8 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΗΚΚ**

### **1.8.1 ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΙΑΣΗΣ**

Οι θεραπείες ίασης απευθύνονται σε ασθενείς που διαγιγνώσκονται στα στάδια 0 και 1 και αποτελούν περίπου το 30-40% του συνόλου τους. Ανάλογα με το στάδιο, το μέγεθος, την τοποθεσία και τον αριθμό των βλαβών μπορεί να πραγματοποιηθεί χειρουργική εκτομή (ηπατεκτομή), μεταμόσχευση ήπατος και κατάλυση του όγκου με ραδιοσυχνότητες.

### **ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΕΚΤΟΜΗ**

Είναι η θεραπεία εκλογής σε ασθενείς με μονήρη βλάβη, καλά διατηρημένη ηπατική λειτουργία (Child Pugh score A) και απουσία πυλαίας υπέρτασης. Μπορεί να πραγματοποιηθεί ογκεκτομή, τμηματεκτομή ακόμη και λοβεκτομή, ανάλογα με το μέγεθος και την εντόπιση του όγκου. Σε έμπειρα κέντρα, η περιεγχειρητική θνητότητα και νοσηρότητα είναι μικρότερη από 3% και 30% αντίστοιχα.

Η πενταετής επιβίωση είναι περίπου 60–80%. Εντός πενταετίας, αναμένεται υποτροπή στο 70% των ασθενών, που αντικατοπτρίζει είτε τις εξαρχής μη ανιχνεύσιμες ενδοηπατικές μεταστάσεις (πραγματική υποτροπή) είτε την de novo εμφάνιση ΗΚΚ στο υπόβαθρο της κίρρωσης[20]. Η αξία της adjuvant χημειοθεραπείας στην περίπτωση αυτή μελετάται αλλά δεν έχει τεκμηριωθεί ακόμα.

Συστήνεται στενή παρακολούθηση μετά την εκτομή, λόγω του υψηλού ποσοστού υποτροπών, ανά 3 με 4 μήνες τουλάχιστον για το 1<sup>ο</sup> έτος.

### **ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΗΠΑΤΟΣ**

Αποτελεί τη θεραπεία εκλογής για ασθενείς που δεν είναι υποψήφιοι για χειρουργική εκτομή και εμπίπτουν στα κριτήρια του Μιλάνου (μία μονήρης βλάβη έως 5 εκατοστά ή το πολύ τρεις με τη μεγαλύτερη μικρότερη των 3 εκατοστών). Αν ικανοποιούνται οι

παραπάνω προϋποθέσεις η πενταετής επιβίωση ανέρχεται σε 65-80%, ποσοστό ίδιο με τους μεταμοσχευμένους ήπατος άλλης αιτιολογίας. Το μεγάλο θετικό της μεταμόσχευσης είναι ότι με την απομάκρυνση του κίρρωτικού ήπατος μειώνεται η πιθανότητα υποτροπής ΗΚΚ. Απόλυτες αντενδείξεις είναι η αγγειακή διήθηση (νεοπλασματική θρόμβωση πυλαίας) και η ύπαρξη μεταστάσεων.

### **ΚΑΥΤΗΡΙΑΣΜΟΣ ΜΕ ΡΑΔΙΟΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ, RFA**

Ο RFA είναι θεραπεία εκλογής σε ασθενείς με πρώιμο ΗΚΚ Σταδίου Α, με μονήρη μάζα μικρότερη των 2 εκατοστών. Μεταanalύσεις δείχνουν επιβίωση και απουσία υποτροπής εντός της τριετίας στο 73% και 46% αντίστοιχα[21]. Για όγκους μικρότερους των 2 εκατοστών έχει συγκρίσιμα αποτελέσματα με τη χειρουργική εκτομή.

### **1.8.2 ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ**

#### **ΕΝΔΑΡΤΗΡΙΑΚΟΣ ΧΗΜΕΙΟΕΜΒΟΛΙΜΟΣ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΣ, TACE**

Το ΗΚΚ επιδεικνύει εκσεσημασμένη αρτηριακή αγγειογενετική δυνατότητα με αποτέλεσμα να αρδεύεται μόνο από την ηπατική αρτηρία και καθόλου από την πυλαία φλέβα. Αυτή την παθοφυσιολογική ιδιότητα εκμεταλλεύονται οι ενδαρτηριακές θεραπείες. Συγκεκριμένα, το συμβατικό TACE περιλαμβάνει την έγχυση χημειοθεραπευτικών παραγόντων (δοξορουβικίνη, σισπλατίνη) σε κλάδους της ηπατικής αρτηρίας και ακολούθως τον εμβολισμό τους.

Αποτελεί θεραπεία εκλογής για ασθενείς που διαγιγνώσκονται στο στάδιο C, με πολυεστιακό ΗΚΚ και καλή ή μέτρια ηπατική λειτουργία (Child Pugh score A και B). Επιπλέον, χρησιμοποιείται ευρέως σε θεραπεία-γέφυρα μείωσης καρκινικού

φορτίου(downstaging) σε ασθενείς πολύ πρώιμου και πρώιμου σταδίου που βρίσκονται σε αναμονή για χειρουργική εκτομή ή μεταμόσχευση ήπατος.

Σε μια μετανάλυση που συμπεριέλαβε 101 άρθρα και 10,108 ασθενείς[22], ο ρυθμός ανταπόκρισης φάνηκε να είναι 52.5% (95% CI 43.6–61.5) και η συνολική επιβίωση(overall survival, OS) 70.3% τον πρώτο χρόνο, 40.4% στα τρία χρόνια και 32.4% στα πέντε χρόνια.

Απόλυτες αντενδείξεις για τη διενέργεια του αποτελούν η μη αντιρροπούμενη κίρρωση, η προχωρημένη ηπατική και νεφρική δυσλειτουργία, η μακροσκοπική αγγειακή διασπορά και οι εξωηπατικές μεταστάσεις.

## **ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ**

Οι από του στόματος αναστολείς πολλαπλών τυροσινικών κινασών (TKIs), sorafenib και Lenvatinib, αποτελούν πρώτης γραμμής θεραπευτική επιλογή για ασθενείς με προχωρημένο στάδιο που δε δύνανται να λάβουν τοπικοπεριοχική θεραπεία. Το sorafenib, όπως φάνηκε στις μελέτες έγκρισης[23] προσφέρει μέση συνολική επιβίωση 10.7 μηνών σε σύγκριση με τους 7,9 μήνες των ασθενών άνευ θεραπείας, επιδεικνύοντας μείωση του σχετικού κίνδυνου θανάτου κατά 31%.

Έδαφος έχει αρχίζει να κερδίζει και η ανοσοθεραπεία στο ΗΚΚ με τη μελέτη και περιορισμένη χρήση των Immune-checkpoint inhibitors[24].

## **1.9 ΠΡΟΓΝΩΣΗ**

### **ΣΤΑΔΙΟ 0 ή πολύ πρώιμος ΗΚΚ:**

Τα δεδομένα των μελετών δείχνουν πενταετή επιβίωση 80-90% στους ασθενείς με μονήρη μάζα μικρότερη των 2 εκατοστών που θεραπεύτηκαν με χειρουργική εκτομή

ή RFA. Εντός πενταετίας, αναμένεται υποτροπή στο 70% των ασθενών, που αντικατοπτρίζει είτε τις μη εντοπισμένες ενδοηπατικές μεταστάσεις (πραγματική υποτροπή) είτε την de novo εμφάνιση ΗΚΚ στο υπόβαθρο της κίρρωσης.

#### ΣΤΑΔΙΟ Α ή πρώιμος ΗΚΚ:

Η πενταετής επιβίωση βρίσκεται μεταξύ 50 και 70% μετά από χειρουργική εκτομή, μεταμόσχευση ήπατος ή τοπικοπεριοχική επέμβαση (RFA) σε σωστά επιλεγμένους ασθενείς. Η μέση επιβίωση υπολογίζεται στους 36 μήνες.

#### ΣΤΑΔΙΟ Β ή ενδιάμεσο στάδιο:

Η μέση επιβίωση, χωρίς θεραπεία, είναι 16 μήνες, αλλά μετά την εισαγωγή του TACE μπορεί να παραταθεί μέχρι και τους 40 μήνες. Η επιβίωση στα 2 χρόνια 49%.

#### ΣΤΑΔΙΟ C ή προχωρημένο ΗΚΚ:

Η μέση επιβίωση, χωρίς θεραπεία, είναι 6-8 μήνες αλλά η χορήγηση από του στόματος πολλαπλών αναστολέων κινασών δύναται να ανέρθει στους 10,7 μήνες. Η μέση επιβίωση στο έτος είναι μόλις 25%.

#### ΣΤΑΔΙΟ D ή τελικού σταδίου ΗΚΚ:

Οι ασθενείς αυτού του σταδίου κατά κανόνα έχουν προχωρημένο στάδιο ηπατοπάθειας (Child Pugh score C), ανεξαρτήτως των χαρακτηριστικών του όγκου. Η μέση επιβίωση είναι 3-4 μήνες και η μέση επιβίωση στο έτος είναι μόλις 11%.

Αξίζει να αναφερθεί ότι παρά το πρόγραμμα επιτήρησης, το 60-70% των ασθενών με ΗΚΚ, διαγιγνώσκονται πέραν των αρχικών σταδίων (0: πολύ πρώιμο, A: πρώιμο), καθιστώντας αδύνατες τις θεραπείες ίασης και μειώνοντας δραματικά την επιβίωση (εικόνα 4).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: GLP-1 ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ

### 2.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Σχεδόν πριν από εκατό χρόνια, καταγράφηκαν οι πρώτες παρατηρήσεις για τον ενεργητικό ρόλο του πεπτικού σωλήνα στη διαχείριση του ενεργειακού ισοζυγίου που προέρχεται από την τροφή. Το 1902 οι Bayliss και Starling κάνουν την πρώτη παρατήρηση για την πιθανή ικανότητα μιας ουσίας που παράγεται από το γαστρεντερικό σύστημα να επάγει την παγκρεατική ορμονική έκκριση. Το 1932 ο La Barre εισάγει τον όρο <<ινκρετίνη>> για να περιγράψει την ορμονική δραστηριότητα του λεπτού εντέρου που επάγει την εκκριτική λειτουργία της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος. Το 1964 οι Mc Intyre και Elrick, από δύο ξεχωριστές ερευνητικές ομάδες, ορίζουν το <<φαινόμενο της ινκρετίνης>> σύμφωνα με το οποίο η χορήγηση από του στόματος γλυκόζης προκαλεί μεγαλύτερη έκκριση ινσουλίνης από την ενδοφλεβίως χορηγούμενη γλυκόζη.

Το 1973, ανακαλύφθηκε το GIP (gastric inhibitory peptide), το οποίο ονομάστηκε μετά τη διαπίστωση προκαλούσε μείωση της γαστρικής κινητικότητας.

Το 1986, ο Nauck Michael απέδειξε ότι το φαινόμενο της ινκρετίνης είναι μειωμένο σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2), ενώ το 1987 επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του GLP-1 (glucagon like peptide-1) στους ανθρώπους. Πήρε το όνομα αυτό λόγω της χημικής ομοιότητας με την γλυκαγόνη. Το 1995 ανακαλύπτεται η διπεπτιδύλ-πεπτιδάση-4 (DPP-4), το ένζυμο που απενεργοποιεί τα GIP και GLP-1 λίγα μόλις λεπτά μετά την απελευθέρωσή τους στην κυκλοφορία.

Οι ανακαλύψεις αυτές οδήγησαν σε ερευνητική δραστηριότητα για τη δημιουργία καινούργιων παραγόντων για τη θεραπεία του ΣΔ2 και ως εκτούτου σήμερα είναι εμπορικά διαθέσιμοι οι GLP-1 αγωνιστές και οι αναστολείς των DPP-4.

## 2.2 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

### 2.2.1 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΙΝΚΡΕΤΙΝΗΣ

Η σύνδεση μεταξύ του γαστρεντερικού συστήματος και της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος διαπιστώθηκε το 1960 όταν κατέστη δυνατή η μέτρηση της ινσουλίνης στο πλάσμα. Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα της ινσουλίνης στο πλάσμα παρουσιάζουν μεγαλύτερη άνοδο μετά από του στόματος χορήγηση γλυκόζη σε σύγκριση με την χορήγηση ίσης ποσότητας γλυκόζης ενδοφλεβίως. Αυτή η παρατήρηση ονομάστηκε φαινόμενο της ινκρετίνης και αποδείχτηκε ότι οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο GLP1 (παρόμοιο με το Γλουκαγόνο Πεπτίδιο-1 ,glucagon like peptide-1) και στο GIP (Γλυκοζο-εξαρτώμενο Ινσουλινotρόπο Πολυπεπτίδιο glucose-dependent insulin releasing polypeptide). Το φαινόμενο αυτό είναι σημαντικά ελαττωμένο σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην ανάπτυξη των GLP-1 αναλόγων σαν πρώτης γραμμής αντιδιαβητικά φάρμακα, ενώ στην πορεία χρήσης τους ανακαλύφτηκε η ευεργετική τους δράση σε ποικίλα συστήματα και νόσους πλην του ΣΔ2.

### 2.2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ, ΕΚΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ GLP-1

Και τα δύο πεπτίδια εκκρίνονται από το έντερο ως απάντηση στην πρόσληψη τροφής και επάγουν την εξαρτώμενη από τα επίπεδα γλυκόζης πλάσματος έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος[4]. Για λόγους συντομίας αλλά και συνάφειας προς το ειδικό μέρος της παρούσας εργασίας, θα περιγραφεί μόνο το GLP-1.

## ΣΥΝΘΕΣΗ

Τα γονίδια που κωδικοποιούν το GLP-1 εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 2.

Το GLP-1 αποτελείται από 31 αμινοξέα και προέρχεται από την ενζυματική διάσπαση του μορίου της προγλουκαγόνης στα L-κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα. Η

προγλυκαγόνη υφίσταται διαφορετική ενζυμική επεξεργασία σε κάθε ιστό, αποδίδοντας γλυκαγόνη στο πάγκρεας, ενώ στο κεντρικό νευρικό σύστημα τα κύρια προϊόντα είναι το GLP-1, το GLP-2 και η οξυνομοντουλίνη, παλαιότερα γνωστή ως εντερογλυκαγόνη[26].

## **ΕΚΚΡΙΣΗ**

Το GLP-1 παράγεται από τα L-κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα και από τα α-κύτταρα του παγκρέατος ως απάντηση στην είσοδο της τροφής στον πεπτικό σωλήνα. Τα L-κύτταρα ανευρίσκονται σε όλο το μήκος του εντέρου, κυρίως στον ειλεό και το κόλον αλλά και στο λεπτό έντερο. Επιπλέον, αποδείχτηκε ότι ευρίσκονται και σε περιοχές του εγκεφάλου, όπως στον υποθάλαμο και την υπόφυση[26].

Η δράση του GLP-1 εκδηλώνεται μέσω της σύνδεσής του με ειδικούς πρωτεϊνικούς G-υποδοχείς (GLP-1R) που εκφράζονται κυρίως στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Η σύνδεση αυτή προκαλεί αύξηση του ενδοκυττάριου cAMP, ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA), η οποία με τη σειρά της προκαλεί τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυττάριου  $Ca^{2+}$ , την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και την απελευθέρωση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος. Εκτός από τα β-κύτταρα, GLP-1R εκφράζονται στην καρδιά, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στους νεφρούς, στους πνεύμονες, στην υπόφυση, στο δέρμα, στους γευστικούς κάλυκες και στο γαστρεντερικό σωλήνα[26].

Παρά το γεγονός ότι τα L κύτταρα που παράγουν το GLP-1 βρίσκονται κυρίως στα κατώτερα τμήματα του παχέος εντέρου, έχει διαπιστωθεί ότι τα επίπεδά του αυξάνονται λίγα μόλις λεπτά μετά από την είσοδο της τροφής στον πεπτικό σωλήνα. Πιο συγκεκριμένα, η έκκριση του GLP-1 από τα L κύτταρα παρουσιάζει δύο φάσεις. Η πρώτη φάση αρχίζει αμέσως μετά από την πρόσληψη της τροφής και διαρκεί 30–60

λεπτά, ενώ η δεύτερη χαρακτηρίζεται από παρατεταμένη έκκριση του GLP-1 και είναι διάρκειας 60–120 λεπτά. Βάσει των παραπάνω, φαίνεται ότι η πρώτη φάση έκκρισης του GLP-1 είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης νευροενδοκρινικών παραγόντων που εκκρίνονται με την είσοδο της τροφής στο πεπτικό σύστημα, ενώ η δεύτερη είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της τροφής με τα L κύτταρα του παχέος εντέρου[26].

## **ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ-ΑΠΕΚΚΡΙΣΗ**

Μετά την είσοδο του στην κυκλοφορία, το GLP-1 διασπάται ταχύτατα από το ένζυμο DPP-4 (διπεπτιδυλ-πεπτιδάση 4, dipeptidyl peptidase 4), με αποτέλεσμα ο χρόνος ημίσειας ζωής του να είναι ιδιαίτερα μικρός (1–2 λεπτά). Το ένζυμο DPP-4 που ανακαλύφθηκε το 1995, εντοπίζεται στην ψηκτροειδή παρυφή του εντερικού βλεννογόνου, στο νεφρικό επιθήλιο, στο ενδοθήλιο των τριχοειδών, καθώς και σε διαλυτή μορφή στην κυκλοφορία. Μετά την ταχεία διάσπασή του από το ένζυμο DPP-4, οι μεταβολίτες του GLP-1 αποβάλλονται μέσω των νεφρών[27].

## **2.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ GLP-1 ΣΤΟ ΠΑΓΚΡΕΑΣ ΚΑΙ ΤΗ ΓΛΥΚΑΙΜΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ**

### **2.3.1 ΕΚΚΡΙΣΗ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ**

Το GLP-1, συνδεόμενο στον GLP-1 R στα β-κύτταρα του παγκρέατος, οδηγεί, μέσω ενεργοποίησης του cAMP, και της PKA, στην έκκριση της προσχηματισμένης ινσουλίνης των κυστιδίων με εξωκύτωση. Οι οδοί αυτοί εξασφαλίζουν ότι η ινσουλिनотρόπος επίδραση του GLP1 είναι εξαρτώμενη από τη γλυκόζη. Η δράση του αυτή συμβάλλει στην αποκατάσταση της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας.

### 2.3.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ

Σε απομονωμένα β-κύτταρα καλλιέργειας, το GLP-1, συνδεδεόμενο στον GLP-1 R στα β-κύτταρα του παγκρέατος, φαίνεται ότι αυξάνει τον ρυθμό μεταγραφής και μετάφρασης του γονιδίου της ινσουλίνης. Η αύξηση αυτή στη βιοσύνθεση και την έκκριση ινσουλίνης οφείλεται στη διαμεολαβούμενη από το GLP-1 ενεργοποίηση του παράγοντα μεταγραφής Pdx1[28], ο οποίος εμπλέκεται στην ανάπτυξη του παγκρέατος και τον MODY τύπου-4 διαβήτη.

### 2.3.3 ΕΚΚΡΙΣΗ ΓΛΥΚΑΓΟΝΗΣ

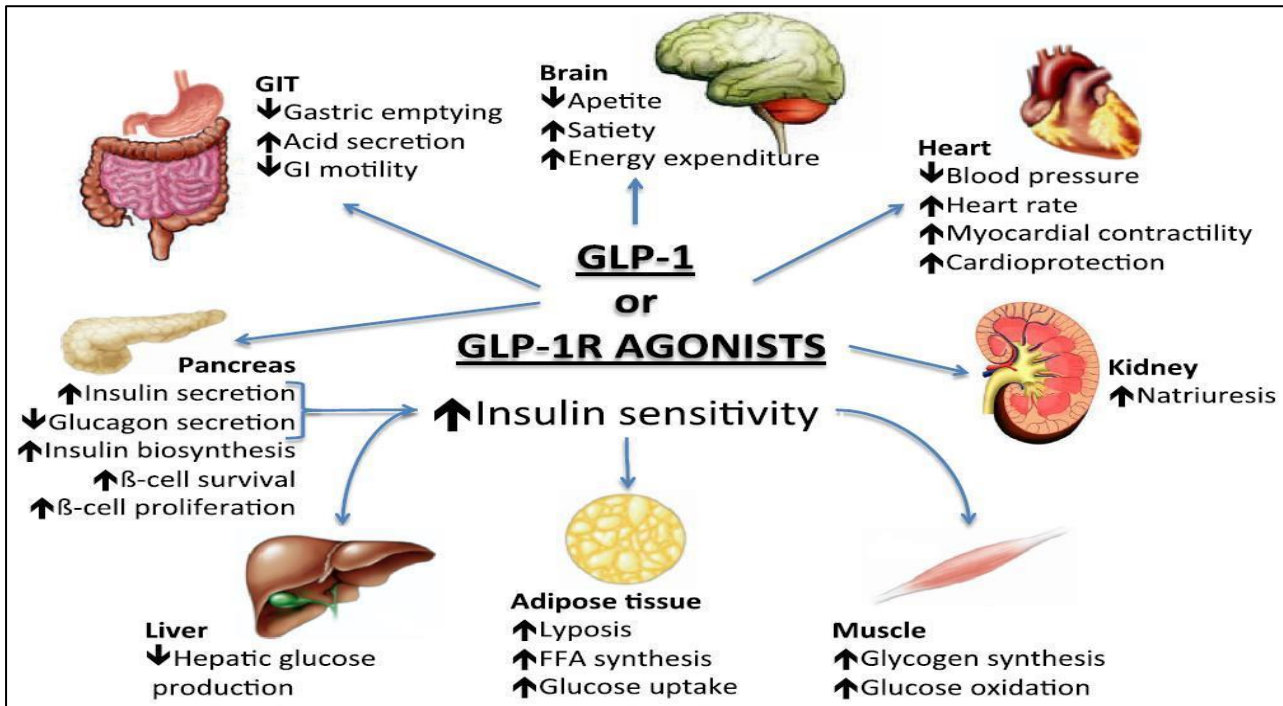
Παράλληλα με τη διέγερση έκκρισης ινσουλίνης, το GLP-1 καταστέλλει την έκκριση γλυκαγόνης από τα α-κύτταρα με αποτέλεσμα την καταστολή της ενδογενούς παραγωγής γλυκόζης συμβάλλοντας έτσι στην ευγλυκαιμία ρυθμίζοντας τόσο τη γλυκόζη νηστείας όσο και τη μεταγευματική. Αντίθετα, σε καταστάσεις υπογλυκαιμίας, δεν επηρεάζει την έκκριση γλυκαγόνης, η οποία είναι επιθυμητή για την αποκατάσταση φυσιολογικών επιπέδων γλυκόζης.

### 2.3.4. ΡΥΘΜΙΣΗ ΜΑΖΑΣ Β-ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το GLP-1, δρώντας μέσω του υποδοχέα του στα β-κύτταρα, φαίνεται να ασκεί θετική ρύθμιση στη διατήρηση και αύξηση της μάζας των β-κυττάρων με δύο τρόπους, ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλοντας την απόπτωση τους, μέσω της οδού σηματοδότησης του Pdx1 και του IRS-2 (insulin receptor substrate) . Η εξενδίνη-4, ένα από τα GLP-1 ανάλογα, διεγείρει τη διαφοροποίηση και αναστέλλει την απόπτωση των β-κυττάρων ποντικών άγριου τύπου, αλλά μόνο σε αυτά που είναι ενεργοποιημένος ο Pdx1[29]. Η διατήρηση και αύξηση της μάζας των β-κυττάρων συμβάλλει στη μακροχρόνια γλυκαιμική ρύθμιση.

### 2.3.5 ΛΟΙΠΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗ ΓΛΥΚΑΙΜΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ

Το GLP-1 επιδρά στον στομάχο καθυστερώντας την κένωσή του. Επιπλέον, προωθεί την πρόσληψη γλυκόζης από το μυϊκό και λιπώδη ιστό μέσω νευρικών μηχανισμών[30]. Όλες οι παραπάνω δράσεις συμβάλλουν περαιτέρω στη γλυκαιμική ρύθμιση. Οι πολλαπλές δράσεις του GLP-1 στη ρύθμιση της γλυκόζης συνοψίζονται την εικόνα 6.

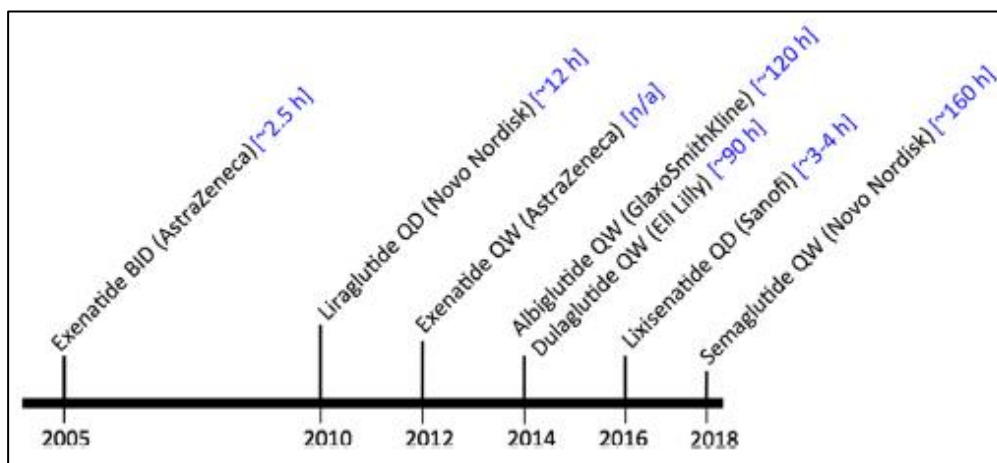


Εικόνα 6: ο μηχανισμός δράσης του GLP-1 στη ρύθμιση της γλυκόζης σε ποικίλα συστήματα

## 2.4 GLP-1 ΑΝΑΛΟΓΑ

### 2.4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η ανακάλυψη του ρόλου του GLP-1 στη φυσιολογία της ομοιοστασίας της γλυκόζης, οδήγησε σε μια έντονη προσπάθεια της επιστημονικής κοινότητας για ανάπτυξη GLP-1 αγωνιστών για χρήση σε ασθενείς με ΣΔ2. Όπως φαίνεται και στη εικόνα 7, οι προσπάθειες στέφθηκαν με επιτυχία και τα GLP-1 ανάλογα επέφεραν επανάσταση στη γλυκαιμική ρύθμιση και τη φυσική πορεία του ΣΔ2. Επιπλέον, η συστηματική και μαζική χορήγηση τους σε συνδυασμό με την ύπαρξη GLP-1 υποδοχέων σε πολλαπλούς ιστούς του ανθρώπου, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ασκούν ωφέλιμη δράση σε πολλαπλά συστήματα, ανεξαρτήτως της γλυκαιμικής ρύθμισης. Πράγματι, στις ημέρες μας, πλην του ΣΔ2, ορισμένα έχουν λάβει έγκριση για την αντιμετώπιση της στεατοηπατίτιδας και της παχυσαρκίας. Θα ακολουθήσει συνοπτική περιγραφή των χαρακτηριστικών της λιραγλουτίδης, σαν αντιπροσωπευτικό μέγρο της ομάδας των GLP-1 αναλόγων, αφού είναι το κύριο μέγρο που χρησιμοποιείται στα προς ανασκόπηση άρθρα.



Εικόνα 7: χρονολογική σειρά ανακάλυψης GLP-1 αναλόγων

#### **2.4.2 ΛΙΡΑΓΛΟΥΤΙΔΗ**

Η λιραγλουτίδη είναι ανάλογο του ανθρώπινου GLP-1 και έχει λάβει έγκριση για τη θεραπεία του ΣΔ2, ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με δισκία και ινσουλίνη. Συγκαταλέγεται στα μακράς δράσης ανάλογα GLP-1 (μη γευματικά). Παρασκευάζεται με χρήση της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA και έχει μοριακό βάρος 3751[31]. Έχει 97%, ομολογία αλληλουχίας με το ανθρώπινο GLP-1, διαφέροντας αφενός στην ακετυλίωση της λυσίνης στη θέση 26 και αφετέρου στην θέση 34, όπου το αμινοξύ λυσίνη αντικαθίσταται από αργίνη (single lysine-to-arginine), τροποποιήσεις που την καθιστούν ανθεκτική στη διάσπαση από το ένζυμο DPP-4. Παρουσιάζει αργή απορρόφηση από τον υποδόριο ιστό και εμφανίζει χρόνο ημίσειας ζωής περί τις 13 ώρες. Έχει πολύ χαμηλή ανοσογονικότητα, πιθανά εξαιτίας της υψηλής ομολογίας της με το ανθρώπινο GLP-1. Οι δόσεις χορήγησης στο ΣΔ2 είναι 0,6, 1,2, 1,8 mg.

#### **ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ**

Η λιραγλουτίδη χορηγείται υποδορίως μία φορά ημερησίως. Το προφίλ μακράς διάρκειας δράσης βασίζεται σε τρεις μηχανισμούς: τη σύνδεση των μορίων μεταξύ τους με αποτέλεσμα την αργή απορρόφηση, την πρόσδεση στη λευκωματίνη και την υψηλότερη αντίσταση στη διάσπαση από τα ένζυμα διπεπτιδυλική πεπτιδάση IV (DPP-4) και ουδέτερη ενδοπεπτιδάση (NEP). Τα παραπάνω της προσδίδουν μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής στο πλάσμα.

#### **ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ**

Η λιραγλουτίδη επιδεικνύει μεγάλη αποτελεσματικότητα στη αντιμετώπιση της υπεργλυκαιμίας και τη μείωση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης, περίπου 1,1%

ως μονοθεραπεία και έως 1,5% σε συνδυασμό με άλλα αντιδιαβητικά δισκία, σύμφωνα με τη μελέτη LEAD-1 [32].

Η μεγάλη της αποτελεσματικότητα οφείλεται στην εμπλοκή της σε πολλαπλά σημεία της γλυκαιμικής ρύθμισης (εικόνα 6). Ειδικότερα, προκαλεί την έκκριση ινσουλίνης και ταυτόχρονα καταστέλλει την απρόσφορα υψηλή έκκριση γλυκαγόνης και τα δύο με γλυκοζοεξαρτώμενο τρόπο. Κατά συνέπεια,

όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι

υψηλά, προκαλείται έκκριση ινσουλίνης και καταστέλλεται η έκκριση γλυκαγόνης.

Αντιστρόφως, κατά την υπογλυκαιμία η λιραγλουτίδη μειώνει την έκκριση ινσουλίνης αλλά δεν επηρεάζει την έκκριση γλυκαγόνης.

Στο μηχανισμό μείωσης των επιπέδων

γλυκαιμίας συμμετέχει επίσης η προκαλούμενη καθυστέρηση της γαστρικής κένωσης καθώς

και ανορεξική δράση της στο ΚΝΣ. Τέλος, η σημαντική επίδρασή της στο σωματικό βάρος βελτιώνει τη γλυκαιμική ρύθμιση (εικόνα 8).

| Τρόπος χορήγησης                                          | Υποδόρια ένεση              |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Αύξηση GLP-1                                              | 24ωρη                       |
| Μείωση HbA <sub>1c</sub>                                  | 0,8–1,8%                    |
| Μεταβολή βάρους                                           | 3–5 kg                      |
| Υπογλυκαιμία                                              | Όχι συχνά                   |
| Ναυτία                                                    | Συχνά                       |
| Διατήρηση ρυθμιστικής δράσης γλυκαγόνης στην υπογλυκαιμία | Ναι                         |
| Καθυστέρηση της γαστρικής κένωσης                         | Ναι                         |
| Σχηματισμός αντισωμάτων                                   | Ναι (χωρίς κλινική σημασία) |

**Εικόνα 8: συνοπτική παρουσίαση υπογλυκαιμικών δράσεων λιραγλουτίδης**

## ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ

Η λιραγλουτίδη σε δόσεις 0.6, 1.2, 1.8mg ενδείκνυται για τη θεραπεία ενηλίκων, εφήβων και παιδιών ηλικίας 10 ετών και άνω με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 που δεν ελέγχεται επαρκώς σε συνδυασμό με δίαιτα και άσκηση ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με άλλα φαρμακευτικά προϊόντα για τη θεραπεία του διαβήτη. Ενδείκνυται επιπλέον στους ασθενείς με ΣΔ2 και συνύπαρξη στεατοηπατίτιδας (NASH).

Στη δόση των 3 mg ενδείκνυται για χρήση σε ενήλικες και εφήβους άνω των 12 ετών ως συμπληρωματική αγωγή σε μια δίαιτα χαμηλών θερμίδων και σε αυξημένη σωματική δραστηριότητα με σκοπό τη διαχείριση του βάρους αναλόγως του Δείκτη Μάζας Σώματος (BMI). Η θεραπεία θα πρέπει να διακόπτεται ύστερα από 12 εβδομάδες στη δόση των 3,0 mg/ημέρα εάν οι ασθενείς δεν έχουν χάσει τουλάχιστον 5% του αρχικού σωματικού βάρους τους[33].

## **.ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ**

Οι πλέον συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες που αναφέρονται είναι οι διαταραχές του γαστρεντερικού: η ναυτία και η διάρροια ήταν πολύ συχνές, ενώ ο έμετος, η δυσκοιλιότητα, το κοιλιακό άλγος και η δυσπεψία ήταν συχνές. Κατά την έναρξη της αγωγής, αυτές οι διαταραχές του γαστρεντερικού μπορεί να εμφανιστούν πιο συχνά. Οι ανεπιθύμητες αυτές ενέργειες συνήθως εξασθενούν μέσα σε λίγες ημέρες ή εβδομάδες κατά τη συνέχιση της θεραπείας. Η κεφαλαλγία και η ρινοφαρυγγίτιδα ήταν επίσης συχνές. Επιπροσθέτως, η υπογλυκαιμία είναι πολύ σπάνιο φαινόμενο κυρίως όταν η λιραγλουτίδη χορηγήθηκε σε συνδυασμό με σουλφονουλουρία.

## **2.5 ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ GLP-1**

### **2.5.1 ΝΕΦΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ**

Πρόσφατα, οι θεραπείες με ανάλογα GLP-1 έχουν συνδεθεί με νεφροπροστατευτικές ιδιότητες. Σε ζωικά μοντέλα, η χορήγηση GLP-1 αγωνιστή φάνηκε να μειώνει τη συστηματική υπέρταση και την αλβουμινουρία και να βελτιώνει τη νεφρική βλάβη, όπως φάνηκε από νεφρικές βιοψίες [34]. Σε κλινικές μελέτες αλλά και την κλινική πράξη πια, οι GLP-1 αγωνιστές προκύπτει να μειώνουν τις πιθανότητες ανάπτυξης και εξέλιξης της διαβητικής νεφροπάθειας αλλά και το βαθμό αλβουμινουρίας στους

διαβητικούς ασθενείς[35,36]. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν νεφροπροστατευτική δράση με μηχανισμούς που πλην του γλυκαιμικού ελέγχου πιθανά περιλαμβάνουν την απώλεια σωματικού βάρους, τη μείωση της αρτηριακής πίεσης και της αλβουμινουρίας, τη βελτίωση των αιμοδυναμικών παραμέτρων των νεφρικών αγγείων και του λιπιδαιμικού προφίλ.

### 2.5.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ NASH

Η NAFLD και η NASH είναι στενά συνδεδεμένες νοσολογικές οντότητες με την αντίσταση στην ινσουλίνη και ως εκ τούτου με το ΣΔ2, την παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο. Η χρήση των αγωνιστών GLP-1, συνδέθηκε με την πτώση των τρανσαμινασών σε ασθενείς που έπασχαν ταυτόχρονα από ΣΔ2 και NASH. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν από τη μελέτη LEAN[37] που αποτέλεσε την πρώτη διπλή τυφλή μελέτη που μελετήθηκε η χορήγηση λιραγλουτίδης σε διαβητικούς και μη ασθενείς πάσχοντες από τεκμηριωμένη με βιοψία NASH. Πράγματι, τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ιστολογική ύφεση της φλεγμονής (στεατοηπατίτιδας) και απουσία προόδου του σταδίου της ίνωσης με ταυτόχρονη βελτίωση της ηπατικής βιοχημείας.

### 2.5.3 ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΟΦΕΛΟΣ

Η μακροχρόνια χορήγηση αγωνιστών GLP-1 συνδέεται με ευεργετικά αποτελέσματα στην αθηροσκληρυντική και στεφανιαία νόσο. Επίσης, σε ζωικά μοντέλα, η χορήγηση GLP-1, φάνηκε να μειώνει την έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου και να βελτιώνει τη μετεμφραγματική καρδιακή λειτουργία.

Σταθμό στη συστηματοποίηση των παραπάνω δεδομένων αποτέλεσε η μελέτη LEADER [38] που περιέλαβε χορήγηση λιραγλουτίδης σε ασθενείς με μη επαρκώς ελεγχόμενο διαβήτη τύπου 2 ( μέσο όρο HbA1c=8,7%) με τη συντριπτική πλειοψηφία αυτών να έχει ήδη εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο. Η λιραγλουτίδη μείωσε σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισης μειζόνων ανεπιθύμητων καρδιαγγειακών

επεισοδίων , δηλαδή θάνατο από καρδιαγγειακά αίτια, μη θανατηφόρο έμφραγμα μυοκαρδίου ή μη θανατηφόρο εγκεφαλικό επεισόδιο.

#### **2.5.4 ΑΠΩΛΕΙΑ ΒΑΡΟΥΣ**

Η λιραγλουτίδη προκαλεί σημαντική απώλεια βάρους, έως και 10% του αρχικού εντός του πρώτου έτους χορήγησής της, γνώση που προήλθε από τα αποτελέσματα των μελετών SCALE-1 και SCALE-2[39].

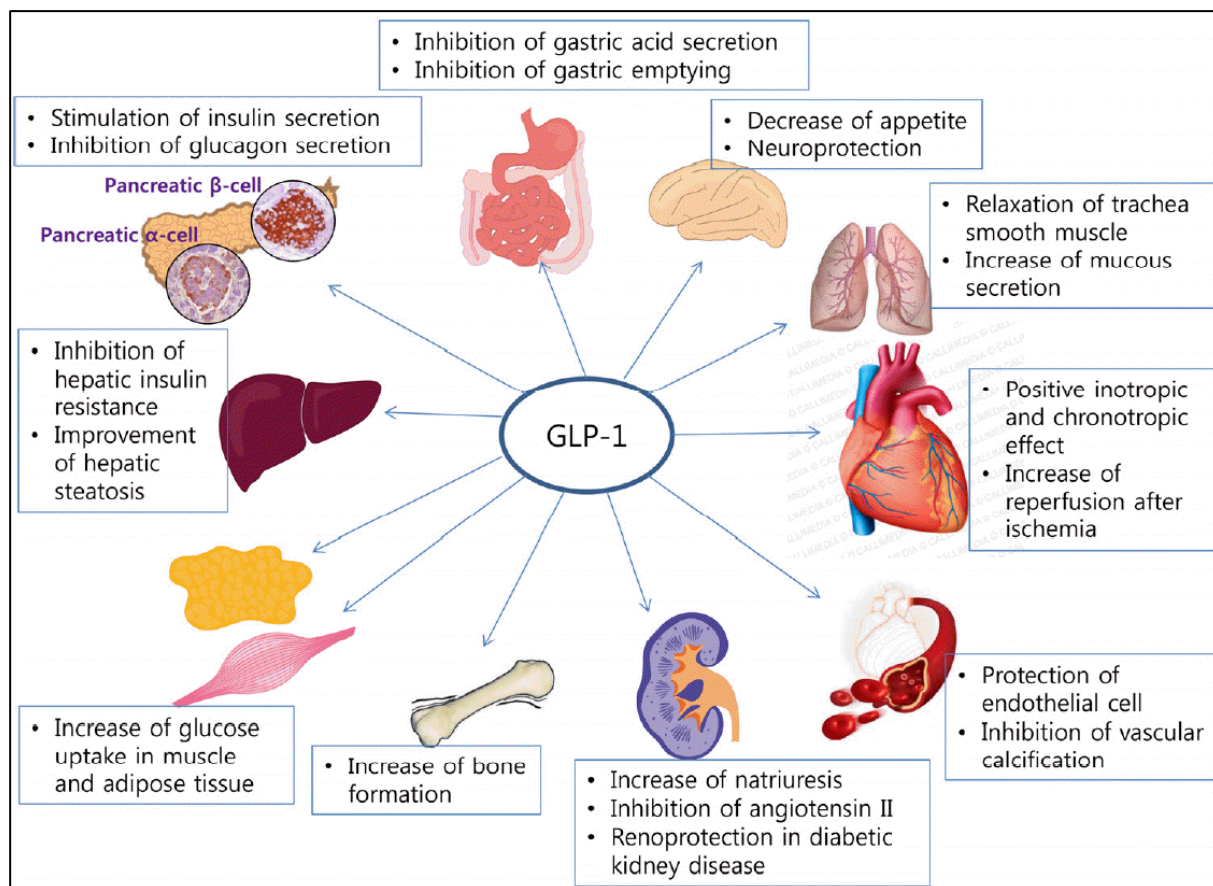
#### **2.5.5 ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ**

Τα GLP-1 ανάλογα, μέσω της σύνδεσης τους με τον GLP-1R στο ΚΝΣ, ασκούν νευροπροστατευτική δράση. Ειδικότερα, διαπιστώθηκε ότι αναστέλλουν την απόπτωση των κυττάρων του ιπποθαλάμου σε κυτταροκαλλιέργειες[40], αφού προκαλώντας αύξηση του ενδοκυτταρίου c AMP , οδηγούν τελικά σε ενεργοποίηση των PI3-κινασών και της PKA.

Πρόσφατες μελέτες, αποκαλύπτουν ευεργετική επίδραση της λιραγλουτίδης σε νευρολογικές νόσου, όπως νόσος Huntington, νόσος Alzheimer και νόσος Parkinson.

#### **2.5.6 ΛΟΙΠΕΣ ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ**

Η θεραπεία με λιραγλουτίδη φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα συστολικής και διαστολικής πίεσης, να μειώνει σημαντικά τη βαρύτητα της αποφρακτικής άπνοιας ύπνου και να προάγει το μεταβολισμό των οστών (εικόνα 9).



Εικόνα 9: πλειοτροπικές δράσεις GLP-1 αγωνιστών, Korean Journal of Medicine, 2017

## 2.6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ GLP-1

### 2.6.1 ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑ

#### Νόσος ALZHEIMER

Η νόσος Alzheimer χαρακτηρίζεται από νευροεκφύλιση των χολινεργικών νευρώνων του ιπποκάμπου, ενώ φαίνεται να συμμετέχει μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης από αυτά τα κύτταρα. Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι η χορήγηση λιραγλουτίδης ανέστειλε την επαγόμενη από το  $\beta$ -αμυλοειδές απώλεια μαθησιακής ικανότητας και μνήμης[41]. Πολλές μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη που αφορούν τη χορήγηση GLP-1 αγωνιστή σε άτομα υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη νόσου Alzheimer.

#### PARKINSON

Η νόσος Parkinson χαρακτηρίζεται από εκφύλιση ντοπαμινεργικών νευρώνων. Ελπιδοφόρα είναι τα αποτελέσματα της χορήγησης GLP-1 αναλόγων στα πλαίσια κλινικών μελετών, αφού φαίνεται ότι βελτιώνουν τα κλινικά συμπτώματα και κυρίως τις κινητικές διανοητικές διαταραχές[42].

## **HUNTINGTON**

Η νόσος Huntington χαρακτηρίζεται από σοβαρή νευροεκφύλιση λόγω μετάλλαξης της πρωτεΐνης HTT που οδηγεί σε αύξηση του οξειδωτικού stress και ελάττωση της αυτοφαγίας με αποτέλεσμα συσσώρευση της HHT. Παράλληλα, η παρατήρηση ότι η επίπτωση του ΣΔ2 είναι αυξημένη σε ασθενείς με νόσος Huntington, οδήγησε στην υπόθεση ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη πιθανά να συνδέεται αιτιολογικά. Η επώαση των συγκεκριμένων νευρώνων με λιραγλουτίδη, φάνηκε να μειώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη, να επάγει την αυτοφαγία και να αυξάνει την επιβίωση των νευρώνων[43]. Οι παραπάνω παρατηρήσεις δημιουργούν ελπίδα σχετικά με τη χρήση των GLP-1 αναλόγων στη κλινική πράξη.

### **2.6.2 ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ**

Υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία ότι οι GLP-1 αγωνιστές μπορούν να προκαλέσουν μείωση του πολλαπλασιασμού και αύξηση της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα μαστού[44], παγκρέατος[45] και προστάτη[46].

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ**

### **3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Στην παρούσα εργασία μελετώνται οι GLP-1 αγωνιστές ως προς την ικανότητά τους να παρεμβαίνουν σε κυτταρικές λειτουργίες που συνδέονται με την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των καρκινικών ηπατοκυττάρων. Συνεπώς, στο παρόν κεφάλαιο επιχειρείται μια συνοπτική παρουσίαση των βασικών όρων, διαδικασιών και μοριακών μηχανισμών της κυτταρικής βιολογίας, που εμπεριέχονται στη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου, εστιασμένη στους όρους και τις έννοιες που χρησιμοποιούνται στις ερευνητικές εργασίες που θα ανασκοπηθούν στο ειδικό μέρος της εργασίας. Η αποσπασματικότητα των όποιων χωρίων, οφείλεται στην πρόθεση των συγγραφέων να μην κουράσουν τον αναγνώστη με το βάθος της γνώσης που έχει αποκτηθεί σήμερα για το θέμα, αλλά να εστιάσουν την προσοχή σε απαραίτητες έννοιες για την καλύτερη κατανόηση του ειδικού μέρους. Τέλος, όπου είναι δυνατόν, επιχειρείται να παρατεθεί η γνώση από τη δράση των GLP-1 αγωνιστών επί αυτών των διαδικασιών, πράγμα που δίνει το θεωρητικό υπόβαθρο το γιατί μελετήθηκαν οι συγκεκριμένες διαδικασίες και μόρια στο ειδικό μέρος.

### **3.2 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ**

Ο κυτταρικός θάνατος είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα βιολογικό κύτταρο σταματά να εκτελεί τις διεργασίες που είναι απαραίτητες για τη διαβίωση του. Μπορεί να είναι αποτέλεσμα της φυσιολογικής διαδικασίας κατά την οποία τα κύτταρα γηράσκουν και αντικαθίστανται από καινούρια. Σε αυτήν τη περίπτωση ονομάζεται προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (programmed cell death, PCD) και περιλαμβάνει την απόπτωση (apoptosis), τη γήρανση (senescence) και την αυτοφαγία (autophagy). Εναλλακτικά, ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να επέρχεται από κάποια ασθένεια, τραυματισμό ή το θάνατο του οργανισμού στον

οποίο ανήκει και ονομάζεται νέκρωση ή αλλιώς μη προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (unprogrammed cell death, UCD).

### 3.2.1 ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Η **απόπτωση** είναι μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, μη αντιστρεπτή, ενεργητική (ATP-εξαρτώμενη) και στενά ρυθμιζόμενη, ενίοτε αναφέρεται και ως “κυτταρική αυτοκτονία”, με την οποία οι πολυκύτταροι οργανισμοί εξαλείφουν τα γηρασμένα, κατεστραμμένα ή μολυσμένα κύτταρα διατηρώντας έτσι υπό μια έννοια τον υπόλοιπο ιστό υγιή. Έχει ζωτική σημασία στη φυσιολογική ανάπτυξη, την ομοιοστάση των ιστών, την άμυνα εναντίον παθογόνων μικροοργανισμών και την αποτροπή της καρκινογένεσης.

Χαρακτηρίζεται από διακριτές βιοχημικές και μορφολογικές αλλοιώσεις, όπως την ταχεία δημιουργία μαλακής προσεκβολής της πλασματικής μεμβράνης χωρίς την απώλεια της ακεραιότητας της, τη διάλυση του πυρηνίσκου και του κυτταροσκελετού, την εκτεταμένη καταστροφή της χρωματίνης, την κατάτμηση του DNA, τη συμπύκνωση του πυρήνα, την απώλεια της μιτοχονδριακής λειτουργίας και τη συρρίκνωση του κυττάρου. Η κυτταρική μεμβράνη παρουσιάζει ανώμαλα εξογκώματα. Το κύτταρο διασπάται σε πολλά κυστίδια που ονομάζονται αποπτωτικά σώματα, τα οποία στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται. Δεν εμφανίζεται φλεγμονώδης αντίδραση, σε αντίθεση με τη νέκρωση.

Η απόπτωση επιτελείται σε 3 διαδοχικά στάδια. Κατά το πρώτο γίνεται ο προγραμματισμός σε θάνατο από εξωκυττάρια ή ενδοκυττάρια σήματα (ιοί, ακτινοβολία και αδυναμία επιδιόρθωσης του DNA). Στη συνέχεια, ολοκληρώνεται

η διαδικασία μέσω της ενεργοποίησης κασπασών και τέλος επέρχεται η απομάκρυνση και πέψη των διαλυμένων κυττάρων από τα μακροφάγα μέσω φαγοκυττάρωσης (εικόνα 10).

## ΠΡΟΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ-ΚΑΣΠΑΣΕΣ

Δύο θεωρίες σχετικά με την άμεση εκκίνηση των αποπτωτικών μηχανισμών στα θηλαστικά έχουν προταθεί: η προκαλούμενη από τον TNF-α (παράγοντας νέκρωσης όγκων) απόπτωση και το μοντέλο σύνδεσης Fas-συνδέτη Fas. Και τα δύο μοντέλα περιλαμβάνουν σύνδεση εξωγενών σημάτων με τους υποδοχείς TNF (TNFR). Μετά την ενεργοποίηση των TNF-R1 και Fas στα κύτταρα των θηλαστικών, ενεργοποιούνται οι προαποπτωτικοί παράγοντες (Bax, Bak, Bcl-2, κυτόχρωμα c) .

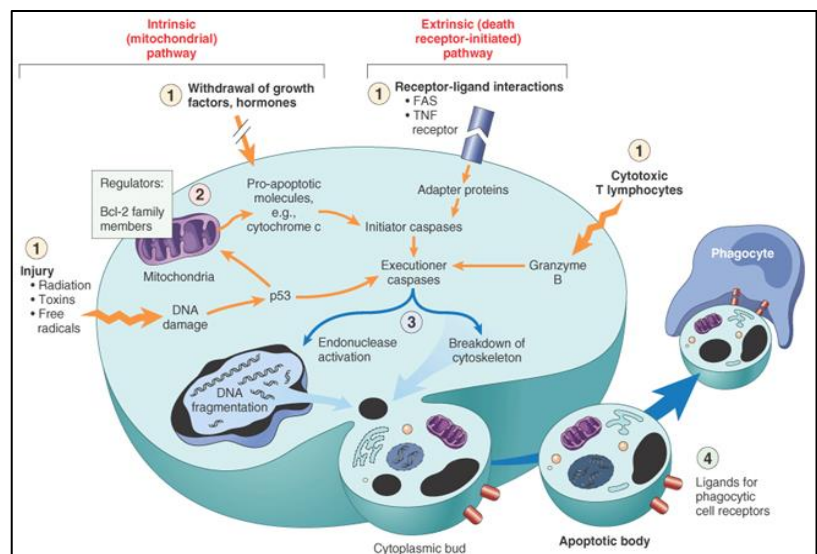
Κύριο συστατικό του

αποπτωτικού μηχανισμού

στα θηλαστικά είναι η

οικογένεια πρωτεασών που ονομάζονται κασπάσες[47].

Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν σε μια αλυσιδωτή αντίδραση που πυροδοτείται από προαποπτωτικά σήματα και



οδηγεί στην κατάτμηση του **Εικόνα 8: ο ρόλος των κασπασών στην απόπτωση του κυττάρου**

DNA και τη διάλυση του κυττάρου. Δρουν είτε ως εναρκτές(initiators) είτε ως τελεστές( executioners)(εικόνα 10).

## ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΗΣ JNK ΚΙΝΑΣΗΣ

Η JNK κινάση είναι από τα πιο σημαντικά ενδιάμεσα σηματοδοτικά μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK (mitogen-activated protein kinase) κινασών. Ελέγχει ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού, της εμβρυονικής ανάπτυξης και της απόπτωσης. Γενικά, θεωρείται σηματοδοτικό μονοπάτι κυτταρικού θανάτου, αφού ελέγχει την κυτταρική απάντηση απέναντι σε επιβλαβείς παράγοντες, όπως φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, υπεριώδης ακτινοβολία, γ-ακτινοβολία, υπό την επίδραση των οποίων προκαλούνται βλάβες και μεταλλάξεις του DNA. Αν η επιδιόρθωση δεν καταστεί επιτυχής, ενεργοποιούνται σηματοδοτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένου και του JNK, ώστε το κύτταρο να οδηγηθεί σε απόπτωση. Σε αυτό το πλαίσιο, ο JNK επιδρά σε δυο μηχανισμούς: ενεργοποιεί τα αποπτωτικά σηματοδοτικά μόρια θανάτου (c-Jun, Fos, BIM, BAD, BAX protein or active P53) και καταστέλλει αυτά της κυτταρικής επιβίωσης (STATs και CREB).

Το μονοπάτι αυτό εμπλέκεται και στην καρκινογένεση, αφού έχει παρατηρηθεί αύξηση στα επίπεδα της JNK πρωτεΐνης σε ποικίλα καρκινικά κύτταρα. Ο ρόλος του στην ηπατοκαρκινογένεση είναι υπαρκτός και διττός. Από τη μία συντηρεί το μικροφλεγμονώδες περιβάλλον, προωθώντας την ανάπτυξη του ΗΚΚ, και από την άλλη μέσω επαγωγής της απόπτωσης των ηπατοκυττάρων συντελεί στη μείωση εμφάνισης του. Δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος ο ρόλος του[48].

### 3.2.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ (SENESCENSE)

Η κυτταρική γήρανση περιγράφει μια μη αναστρέψιμη διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και καθήλωση του στο στάδιο G1 με ταυτόχρονη διατήρηση της λειτουργίας του.

Το 1961, οι Hayflick και Moorhea περιέγραψαν το φαινόμενο κατά το οποίο οι ινοβλάστες παρουσίασαν πεπερασμένο αριθμό κυτταρικών αναδιπλασιασμών σε

κυτταροκαλλιέργειες (περίπου 50) , πέραν των οποίων και χωρίς την επίδραση κάποιου εξωτερικού ή βλαπτικού παράγοντα, το κύτταρο καθελωνόταν στη φάση G1 μόνιμα. Αυτό το φαινόμενο περιγράφηκε ως φυσιολογική γήρανση των κυττάρων.

Η σμίκρυνση των τελομεριδίων, οι βλάβες στο DNA και το οξειδωτικό stress, αλλοιώσεις δηλαδή που συσσωρεύονται με την αύξηση της ηλικίας του κυττάρου αποτελούν τους πιο καθοριστικούς παράγοντες που οδηγούν στο γηρασμό [49], μέσω της ενεργοποίησης των εξής σηματοδοτικών μονοπατιών: του p53 και του pRB (πρωτεΐνη ρετινοβλατώματος).

Μορφολογικά, τα γηράσκοντα κύτταρα είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος και μπορεί να λαμβάνουν πολυγωνικό σχήμα.

Ο TGF- $\beta$  βρέθηκε να είναι η κύρια κυτταροκίνη που έχει την ικανότητα να επάγει μαζικά γήρανση σε σειρές κυττάρων ηπατώματος[50].

### 3.2.3 ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

Το 2016, ο Ιάπωνας βιολόγος, Γιοσινόρι Οχσούμι, τιμήθηκε με το Νόμπελ Ιατρικής και Φυσιολογίας, λόγω των ανακαλύψεων που έκανε πάνω στη διαδικασία της αυτοφαγίας. Είναι η διαδικασία κατά την οποία συστατικά του κυττάρου που έχουν υποστεί βλάβη οδηγούνται στα λυσοσώματά του προς αποδόμηση. Αυτή η καθολική διαδικασία εντάσσεται στα πλαίσια των κυτταρικών μηχανισμών διόρθωσης ώστε να εξαλείφονται τα κατεστραμμένα οργανίδια, τα ενδοκυττάρια παθογόνα, το περιττό μέρος του πλάσματος καθώς και οι γερασμένες, ανώμαλες και κακώς διαταγμένες πρωτεΐνες.

Έχουν περιγραφεί 3 τύποι αυτοφαγίας, με τον πιο καλά περιγεγραμμένο να είναι αυτός της μακροαυτοφαγίας κατά την οποία μέρη του κυτοσολίου αλλά και ολόκληρα οργανίδια ενσωματώνονται στα αυτοφαγωσώματα, δομές διπλής μεμβράνης (AV-I).

Μετά τη σύντηξη τους με το λυσόσωμα, τα αυτοφαγώματα σχηματίζουν δομή μονής μεμβράνης που ονομάζεται αυτολυσόσωμα (AV-II).

Η ρύθμιση του σχηματισμού του αυτοφαγώματος είναι περίπλοκη. Ο σημαντικότερος αναστολέας του είναι η πρωτεΐνη mTOR (mammalian target of rapamycin), η οποία φυσιολογικά εμποδίζει το σχηματισμό αυτοφαγώματος, καταστέλλοντας την αυτοφαγία. Εν αντιθέσει, η αναστολή του (με κύριο εκπρόσωπο τη ραπαμυκίνη) πυροδοτεί την μακροαυτοφαγία.

## **ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑΣ ΣΤΗ ΝΕΟΠΛΑΣΙΑ**

Ο ρόλος της αυτοφαγίας στον καρκίνο δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος, αλλά φαίνεται να είναι διπτός, ταυτόχρονα προκαρκινικός και αντικαρκινικός[51]. Ειδικότερα, υπάρχουν ενδείξεις ότι η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας αναστέλλει την εξέλιξη των προκαρκινικών αλλοιώσεων, όπως οι δυσπλαστικοί όζοι επί κίρρωσης, προς καρκίνο. Αντιστρόφως, σε προχωρημένη νεοπλασία, η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας “ανακουφίζει” τον όγκο από το οξειδωτικό stress, επιτρέποντας στα κύτταρά του, ιδιαίτερα σε αυτά που υποαρδεύονται, να επιβιώσουν. Επιπλέον, η επαγόμενη από το οξειδωτικό stress αυτοφαγία στον όγκο φαίνεται να οδηγεί σε αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά μέσα και συνεπώς στην επανανάπτυξη και εξέλιξη του [52].

## **3.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΝΕΚΡΩΣΗ Ή ΜΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ**

### **3.3.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ**

Δραστηριοποιείται στην πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια σε κάθε εισβολέα, κινητοποιεί φαγοκυτταρικούς μηχανισμούς και ενεργοποιεί το συμπλήρωμα, χωρίς να απαιτείται προηγούμενη έκθεση στον εισβολέα. Επιπρόσθετα παρέχει τη βιολογική πληροφορία δηλαδή το «σήμα κινδύνου» ώστε η επίκτητη ανοσία να αναπτύξει απόκριση

προσαρμοσμένη πλέον ειδικά στο αντιγόνο. Τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας πυροδοτούν ενδοκυττάριας οδούς σηματοδότησης, που οδηγούν στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων (NFκB, AP1) με αποτέλεσμα την παραγωγή των μεσολαβητών της φλεγμονής, την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων και την κινητοποίηση της ειδικής ανοσιακής απόκρισης.

Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK κύτταρα) αποτελούν μια ιδιαίτερη κατηγορία κυττάρων της φυσικής ανοσίας που δεν είναι ούτε T, ούτε B λεμφοκύτταρα και φαινοτυπικά ορίζονται ως CD3<sup>-</sup> /CD56<sup>+</sup> μεγάλα λεμφοκύτταρα. Ανευρίσκονται σε ποσοστό 10% περίπου στο περιφερικό αίμα. Ο ρόλος τους είναι σημαντικός καθώς αναγνωρίζουν και εξουδετερώνουν μολυσμένα κύτταρα από ενδοκυττάρια παθογόνα και μεταλλαγμένα κύτταρα, δηλαδή προκαρκινικά ή καρκινικά. Η ενεργοποίησή τους καθορίζεται από την ισορροπία των υποδοχέων διέγερσης και αναστολής που διαθέτουν. Ανήκουν στην ομάδα των κυτταροτοξικών κυττάρων, η δράση τους όμως ασκείται μη-ειδικά, δηλαδή χωρίς προηγούμενη ευαισθητοποίηση σε αντιγόνο ή MHC περιορισμό. Ενεργοποιούνται από τα μακροφάγα μέσω της IL-12 και IL-15 και παράγουν και αυτά κυτταροκίνες, ιδιαίτερα IFNγ, η οποία προάγει τη βακτηριοκτόνο δράση των μακροφάγων. Η κυτταροτοξικότητα εκδηλώνεται κυρίως άμεσα, όπου η απελευθέρωση κοκκίων περφορίνης και κοκκοενζύμων οδηγεί στην λύση του κυττάρου στόχου. Συγκεκριμένα η περφορίνη εκκρινόμενη ανοίγει πόρους στη μεμβράνη του κυττάρου-στόχου διαμέσου των οποίων τα κοκκοένζυμα εισερχόμενα στο κύτταρο προκαλούν το θάνατό του με απόπτωση (αποδόμηση κυτταρικού DNA). Επιπλέον, τα NK κύτταρα φέρουν Fc υποδοχείς που συνδέουν IgG αντισώματα συνδεδεμένα με μικρόβια, μολυσμένα ή ακόμα νεοπλασματικά κύτταρα και εκδηλώνουν κυτταροτοξική δράση εξαρτώμενη από αντίσωμα (ADCC).

## **ΦΥΣΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ ΚΑΙ ΗΠΑΤΟΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ**

Η καταστολή της έκφρασης των MCH-1 στην πορεία της ηπατοκαρκινογένεσης και της ανάπτυξης ΗΚΚ προκαλεί άρση του ανασταλτικού σήματος στα ΝΚ κύτταρα με αποτέλεσμα ενεργοποίηση της κυτταροτοξικής τους δράση στα καρκινικά ηπατοκύτταρα. Στο ήπαρ δε, το ποσοστό των ΝΚ κυττάρων είναι πενταπλάσιο συγκρινόμενο με αυτό του πλάσματος ή του σπλήνα οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι τα ΝΚ κύτταρα παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην καταστολή της ηπατοκαρκινογένεσης[53].

### **ΡΟΛΟΣ JAK/STAT3**

Στο μικροπεριβάλλον του ΗΚΚ, το σηματοδοτικό μονοπάτι IL-6/STAT3 παίζει κεντρικό ρόλο στη συντήρηση της φλεγμονής του μικροπεριβάλλοντος[54] και ως εκ τούτου ευοδώνει την ανάπτυξή του, δηλαδή την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διεισδυτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων στους ιστούς[55]. Επιπλέον, διαδραματίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση του συστήματος φυσικής ανοσίας, συμπεριλαμβανομένων των ΝΚ κυττάρων, ειδικά στους καρκινοπαθείς, καταστέλλοντας την αντινεοπλασματική ανοσιακή απάντηση του οργανισμού απέναντι τον όγκο[56].

### **3.4 ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ**

Η εξέλιξη και η μεταστατική συμπεριφορά του ΗΚΚ καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από ελαττωματική και διαταραγμένη ρύθμιση αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους, με αποτέλεσμα να ενισχύονται οι μηχανισμοί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης και διήθησης. Μεταξύ αυτών, ο TGF- $\alpha$  (transforming growth factor) μαζί με τον υποδοχέα του EGFR (epidermal growth factor receptor), καθώς και ο HGF (hepatocyte growth factor) με τον μοναδικό του

υποδοχέα c-MET (mesenchymal-epithelial transition factor receptor) κατέχουν κεντρικό ρόλο στη μετανάστευσή του [57]. Αναφορικά με το μεταναστευτικό δυναμικό του ΗΚΚ, υπάρχουν αναφορές ότι ο TGF-α και ο HGF προάγουν τη μετανάστευση των ανθρώπινων κυττάρων ηπατώματος μέσω ενεργοποίησης των σηματοδοτικών οδών της οικογένειας των MAPK κινασών (p38 mitogen-activated protein kinase, MAPK), που με τη σειρά του ευοδώνουν σηματοδοτικά μόρια υπεύθυνα για την ανάπτυξη και μετάσταση [AKT, Rho-kinase και stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK)]. Πρόσφατα, η λιραγλουτίδη έδειξε ανασταλτική δράση επί της μετανάστευσης των κυττάρων ΗΚΚ in vivo, σε μοντέλο ποντικίου[58].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΟ ΗΚΚ

### 4.1 HEPG2 ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα HepG2 κύτταρα αποτελούν κυτταρική σειρά ανθρώπινων κυττάρων ηπατώματος. Προήλθε το 1975 από τον ηπατικό ιστό ενός δεκαπεντάχρονου άνδρα Καυκάσιας προέλευσης από την Αργεντινή που έπασχε από καλώς διαφοροποιημένο ΗΚΚ.

Τα κύτταρα αυτά έχουν μορφολογικά χαρακτηριστικά επιθηλίου, σταθερό φαινότυπο, περιέχουν 55 χρωμοσώματα, έχουν απεριόριστες δυνατότητες αναδιπλασιασμού, χωρίς να είναι μολυσμένα από αυστραλιανό αντιγόνο (αντιγόνο επιφανείας ηπατίτιδας Β, HBsAg) και έχουν την τάση να σχηματίζουν όγκο, όταν ενίονται σε ποντίκια. Εκκρίνουν μια ποικιλία σημαντικών πρωτεϊνών του πλάσματος, όπως αλβουμίνη, πρωτεΐνες οξείας φάσης, ινωδογόνο, α-2 μακροσφαιρίνη, α-1 αντιθρυψίνη, τρανσφερρίνη και πλασμινογόνο. Επίσης, απαντούν στη διέγερση από ανθρώπινες αυξητικές ορμόνες. Όμως, σε σχέση με τα φυσιολογικά ανθρώπινα ηπατοκύτταρα παρουσιάζουν περιορισμένες μεταβολικές λειτουργίες.

Τα HepG2 κύτταρα αναπτύσσονται εύκολα σε κυτταροκαλλιέργειες και συνεπώς είναι κατάλληλα για κατασκευή *in vitro* μοντέλων για τη μελέτη των ιδιοτήτων, των λειτουργιών αλλά και των παθολογικών καταστάσεων των ανθρώπινων διαφοροποιημένων ηπατοκυττάρων. Επιδεικνύουν υψηλή μορφολογική και λειτουργική διαφοροποίηση με διατήρηση της κορυφαίας και βασικοπλευρικής τους επιφάνειας (van IJzendoorn et al., 1997,2000,), ώστε προσομοιάζουν στα χολαγγειοκύτταρα και στα κύτταρα της ηπατικής κολποειδικής μεμβράνης *in vivo* αντιστοίχως.

Αυτή η μορφολογική και λειτουργική τους διαφοροποίηση *in vitro*, διευκολύνει την κατασκευή κατάλληλων μοντέλων ώστε να μελετηθούν *in vitro* σημαντικές παράμετροι των ηπατοκυττάρων όπως η ενδοκυττάρια σηματοδότηση, η λειτουργία

των χολαγγειοκυττάρων, οι πρωτεΐνες των κολποειδικών μεμβρανών και ο ενδοηπατικός μεταβολισμός των λιπιδίων[59]. Η απομόνωση τους αποτέλεσε ορόσημο για την μελέτη των ανθρώπινων νόσων του ήπατος που προκαλούνται από διαταραχή των πρωτεϊνών επιφανείας, όπως το Dubin-Johnson Syndrome, η προοδευτική οικογενής ενδοηπατική χολόσταση και η οικογενής υπερχοληστερολαιμία. Επιπλέον, τα HepG2 χρησιμοποιούνται σαν μοντέλο για τη μελέτη του ηπατικού μεταβολισμού, της τοξικότητας από ξενοβιοτικά, την ανίχνευση περιβαλλοντικών και διαιτητικών κυτταροτοξικών παραγόντων, πολλώ δε μάλλον για τη μελέτη ηπατοτοξικότητας φαρμάκων που πρόκειται να κυκλοφορήσουν. Σημαντική είναι η χρήση τους στη διαλεύκανση των μηχανισμών ηπατοκαρκινογένεσης και στις μελέτες αναφορικά με τις συσκευές υποκατάστασης της ηπατικής λειτουργίας.

#### **4.2 HCC-LM3 ΚΥΤΤΑΡΑ**

Η κυτταρική σειρά των HCCLM3 κυττάρων προήλθε από μεταστατικές μάζες πνεύμονα ποντικών στα οποία είχε αναπτυχθεί με τεχνητό τρόπο ΗΚΚ, μετά από έγχυση της μεταστατικής σειράς κυττάρων ηπατώματος MHCC97-H.

Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά έχει δειχθεί ότι διαθέτει υψηλή τάση μετάστασης στους πνεύμονες αλλά και σε άλλες εξωηπατικές εστίες, όταν τα κύτταρα ενεθούν υποδορίως σε ποντίκια που έχει αφαιρεθεί ο θύμος αδένας. Τα HCCLM3 έχουν υπερδιπλοειδικό καρυότυπο με 53 έως 58 χρωμοσώματα, τα οποία φέρουν ποικίλες μεταλλάξεις. Έχουν παρόμοιες χρήσεις με τα HepG2 και επιπλέον αποτελούν κύριο εργαλείο μελέτης του ιού της ηπατίτιδας C (HCV).

#### **4.3 Hepa 1-6 ΚΥΤΤΑΡΑ**

Αποτελεί σειρά κυττάρων ηπατώματος, προερχόμενα από το ποντίκι *Mus musculus*, που χρησιμοποιείται κυρίως για τη μελέτη των σηματοδοτικών μονοπατιών της ηπατοκαρκινογένεσης και των μεταβολικών νόσων του ήπατος.

#### 4.4 HuH7 ΚΥΤΤΑΡΑ

Πρόκειται για ηπατοκύτταρα που προέρχονται από άρρενα ασθενή με ΗΚΚ με προέλευση από τη Βόρειο ανατολική Ασία. Χρησιμοποιούνται *in vitro* για την κατασκευή μοντέλων μελέτης των νόσων του ήπατος.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΚΟΠΟΣ

#### 5.1 ΕΝΑΥΣΜΑ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η επίπτωση του ΗΚΚ στις μέρες μας αυξάνεται, κατατάσσοντας το στην 5<sup>η</sup> θέση σε συχνότητα εμφάνισης καρκίνου και στην 3<sup>η</sup> σε συχνότητα θανάτου από καρκίνο. Ιάσιμο θεωρείται μόνο το ΗΚΚ σταδίου 0 και 1 (κεφάλαιο 1.8.1) και παρά το πρόγραμμα επιτήρησης, το 60-70% των ασθενών διαγιγνώσκονται πέραν των αρχικών σταδίων, καθιστώντας αδύνατες τις θεραπείες ίασης και μειώνοντας δραματικά την επιβίωση (εικόνα 4). Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι υπάρχουσες φαρμακευτικές θεραπείες δεν προσφέρουν ίαση, αλλά παράταση επιβίωσης, η ανακάλυψη νέων αποτελεσματικών φαρμάκων γίνεται επιτακτική ανάγκη.

Η ευρεία χρήση των GLP-1 αγωνιστών και κυρίως της λιραγλουτίδης στη θεραπεία της υπεργλυκαιμίας σε ασθενείς με ΣΔ2, συνδέθηκε στην πορεία με πλειοτροπικά οφέλη σε ποικίλα συστήματα και νόσους, συμπεριλαμβανομένων της διαβητικής νεφροπάθειας, της στεατοηπατίτιδας, της απώλειας βάρους και της εγκεφαλικής λειτουργίας.. Από αυτά τα οφέλη ξεχωρίζουν η νεφροπροστασία και η ιστολογική ύφεση της ηπατικής φλεγμονής στη NASH.

Στα πλαίσια αυτών των κλινικών παρατηρήσεων αλλά και της βαθύτερης γνώσης του μηχανισμού δράσης των GLP-1 σε μοριακό επίπεδο, όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο 2, η λιραγλουτίδη βρέθηκε στο επίκεντρο της επιστημονικής έρευνας για την πιθανή αντικαρκινική της δράση. Πράγματι, μελέτες πολλών ερευνητικών ομάδων ανά τον κόσμο σε κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού, παγκρέατος, προστάτη, ήπατος[44,45,46] αναδεικνύουν δειλά-δειλά ενθαρρυντικά αποτελέσματα για τα την πιθανή αντικαρκινική δράση της λιραγλουτίδης ως αναφορά την καταστολή των μοριακών μονοπατιών της καρκινογένεσης, τη νέκρωση και

απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και την αναστολή του μεταστατικού δυναμικού τους.

## **5.2 ΚΕΝΑ ΠΟΥ ΕΠΙΧΕΙΡΕΙΤΑΙ ΝΑ ΚΑΛΥΦΘΟΥΝ**

Είναι πλέον γνωστό, ότι τόσο ο ΣΔ2, όσο και η NAFLD αποτελούν παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης ΗΚΚ και μάλιστα ευθύνονται για την αύξηση της επίπτωσης του παγκοσμίως. Τα GLP-1 ανάλογα αποτελούν πρώτης γραμμής θεραπεία για τα παραπάνω με εντυπωσιακά αποτελέσματα και υπάρχουν ενδείξεις ότι καταστέλλουν και την ηπατοκαρκινογένεση στα πλαίσια αυτών των νόσων. Δεν υπάρχουν, όμως μελέτες σε ανθρώπους που να περιγράφουν την επίδραση τους σε ασθενείς που αναπτύσσουν ΗΚΚ και συνεχίζουν να είναι υπό αγωγή με GLP-1 .

Επίσης, αν και δεν αντενδείκνυται η χρήση GLP-1 αγωνιστών σε διαβητικούς ή παχύσαρκους ασθενείς με ΗΚΚ, χωρίς σοβαρού βαθμού ηπατοπάθεια (Child Pugh score A και B), σύμφωνα με τα SPC τους, η χορήγησή τους είναι περιορισμένη, αφού αποτελούν ειδική ομάδα ασθενών. Συνεπώς, αν και υπάρχουν ενδείξεις από μελέτες σε πειραματόζωα, δεν έχει καταστεί δυνατόν να μελετηθεί η επίδραση των GLP-1 αγωνιστών στην εξέλιξη του ΗΚΚ στον ανθρώπινο οργανισμό.

## **5.3 ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Στα πλαίσια αυτά, ο πρωτεύον στόχος της παρούσας συστηματικής ανασκόπησης είναι να συγκεντρώσει και να αναδείξει τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τη επίδραση των GLP-1 αγωνιστών στην πορεία εξέλιξης του ΗΚΚ.

Ο δεύτερος στόχος, αν και φιλόδοξος, είναι να αποτελέσει έναυσμα για συναδέλφους που ασχολούνται με το σχετικό θέμα, αλλά και για ερευνητικά κέντρα, να ρίξουν περισσότερο φως στο θέμα μέσα από σχεδιασμό μελετών σε ανθρώπους, ώστε να διερευνηθεί εις βάθος η σχέση λιραγλουτιδης με το ΗΚΚ. Απώτερη ελπίδα μας είναι να προστεθεί στο εγγύς μέλλον άλλο ένα όπλο για την αντιμετώπιση του ΗΚΚ.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΕΘΟΔΟΣ

### 6.1 ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

Πραγματοποιήθηκε συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, με σκοπό την ανεύρεση σχετικών με το θέμα εργασιών. Αναζητήθηκαν όλα τα σχετικά άρθρα ανεξαρτήτου χρονολογίας δημοσίευσης, αλλά με δημοσιευμένη γλώσσα μόνο τα Αγγλικά. Οι βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι κάτωθι: PubMed, Google Scholar, Embase και Cochrane Central Register of Controlled Trials.

Οι λέξεις κλειδιά και οι όροι Boolean με βάση τους οποίους διενεργήθηκε η αναζήτηση ήταν: *hepatocellular carcinoma and liraglutide*, *hepatocellular carcinoma and glucagon like peptide-1*, *hepatocellular carcinoma and exenatide*, *hepatocellular carcinoma and semaglutide*, *hepatocellular carcinoma and doulaglutide*, *hepatocarcinogenesis and liraglutide*, *hepatocarcinogenesis and glucagon like peptide-1*, *hepatocarcinogenesis and exenatide*, *hepatocarcinogenesis and semaglutide*, *hepatocarcinogenesis and doulaglutide*.

Επίσης, μελετήθηκε η βιβλιογραφία των επιλεγμένων εργασιών, για την πιθανή ανεύρεση επιπλέον σχετικών άρθρων.

### 6.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΡΘΡΩΝ

Η συγκεκριμένη συστηματική ανασκόπηση εκπονήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες PRISMA statement (Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis Protocols, Moher 2010) όπου και παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 1, ενώ η κριτική αποτίμηση των μελετών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κριτηρίων που ορίζει η CASP Systematic Review Checklist (<https://casp-uk.net/>).

Η επιλογή των άρθρων, που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, βασίστηκε στα ακόλουθα κριτήρια ένταξης και κριτήρια αποκλεισμού:

#### Κριτήρια ένταξης

1. οι μελέτες να είναι πρωτότυπες και όχι βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις.
2. Τα μελετούμενα φάρμακα να ανήκουν αποκλειστικά στην κατηγορία των GLP1 αγωνιστών.
3. οι μελέτες να αφορούν κύτταρα ηπατώματος και όχι νεοπλασία άλλου τύπου.
4. οι μελέτες να συσχετίζουν το GLP1 με το ΗΚΚ.
5. οποιαδήποτε ημερομηνία δημοσίευσης.
6. η γλώσσα δημοσίευσής τους να είναι τα αγγλικά.
7. να αφορούν πειράματα με κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων ηπατώματος.

#### Κριτήρια αποκλεισμού

1. μελέτες που περιλαμβάνουν και άλλα αντιδιαβητικά φάρμακα εκτός από τους GLP1 αγωνιστές.
2. μελέτες που περιλαμβάνουν την επίδραση των GLP1 αγωνιστών και σε άλλες νεοπλασίες πλην του ΗΚΚ.
3. μελέτες όπου εξετάζουν αποκλειστικά *in vivo* τα GLP1 ανάλογα συναρτήσει της ηπατοκαρκινογένεσης.
4. μελέτες καταχωρημένες σε γλώσσες πλην της αγγλικής.

Το σύνολο των μελετών που ανευρέθηκαν στις προαναφερθείσες βάσεις δεδομένων με τις προαναφερθείσες λέξεις κλειδιά ήταν 2479. Μετά την εξέταση των άρθρων για ύπαρξη διπλοτύπων απέμειναν 102 και από αυτά κατόπιν ανάγνωσης των περιλήψεων απορρίφθηκαν οι 51 βάσει των κριτηρίων αποκλεισμού, καθώς ήταν άσχετα με το θέμα που εξετάζεται. Οι εναπομείνουσες 51 εργασίας διαβάστηκαν ακέραιες με αποτέλεσμα να εγκαταλειφθούν 46, καθώς πληρούσαν τα κριτήρια αποκλεισμού (Διάγραμμα 1). Τελικά, 5 βρέθηκαν να είναι οι εργασίες που εκπληρώνουν όλα τα κριτήρια εισαγωγής.

### 6.3 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Οι εργασίες προς μελέτη αξιολογήθηκαν από την συγγραφέα, βάσει των κριτηρίων που τέθηκαν. Εν συνεχεία, έγινε έλεγχος της ποιότητας των επιλεγμένων εργασιών και εξήχθησαν τα απαραίτητα δεδομένα για τη διενέργεια της συστηματικής ανασκόπησης. Το σύνολο του υλικού που προέκυψε, εξετάσθηκε από τον επιβλέποντα καθηγητή. Τυχούσες διαφωνίες επιλύθηκαν με συζήτηση.

### 6.4 ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ 5 ΑΝΑΣΚΟΠΟΥΜΕΝΩΝ ΑΡΘΡΩΝ ΠΡΟΣ ΔΙΕΥΚΟΛΥΝΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΓΝΩΣΤΗ

**E1** (εργασία 1): Krause G.C., Goulart Lima K., Vitor Levorse V, et al. *Exenatide induces autophagy and prevents the cell regrowth in HepG2 cells*, EXCLI Journal 2019;18:540-548.

**E2**(εργασία 2): Lu X., Xu C., Jie Dong J., et al. *Liraglutide activates nature killer cell-mediated antitumor responses by inhibiting IL-6/STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma*. Translational Oncology 2021;14.

**E3(εργασία 3):** Q. LI, A.-Y. XUE, Z.-L. LI, et al. ***Liraglutide promotes apoptosis of HepG2 cells by activating JNK signaling pathway.*** European Review for Medical and Pharmacological Sciences 2019; 23: 3520-3526.

**E4(εργασία 4):** Gabriele Catyana Krausea, Kelly Goulart Lima, Henrique Bregolin Dias. ***Liraglutide, a glucagon-like peptide-1 analog, induce autophagy and senescence in HepG2 cells.*** European Journal of Pharmacology 2017; 809:32-41.

**E5(εργασία 5):** Yamada N., Matsushima-Nishiwaki R., Kobayashi K., et al. ***GLP-1 reduces the migration of hepatocellular carcinoma cells via suppression of the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase pathway.*** Archives of Biochemistry and Biophysics 2021; 703.

## **6.5 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΟΜΟΙΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΣ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΕΡΓΑΣΙΩΝ**

Κατά τη διαδικασία αναζήτησης δεδομένων, δε βρέθηκε κανένα άρθρο που να μελετά την επίδραση των GLP-1 αγωνιστών σε ασθενείς με ΗΚΚ. Αντ'αυτού προέκυψαν άρθρα που μελετούν το παραπάνω ζητούμενο με πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων ηπατώματος που φυλάσσονται σε τράπεζες κυττάρων, είτε ανθρώπων είτε ποντικών.

Στην παρούσα εργασία θα ανασκοπηθούν 5 άρθρα, τα οποία περιλαμβάνουν εργαστηριακά πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες που σαν **κοινή συνιστώσα έχουν τη χορήγηση και τη μελέτη της επίδρασης** των GLP-1 αγωνιστών σε κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων ηπατώματος, ανθρώπων ή ποντικών, παρμένα από κυτταρικές τράπεζες. Κοινός τόπος για τις E1, E2, E3, E4 είναι η ποσοτικοποίηση του ρυθμού αναστολής πολλαπλασιασμού των κυττάρων ηπατώματος μετά τη χορήγηση GLP-1 αναλόγου.

Από την άλλη, τα 5 πειράματα παρουσιάζουν **ανομοιογένεια** σε αρκετά σημεία και αυτός είναι ο λόγος που δε μπορεί να προκύψει μετανάλυση από την παρούσα ανασκόπηση.

Πρώτον, παρουσιάζουν **ανομοιογένεια** ως προς τον GLP-1 αγωνιστή που χρησιμοποιείται, τη δόση χορήγησής του και τη χρονική διάρκεια επώασης των κυττάρων ηπατώματος έως τις πειραματικές μετρήσεις.

Δεύτερον, οι εργασίες διαφέρουν ως προς τους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου και τις σηματοδοτικές πρωτεΐνες που μελετώνται ως παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού κυττάρων ηπατώματος.

Τρίτον, οι εργαστηριακές μέθοδοι ακόμα και για τη μελέτη του ίδιου μηχανισμού διαφέρει, όπως διαφέρουν και τα εργαστηριακά μηχανήματα, διαλύματα και set που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση μορίων ή πρωτεϊνών.

Συνεπώς, η εργασία αυτή επιχειρεί να συνοψίσει τα αποτελέσματα των υπαρχόντων πειραμάτων, χωρίς να καθίσταται δυνατό να πραγματοποιηθεί μετανάλυση.

## **6.6 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΡΘΡΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ**

Τα δεδομένα που ελήφθησαν από τις εργασίες συνοψίζονται ακολούθως:

1. Στοιχεία άρθρων: όνομα συγγραφέα, σχεδιασμός της μελέτης.

2. Χαρακτηριστικά πειράματος: τύπος κυττάρων ηπατώματος, δόση χορηγούμενου GLP-1 αγωνιστή, ταυτότητα GLP-1 αγωνιστή, χρόνος επώασης κυττάρων ηπατώματος κυττάρων μετά τη χορήγηση GLP-1 αγωνιστή, ενδιάμεσα στάδια (ένεση κυτταροκαλλιιεργειών σε ποντίκια).

3. μελετούμενοι μηχανισμοί: άμεση κυτταροτοξικότητα, νέκρωση, ογκόλυση από το σύστημα φυσικής ανοσίας, , απόπτωση, γήρανση, αυτοφαγία, διατήρηση επίδρασης GLP-1 αγωνιστή στο χρόνο και μετανάστευση.

4. μόρια που μελετήθηκαν αντιστοίχως με παραπάνω μηχανισμούς (Πίνακας 1).

| ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ                                 | ΜΟΡΙΑ-ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ<br>ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ                                                         |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| άμεση κυτταροτοξικότητα                    | LDH (ELISA)                                                                                          |
| ογκόλυση από το σύστημα<br>φυσικής ανοσίας | NK cells (κυτταρομετρία ροής)<br>IFN-γ (ELISA και qRT-PCR)<br>IL-6 (qRT-PCR)<br>STAT3 (Western Blot) |
| απόπτωση                                   | JNK/p- JNK (Western Blot)                                                                            |
| γήρανση                                    | TGF-β1 (ELISA)                                                                                       |
| αυτοφαγία                                  | mTOR (Western Blot)<br>TGF-β1 (ELISA)<br>AVO's (Φθορισμός)                                           |
| μετανάστευση                               | TGF-α (Western Blot)<br>HGF (Western Blot)<br>cAMP (ELISA)<br>PKA (Western Blot)                     |

**Πίνακας 1:** οι μηχανισμοί αναστολής κυτταρικού πολλαπλασιασμού που μελετήθηκαν συναρτήσε των μορίων και των μεθόδων προσδιορισμού τους

## 6.7 ΟΡΙΣΜΟΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Ζώντα κύτταρα (viable cells): άμεση μέτρηση κυττάρων μετά τη χρώση με Trypan blue . τα κεχρωσμένα ως μπλε προσδιορίζονται ως νεκρά.

Viability(%): ζώντα κύτταρα/ολικά κύτταρα x 100%

Population doubling (PD):  $PD = [\log N(t) - \log N(t_0)] / \log 2$ , όπου  $N(t)$  είναι το νούμερο των κυττάρων τη στιγμή της μέτρησης και  $N(t_0)$  τη στιγμή της δημιουργίας της κυτταροκαλλιέργειας.

cell survival rate (%):  $(\text{absorbance value of experimental group} - \text{absorbance value of control group}) / (\text{absorbance value of control group} - \text{absorbance value of blank group}) * 100\%$ .

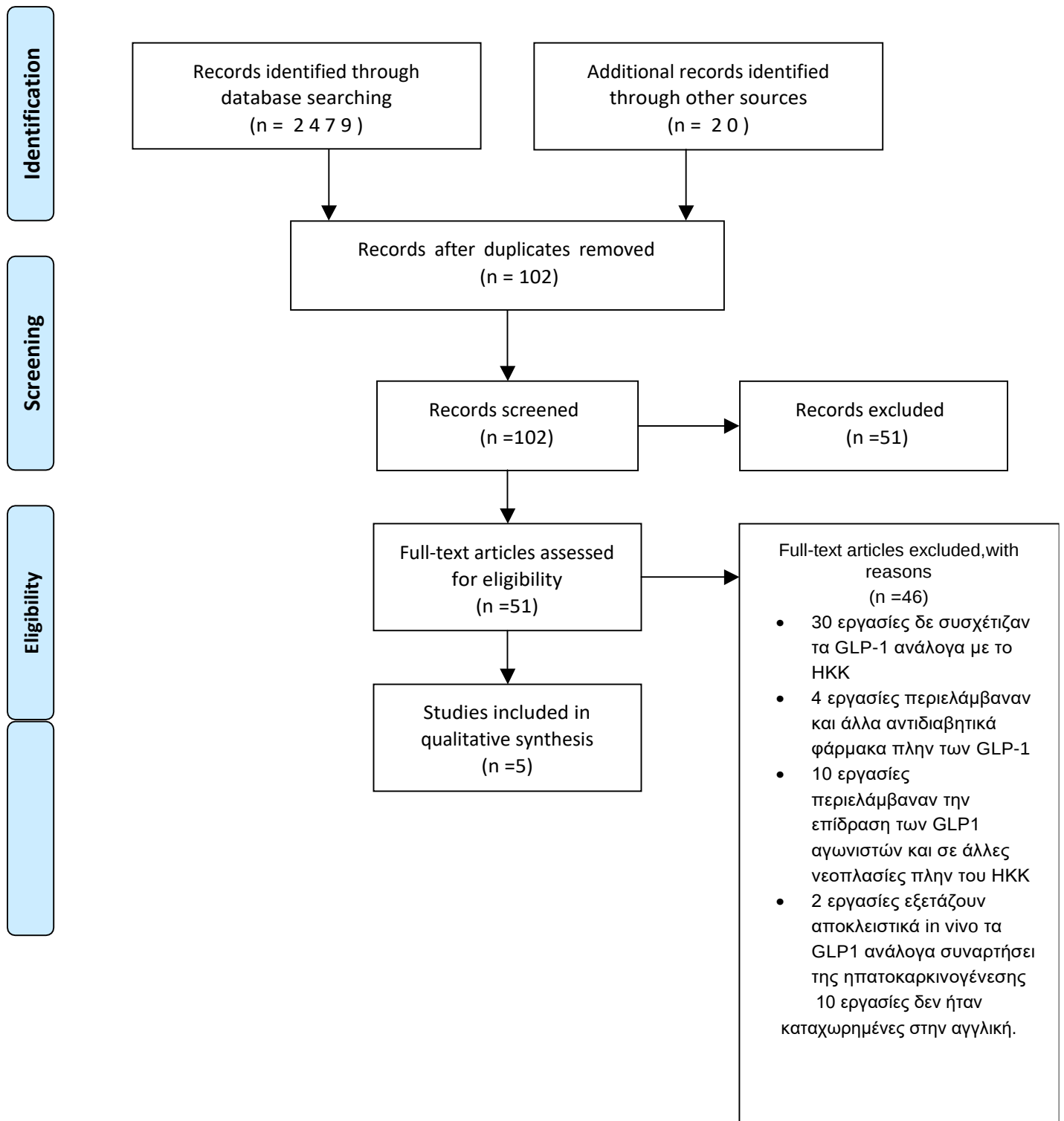
## 6.8 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ

Το πρωτεύον αποτέλεσμα που αναζητήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη είναι το αν η χορήγηση GLP-1 αγωνιστή επιδεικνύει οποιοδήποτε αλλαγή στην έκβαση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων του ηπατώματος και συγκεκριμένα στο ρυθμό πολλαπλασιασμού τους.

Το δευτερεύον αποτέλεσμα που αναζητήθηκε είναι το μέγεθος της πιθανής έκβασης και ο μηχανισμός που είχε μέγιστη συμβολή στην έκβαση αυτή.



## PRISMA 2009 Flow Diagram



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 7.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Η Ε1 περιλαμβάνει πείραμα κατά το οποίο κύτταρα HEPG2 επωάζονται σε κυτταροκαλλιέργεια και κατόπιν μοιράζονται σε 2 ξεχωριστά τρυβλία με λιραγλουτίδη και εξενατίδη, όπου 48 ώρες μετά ελέγχεται ο αριθμός των ζώντων κυττάρων (viable cells), οι μορφομετρικές παράμετροι των νεκρών κυττάρων ώστε να εξαχθεί συμπέρασμα για το μηχανισμό κυτταρικού θανάτου. Επιπλέον, εξετάζεται ποσοτικά και ποιοτικά η έκφραση της mTOR πρωτεΐνης.

Η Ε2 περιλαμβάνει 2 πειράματα. Στο πρώτο, τα κύτταρα ηπατώματος HCC-LM3 και Hepa1-6 αναμείχθηκαν με NK κύτταρα και αφού επωάστηκαν για 12 ώρες, μοιράστηκαν σε δυο τρυβλία, το πρώτο παρουσία και το δεύτερο απουσία λιραγλουτίδης (control). Μετά από τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των IFN- $\gamma$ , IL-6 και STAT3 μελετήθηκε το αν η λιραγλουτίδη αυξάνει την κυτταροτοξική ικανότητα των NK κυττάρων. Κατά το δεύτερο, τα καρκινικά κύτταρα ενέθηκαν σε ποντίκια με επακόλουθο τη δημιουργία όγκου, ότε και έλαβαν λιραγλουτίδη μαζί με αντισώματα εναντίον των NK κυττάρων και των CD8 προκειμένου μελετηθεί in vivo η επίδραση της λιραγλουτίδης στην εγγενή (NK κυττάρων) και επίκτητη (CD8) ανοσιακή απάντηση εναντίον του όγκου.

Στην Ε3 χρησιμοποιήθηκαν HEPG2 κύτταρα και αφού επωάστηκαν για 48 h, ακολούθησε προθήκη λιραγλουτίδης σε διαφορετικές δόσεις και μετρήθηκε ο ρυθμός αναστολής πολλαπλασιασμού καθώς και η επίδρασή της το JNK μονοπάτι.

Η Ε4, αρκετά όμοια με την Ε1, περιέλαβε κυτταροκαλλιέργειες HEPG2, στις οποίες προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις λιραγλουτίδης. Καταγράφηκε ο αριθμός των ζώντων κυττάρων (viable cells), ο μηχανισμός κυτταρικού θανάτου και η έκφραση του TGF- $\beta$ 1 και της πρωτεΐνης mTOR (ποσοτικά και ποιοτικά).

Η Ε5, συμπεριέλαβε ανθρώπινα κύτταρα ηπατώματος HuH7 cells τα οποία επωάστηκαν για 4 ημέρες σε ειδικό τρυβλίο μελέτης κυτταρικής μετανάστευσης και αφού εκτέθηκαν σε GLP-1 ανάλογο (δεν αναφέρεται ποιο) διεγέρθηκαν με TGF-α και HGF. Ποσοτικοποιήθηκε ο αριθμός των κυττάρων που εκδήλωσαν μεταναστευτική συμπεριφορά καθώς και οι παράγοντες EGFR, p38-MAPK, Akt, MYRT-2 και SAPK-JNK προκειμένου να μελετηθεί το μεταστατικό δυναμικό των κυττάρων υπό την επίδραση του GLP-1 αναλόγου.

## **7.2. ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Συνολικά, από την παρούσα ανασκόπηση φαίνεται ότι τα GLP-1 ασκούν χημειοθεραπευτική δράση στα κύτταρα ηπατώματος ανθρώπων ή ποντικών, όταν αυτά επωάζονται σε κυτταροκαλλιέργειες. Η ευεργετική τους δράση φαίνεται να πραγματοποιείται τόσο μέσω μηχανισμών κυτταρικής νέκρωσης από τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας, όσο και μέσω μηχανισμών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, δηλαδή αυτούς της απόπτωσης, αυτοφαγίας και γήρανσης καθώς και από την αναστολή του μεταστατικού δυναμικού. Ενεργοποιεί δε αυτούς τους μηχανισμούς μέσω αναστολής και ενεργοποίησης σημαντικών μονοπατιών σηματοδότησης που συνδέονται με την καρκινογένεση με σημαντικότερα αυτά του mTOR και του JNK αντίστοιχα (πίνακας 1).

Η ευεργετική δράση των GLP-1 αναλόγων θα αναλυθεί σε 8 άξονες: επιβίωση καρκινικών κυττάρων (viability), κυτταροτοξικότητα και νέκρωση, απόπτωση, αυτοφαγία, γήρανση, διατήρηση καταστολής πολλαπλασιασμού και μετανάστευση.

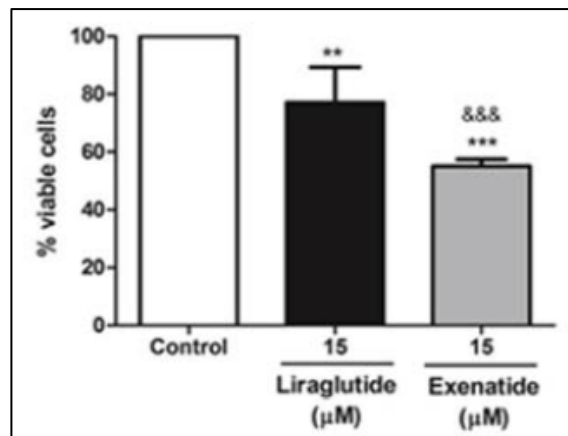
### 7.3 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ GLP-1 ΑΝΑΛΟΓΟΥ

Τα αποτελέσματα των Ε1,Ε2,Ε3,Ε4 είναι συμβατά με ευεργετική δράση των GLP-1 αγωνιστών ως χημειοθεραπευτικά, δηλαδή η προσθήκη τους οδήγησε σε μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων ηπατώματος (και συνεπώς αυξήθηκε ο αριθμός των νεκρών) στις καλλιέργειες όταν επωάστηκαν μαζί για τουλάχιστον 12, 24 και 48 ώρες. Μάλιστα σε όλες τις εργασίες φαίνεται δόσοεξαρτώμενη επίδραση, δηλαδή όσο αυξανόταν η δόση χορήγησης και ο χρόνος χορήγησης τους, τόσο μεγάλωνε η χημειοθεραπευτική ικανότητα τους. Στον πίνακα 3 συνοψίζονται αυτά τα αποτελέσματα.

| ΠΕΙΡΑΜΑ   | ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΟ<br>ΜΕΓΕΘΟΣ                                  | ΔΟΣΕΙΣ GLP-1 ΑΓΩΝΙΣΤΩΝ |                   |              |              |              |              |             |
|-----------|--------------------------------------------------------|------------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
|           |                                                        | LIRA<br>0,01<br>μM     | LIRA<br>0,1<br>Mμ | LIRA<br>1 μM | LIRA<br>10μM | LIRA<br>15μM | LIRA<br>20μM | EXE<br>15μM |
| <b>E1</b> | VIABLE CELLS %<br><br>48 ώρες                          |                        |                   |              |              | 78           |              | 45          |
| <b>E2</b> | VIABLE CELLS %<br><br>24 ώρες                          |                        |                   |              | 47           |              | 45           |             |
| <b>E4</b> | VIABLE CELLS %<br><br>24 ώρες                          |                        |                   |              | 90           | 80           | 78           | 40          |
| <b>E3</b> | PROLIFERATION<br><br>INHIBITION RATE<br><br>%, 48 ώρες | 36                     | 50                | 70           |              |              |              |             |

**Πίνακας 3:** επιβίωση κυττάρων ηπατώματος και τις ώρες επώασης με GLP-1 ανάλογο

Στο E1 (Διάγραμμα 1), η εξενατίδη (15μ M) φάνηκε να μειώνει τα ζώντα κύτταρα στις 48 ώρες κατά 45% ( $p<0,01$  vs control, E1) ενώ η λιραγλουτίδη στην ίδια ποσότητα κατά 23% ( $p<0,001$  vs control, E1). Υπεροχή έδειξε η εξενατίδη ( $p<0,001$  vs control και  $p<0,001$  vs liraglutide) σε σχέση με τη λιραγλουτίδη ( $p<0,001$  vs control) και στη μακροχρόνια χορήγηση πολλαπλών

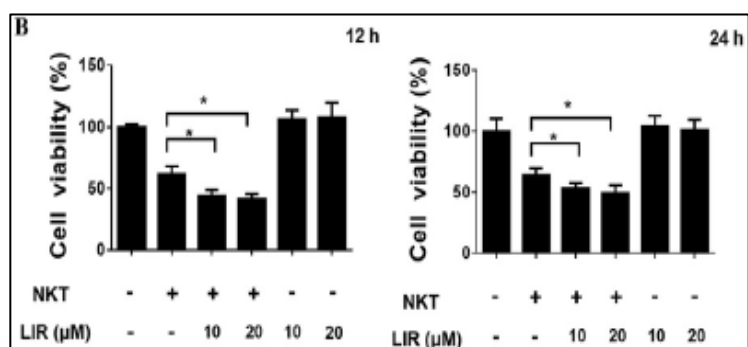


Διάγραμμα 1

δόσεων (retreatment, RT) ως αναφορά τη μείωση του αναδιπλασιασμένου πληθυσμού (cumulative population doubling) και τη σταθεροποίηση της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, σε σύγκριση με τρυβλία χωρίς φάρμακο(negative control) και τρυβλία με σισπλατίνη (positive control).

Παρόμοια αποτελέσματα ανέδειξε και η E4, όπου τα μετρήθηκαν τα ζώντα HepG2 μετά από 48 ώρες επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις λιραγλουτίδης. Τα 15μM και 20μM επέδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση κατά 20% ( $p<0,05$  vs control) και 22% ( $p<0,05$  vs control), αντίστοιχα.

Σημαντική μείωση παρουσίασε επίσης ο αριθμός των ζώντων κυττάρων ηπατώματος μετά την προσθήκη NK κυττάρων και ακόμη σημαντικότερη μετά την προθήκη και λιραγλουτίδης 10μM ή 20μM με χρόνο επώασης 12 και 24 ώρες στην E2. Και για τις 2



Διάγραμμα 2

συγκεντρώσεις η μείωση ήταν περίπου 52% στις 12 ώρες ( $p < 0,05$  vs *NK cells alone*, E2) και 49% τις 24 ( $p < 0,05$  vs *NK cells alone*, E2). Πρακτικά, παρουσία λιραγλουτίδης, η ενίσχυση της ανοσιακής απόκριση των NK κυττάρων εναντίον των καρκινικών κυττάρων υποδιπλασίασε τον πληθυσμό τους εντός 12 ωρών (Διάγραμμα 2).

Τέλος, η E3 ανέδειξε αύξηση του ρυθμού αναστολής της ανάπτυξης με την προθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων λιραγλουτίδης στα HepG2 στις 12, 24, 36, 48 ώρες, με το μέγιστο ρυθμό να παρατηρείται τις 48 ώρες με συγκέντρωση 1000nmol/L ή αλλιώς 1Mμ (70,78%,  $p < 0.05$ , E3).

Από τις E1, E2, E3, E4 προκύπτει ότι η μείωση των ζώντων κυττάρων δεν είναι αποτέλεσμα άμεσης κυτταροτοξικότητας των GLP-1 αγωνιστών στα κύτταρα του ηπατώματος, αφού η μετρούμενη LDH που χρησιμοποιήθηκε σα δείκτης κυτταροτοξικότητας στα E1, E2 δεν αυξήθηκε παρουσία GLP-1. Επιπλέον μόνο με την ταυτόχρονη παρουσία NK cells μειώθηκε ο πληθυσμός τους (διάγραμμα 2).

Η χημειοθεραπευτική ιδιότητα των GLP-1 αγωνιστών, λοιπόν, αναζητήθηκε και προκύπτει, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω, μέσω ενισχυτικής τους επίδρασης μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου (αυτοφαγία, γηρασμός, ανοσολογική νέκρωση, με αμφιλεγόμενη την επίδραση τους στην απόπτωση), και στα πολλαπλά μονοπάτια μοριακής σηματοδότησης που σχετίζονται με αυτόν (m TOR, JNK, IL-6/STAT3, TGF- $\beta$ 1).

## 7.4 ΟΓΚΟΛΥΣΗ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΝΕΚΡΩΣΗ

### 7.4.1 ΡΟΛΟΣ ΑΜΕΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΚΙΚΟΤΗΤΑΣ

Οι GLP-1 αγωνιστές, στα πειράματα όπου επέφεραν αναστολή πολλαπλασιασμού του κυτταρικού πληθυσμού, δεν προκάλεσαν άμεση κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα ηπατώματος, αφού η LDH που χρησιμοποιήθηκε σα δείκτης άμεσης κυτταρόλυσης και διάσπασης της κυτταρικής μεμβράνης δε βρέθηκε αυξημένη σε κανένα πείραμα (E1, E4).

### 7.4.2 ΡΟΛΟΣ ROS

Η επώαση των κυττάρων ηπατώματος με GLP-1 αγωνιστή, εν προκειμένω λιραγλουτίδης στην E4, δεν συνοδεύτηκε από μείωση του ενδοκυττάριου οξειδωτικού stress , αφού η συγκέντρωση των ενζύμων που μελετήθηκαν και εμπλέκονται στη γένεση του (TBARS, καταλάση) δεν παρουσίασε διακύμανση, με εξαίρεση τη συνθετάση της γλουταθειόνης (GSH). Οι ερευνητές υπέθεσαν ότι η παρατηρούμενη αναστολή πολλαπλασιασμού δεν οφείλεται σε τροποποίηση του οξειδωτικού stress.

### 7.4.3 ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ IFN- $\gamma$

Οι GLP-1 αγωνιστές και εν προκειμένω στην E2 η λιραγλουτίδη, φάνηκε να ενισχύουν τη διαμεσολαβούμενη από τα NK κύτταρα ανοσιακή απάντηση και να ευαισθητοποιούν τα κύτταρα ηπατώματος στην διαμεσολαβούμενη από τα NK κύτταρα λύση, τόσο *in vitro* (στις κυτταροκαλλιέργειες) όσο και *in vivo* (όταν τα ηπατώματος HCC-LM3 ενέθηκαν σε ποντικούς και προκάλεσαν σχηματισμό όγκου) . Τα NK κύτταρα αλλά και τα κύτταρα ηπατώματος που εκτέθηκαν στη λιραγλουτίδη εμφάνισαν αύξηση της έκφρασης και παραγωγή της IFN- $\gamma$ , με επακόλουθο τη νέκρωση (ογκόλυση). Αυτά τα συμπεράσματα προέκυψαν από πειράματα όπου στην ομάδα της λιραγλουτίδης τα κύτταρα της ανοσίας εντός του όγκου που παράγουν IFN- $\gamma$  αυξήθηκαν επί 2.3 φορές ( $p < 0,05$  vs *control*, E2) με παράλληλη

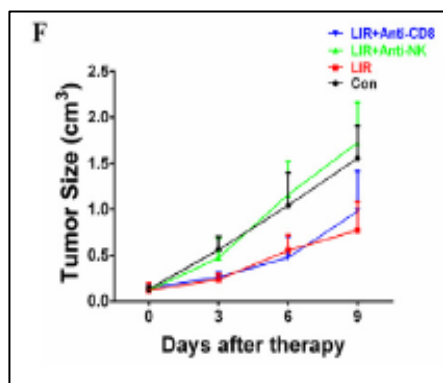
αύξηση επί 1,7 φορές του mRNA της IFN- $\gamma$  στα κύτταρα αυτά ( $p < 0,05$  vs control, E2).

#### 7.4.4 ΡΟΛΟΣ NK ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα ανοσιακά κύτταρα που ευθύνονταν για αυτήν την αύξηση στην παραγωγή και την έκφραση της IFN- $\gamma$  ταυτοποιήθηκαν με κυτταρομετρία ροής και βρέθηκε να είναι τα NK κύτταρα (CD3+) και όχι τα T-λεμφοκύτταρα (CD4+ και CD8+) ή άλλα κύτταρα (NKG2D+)(Διάγραμμα 2).

Στη συνέχεια, όταν τα κύτταρα ηπατώματος HCC-LM3 επωάστηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες παρουσία και απουσία λιραγλουτίδης 10 $\mu$ M και 20 $\mu$ M και ακολούθησε προσθήκη NK κύτταρα -σε καθορισμένες αναλογίες προς τα κύτταρα ηπατώματος-, επιβεβαιώθηκε ότι τα τελευταία είναι υπεύθυνα για την αύξηση στην παραγωγή ( $p < 0,05$  vs control) και την έκφραση ( $p < 0,0001$  vs control) της IFN- $\gamma$  και για την επαγόμενη ογκόλυση.

Η παραπάνω παρατήρηση ενισχύθηκε όταν οι ερευνητές μελέτησαν την επίδραση της λιραγλουτίδης in vivo σε μοντέλο ανοσοεπαρκών ποντικών, στα οποία μετά την υποδόρια ένεση Hera 1-6, σχηματίστηκαν ηπατοκυτταρικοί όγκοι. Φάνηκε λοιπόν, ότι η λιραγλουτίδη ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη του μεγέθους του όγκου μόνο στα ποντίκια που είχαν επάρκεια NK κυττάρων ( $p < 0,001$  vs



Διάγραμμα 3

control,E2), ενώ δεν είχε επίδραση σε αυτά που είχαν ανεπάρκεια NK κυττάρων ( $p > 0,05$  vs control,E2) , ανεξαρτήτως της επάρκειας CD8+ T-λεμφοκυττάρων (Διάγραμμα 3).

Συμπερασματικά, η λιραγλουτίδη ενεργοποιεί την αντineοπλασματική δράση της φυσικής ανοσίας μέσω των NK κυττάρων, αυξάνοντας την κυτταροτοξικότητα τους και αυξάνοντας την ευαισθησία των κυττάρων ηπατώματος απέναντί της.

#### 7.4.5 ΡΟΛΟΣ IL6/STAT3

Μετά την παρατήρηση για την ενισχυτική επίδραση της λιραγλουτίδης στην αντineοπλασματική ικανότητα των NK κυττάρων, επιχειρήθηκε η διερεύνηση του υποκείμενου μηχανισμού με επίκεντρο το σηματοδοτικό μονοπάτι IL-6/STAT3, που όπως είναι γνωστό η ενεργοποίησή του αναστέλλει την αντineοπλασματική δράση των κυττάρων της φυσικής ανοσίας[60].

Στα πλαίσια του πειράματος, η λιραγλουτίδη σε δόσεις 10μM και 20μM, μείωσε θεαματικά τα επίπεδα της p-STAT3 (ενεργοποιημένη STAT3), τα οποία κυμαίνονταν σε υψηλά επίπεδα λόγω της αυξημένης έκκρισης IL-6 από τα HCC-LM3 και Hepa1-6 κύτταρα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων p-STAT3 και IL-6 στους καρκινικούς ιστούς των ποντικών *in vivo*.

Τέλος, παρατηρήθηκε ότι καθ'εαυτή η ενεργοποίηση των NK κυττάρων πυροδοτούσε την ισχυρή ενεργοποίηση του STAT3 καθώς και ότι η δράση των NK κυττάρων ωχριούσε μετά την προσθήκη IL-6. Και τα δυο αυτά φαινόμενα ανεστράφησαν από την προσθήκη λιραγλουτίδης, υποδεικνύοντας ότι αυτή καταστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι IL-6/STAT3 στο ΗΚΚ.

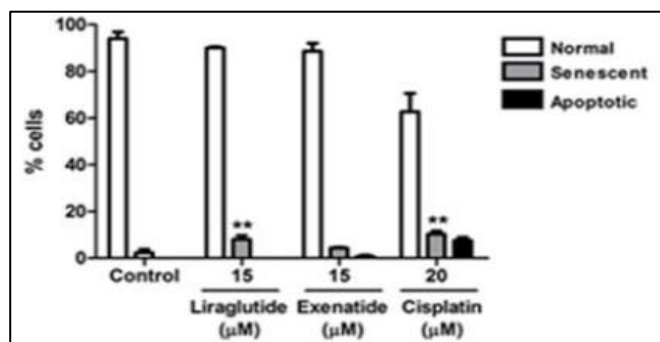
Συνολικά, τα GLP-1 ανάλογα επιδεικνύουν κυτταροτοξική δράση στα κύτταρα ηπατώματος, *in vivo* και *in vitro*, μέσω ενίσχυσης της ενεργοποίησης του συστήματος της φυσικής ανοσίας και των NK κυττάρων, καταστολής του σηματοδοτικού

μονοπατιού IL-6/STAT3 και όχι μέσω άμεσης κυτταρόλυσης ή τροποποίησης του ενδοκυττάριου οξειδωτικού stress.

## 7.5 ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Για την εκτίμηση του ποσοστού των κυττάρων που υπέστησαν απόπτωση χρησιμοποιήθηκε η μορφομετρική ανάλυση του μεγέθους και της δομής του πυρήνα (NMA) των κυττάρων καθώς και η κυτταρομετρία ροής. Το κύριο μορφολογικό χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι μεγάλης έκτασης αλλά ομαλή συμπύκνωση του πυρήνα, οδηγώντας σε κατακερματισμό του. Τα αποτελέσματα κατηγοριοποιήθηκαν ως κανονικοί, μικροί και ομαλοί, μεγάλοι και ομαλοί και ανώμαλοι.

Ως αναφορά την εξενατίδη (διάγραμμα 4) σε συγκέντρωση 15μM μετά από επώαση 48 ωρών,



Διάγραμμα 4

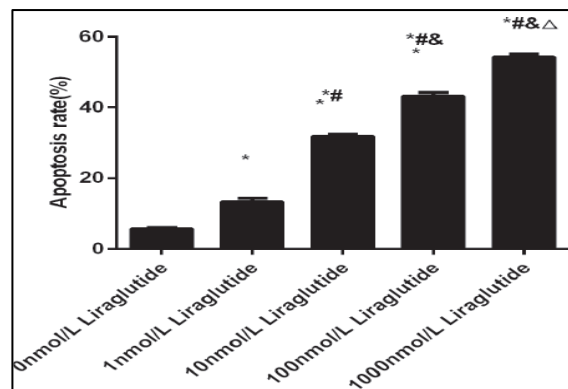
δε φάνηκε να επάγει απόπτωση στα

HepG2 καθώς δεν προκάλεσε συμβατές μορφολογικές αλλαγές στους πυρήνες τους σε σύγκριση με τα HepG2 χωρίς εξενατίδη (negative controls) και με τα HepG2 με σιπλατίνη (positive controls).

Τα αποτελέσματα για την επαγωγή απόπτωσης από τη λιραγλουτίδη είναι αντιφατικά. Στις E1,E4 όταν χορηγήθηκε σε δόσεις 15μM μετά από επώαση 48 ωρών, δεν αναδείχτηκαν μορφομετρικές αλλοιώσεις συμβατές με αποπτωτική διαδικασία (διάγραμμα 4).

Αντίθετα, στην E3 μετά από χορήγηση λιραγλουτίδης 0.001, 0.01, 0.1 και 1μM και επώαση 48 ωρών φάνηκε στην κυτταρομετρία ροής ότι ο ρυθμός απόπτωσης των HepG2 αυξανόταν, όσο αυξάνονταν η συγκέντρωση της λιραγλουτίδης (διάγραμμα

5). Ενδεικτικά, στις 48 ώρες ο ρυθμός απόπτωσης με 0.001, 0.01, 0.1 και 1μM λιραγλουτίδης παρατηρήθηκε να είναι στα περίπου 15, 35, 42, 50% αντίστοιχα ( $p<0,05$  vs control, E3).



Διάγραμμα 5

Μελετήθηκε δε περαιτέρω ο μηχανισμός της απόπτωσης με επίκεντρο το κύριο σηματοδοτικό μονοπάτι που εμπλέκεται στη φυσιολογική αυτή διαδικασία, το JNK. Φάνηκε ότι όταν στην κυτταροκαλλιέργεια προστέθηκε επιπλέον της λιραγλουτίδης και ένας εκλεκτικός αναστολέας του JNK (SP600125), μειώθηκε σημαντικά ο ρυθμός απόπτωσης (στο 1μM μείωση από περίπου 42 στο 30%,  $p<0,05$ , E3). Παράλληλα, φάνηκε ότι δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων λιραγλουτίδης στην έκφραση της JNK πρωτεΐνης στα HepG2, αλλά μόνο στην p-JNK, της οποίας η έκφραση παρουσίασε μείωση όσο αυξάνονταν οι δόσεις της λιραγλουτίδης. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά με προηγούμενες μελέτες [61], όπου περιγράφεται η ιδιότητα των GLP-1 αγωνιστών να προκαλούν προς τα κάτω ρύθμιση και αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού JNK.

Συνοπτικά, λόγω των αντιφατικών αποτελεσμάτων της βιβλιογραφίας παραμένει ερώτημα το αν οι GLP-1 αγωνιστές έχουν επίδραση στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ηπατώματος, μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης.

## 7.6 ΓΗΡΑΝΣΗ (SENESCENCE)

Για την εκτίμηση του ποσοστού των κυττάρων που υπέστησαν μη αντιστρεπτή διακοπή του κυτταρικού κύκλου, δηλαδή γήρανση, χρησιμοποιήθηκε η μορφομετρική ανάλυση του μεγέθους και της δομής του πυρήνα (NMA) και η κυτταρομετρία ροής.

Η εξενατίδη δεν προκάλεσε αλλαγές στη μορφή των πυρήνων συμβατές με γήρανση (Διάγραμμα 4).

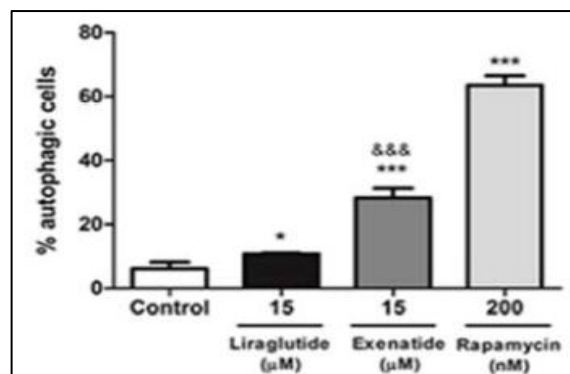
Από την άλλη η λιραγλουτίδη σε δόση 15 και 20μM μετά από επώαση 48 ωρών, φάνηκε να οδηγεί σε γήρανση περίπου το 10% των HepG2 (15μM στην E1  $p<0,01$  vs control, 15μM στην E4  $p<0,001$  vs control, 20μM στην E4  $p<0,001$  vs control). Πράγματι, στη μορφομετρική ανάλυση αναδείχτηκαν χαρακτηριστικά γήρανσης με περίπου 10% των κυττάρων να έχουν μεγάλους και ανώμαλους πυρήνες. Η κυτταρομετρία ροής στήριξε την παραπάνω παρατήρηση καθώς ανέδειξε ότι η λιραγλουτίδη προκάλεσε καθήλωση κυττάρων στη φάση G0/G1, εύρημα συμβατό με γήρανση (Διάγραμμα 4).

Για τον υποκείμενο μηχανισμό πρόκλησης γήρανσης μελετήθηκε ο TGF-β, αφού προκύπτει από εργασίες ότι μπορεί να επάγει μαζική γήρανση σε κυτταρικές σειρές HKK[50]. Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις του TGF-β στο εναιώρημα των κυτταροκαλλιεργειών και βρέθηκε ότι η λιραγλουτίδη, σε συγκεντρώσεις 15 και 20μM μετά από επώαση 48 ωρών, προκάλεσε σημαντική αύξηση παραγωγής TGF-β από τα HepG2 ( $p<0,05$  vs control, E4). Είναι η παρατηρούμενη αυτή αύξηση που κατά τους συγγραφείς πιθανά οδηγεί στη γήρανση των καρκινικών κυττάρων.

## 7.7 ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

Προκειμένου να μελετηθεί εις βάθος η ικανότητα των GLP-1 αγωνιστών να επάγουν αυτοφαγία, τα HepG2 επωάστηκαν ξεχωριστά στα εξής τριβλία: απουσία GLP-1 (negative control), παρουσία GLP-1, και παρουσία ραπαμυκίνης (positive control). Για την εκτίμηση της αυτοφαγίας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του φθορισμού για την ανίχνευση ύπαρξης αυτοφαγωσωμάτων, δηλαδή όξινων κυστικών οργανιδίων (acidic vesicular organelles ,AVO's) εντός των HepG2, που αποτελούν έναν καλά χαρακτηρισμένο δείκτη αυτοφαγίας.

Η εξενατίδη ,σε δόση 15μM, επέδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της αυτοφαγίας κατά περίπου 25% σε σύγκριση με τα control ( $p<0,001$ ,  $E1$ ), και κατά προσέγγιση 20% σε σχέση με τη λιραγλουτίδη ( $p<0,001$ ,  $E1$ ), οδηγώντας περίπου 30% των κυττάρων σε διαδικασία



Διάγραμμα 6

αυτοφαγίας. Τα ποσοστά των control και της ραπαμυκίνης είναι περίπου 5 και 65%, αντίστοιχα (Διάγραμμα 6). Στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, αν και κατώτερο της εξενατίδης επέδειξε και η λιραγλουτίδη ( $p<0,001$ ,  $E1$  και  $E4$ ), όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 6.

Με δεδομένες αυτές τις παρατηρήσεις, μελετήθηκε ακολούθως ο mTOR καθώς είναι γνωστό ότι η αναστολή του επιτελεί κεντρικό ρόλο στην προαγωγή της αυτοφαγίας. Ισχυρότερα η εξενατίδη (15μ M), αλλά εξίσου αποτελεσματικά και η λιραγλουτίδη (15μ M) μετά από επώαση 48 ωρών, προκάλεσαν μείωση της παραγωγής και της έκφρασης της mTOR πρωτεΐνης στα HepG2 ( $p<0,01$ ,  $E1$ ). Συνδυάζοντας τις παραπάνω παρατηρήσεις προκύπτει ότι ο λόγος που η εξενατίδη προκαλεί μεγαλύτερο ποσοστό αυτοφαγίας από τη λιραγλουτίδη είναι η μεγαλύτερη ικανότητα της να αναστέλλει την παραγωγή και έκφραση της mTOR πρωτεΐνης στα HepG2.

## 7.8 ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Σε μια προσπάθεια να συνοψίσουμε και να συστηματοποιήσουμε τις προς ανασκόπηση εργασίες ως προς το μέγεθος της θετικής επίδρασης των GLP-1 αγωνιστών στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των HepG2, παραθέτουμε τον πίνακα 4, όπου φαίνονται οι επιδράσεις διαφορετικών συγκεντρώσεων των GLP-1 αγωνιστών στις διαδικασίες της απόπτωσης, γήρανσης

και αυτοφαγίας. Σε όλες τις περιπτώσεις τα ποσοστά εκφράζονται ως τα μελετούμενα κύτταρα προς το σύνολο των κυττάρων του τριβλίου επί %, μετά από επώαση 48 ωρών υπό GLP-1. Για λόγους καλύτερης σύγκρισης παρατίθενται ο αρνητικός μάρτυρας (απουσία GLP-1) και οι θετικοί για κάθε διαδικασία (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, σισπλατίνη, ραπαμυκίνη).

Η εξενατίδη (15μM), μετά από 48 ώρες επώασης, δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση της απόπτωσης και της γήρανσης ενώ προκάλεσε αύξηση της αυτοφαγίας κατά 25% ( $p<0,001$ , E1).

Η λιραγλουτίδη 15Μμ δε φάνηκε να έχει στατιστικά σημαντική αύξηση της απόπτωσης, αλλά παρουσίασε αύξηση της γήρανσης στο 10% του συνόλου των κυττάρων (+7%,  $p<0,001$  vs control, E1) και της αυτοφαγίας στο 12% (+8%,  $p<0,05$  vs control, E1).

Η λιραγλουτίδη 20Μμ φάνηκε να έχει μη στατιστικά σημαντική αύξηση της απόπτωσης, αλλά παρουσίασε αύξηση της γήρανσης στο 6% του συνόλου των κυττάρων (+3%,  $p<0,001$  vs control, E1) και της αυτοφαγίας στο 12% (+8%,  $p<0,05$  vs control, E1).

| ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ   | μάρτυρας | Exe<br>15μM   | Lira<br>15μM  | Lira<br>20 μM | H2O2          | σισπλ<br>ατίνη | ραπαμυκ<br>ίνη |
|--------------|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| Viable cells | 100%     | <b>40%***</b> | <b>80%**</b>  | <b>76%*</b>   |               |                |                |
| Απόπτωση     | 0-2,5%   | 1%            | 4%            | 5%            |               | <b>15%***</b>  |                |
| Γήρανση      | 3%       | 4%            | <b>10%***</b> | <b>6%*</b>    | <b>16%***</b> |                |                |
| Αυτοφαγία    | 4%       | <b>30%***</b> | <b>12%**</b>  | <b>12%**</b>  |               |                | <b>65%***</b>  |

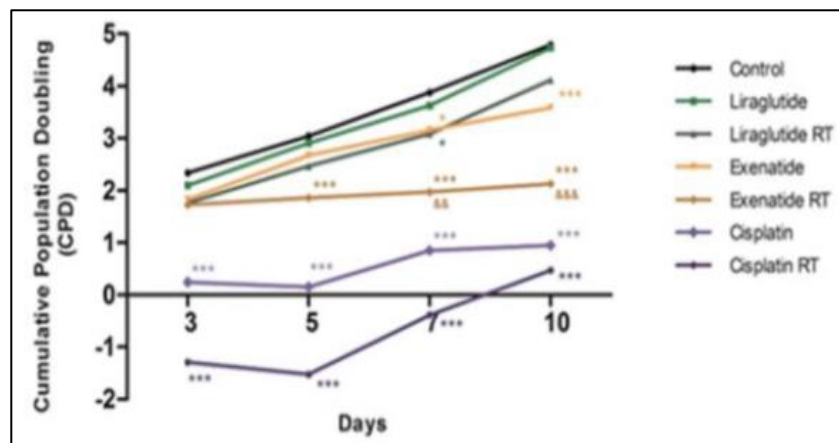
Πίνακας 4, \* $p<0,01$ , \*\* $p<0,05$ , \*\*\* $p<0,001$  vs control

Θα μπορούσαμε ένα πούμε ότι η χημειοθεραπευτική δράση των GLP-1 αγωνιστών ως προς την αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ηπατώματος, οφείλονται κατά κύριο λόγο στην διέγερση της αυτοφαγίας και δευτερευόντως την επαγωγή της γήρανσης καθώς και την αύξηση της αντινεοπλασματικής δράσης των NK cell της φυσικής ανοσίας.

### 7.9 ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ (REGROWTH)

Προκειμένου να εξετασθεί το κατά πόσο η χημειοθεραπευτική δράση των GLP-1 αγωνιστών διατηρείται στο χρόνο, τα HepG2 αφού επωάστηκαν για 48 ώρες με

εξενατίδη ή λιραγλουτίδη, επανεκτέθηκαν σε αυτές και μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων την 2η, 3η, 4 και 5η ημέρα. Προέκυψε ότι μόνο η



Διάγραμμα 7

αρχική χορήγηση εξενατίδης

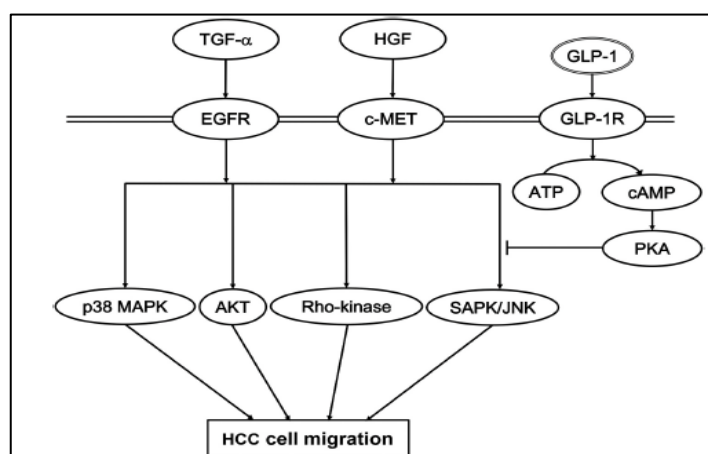
και μόνο η αρχική χορήγηση ή πολλαπλές δόσεις (επαναθεραπεία) λιραγλουτίδης δεν κατέστειλαν σε βάθος χρόνου τον πολλαπλασιασμό και την επαναναπύξη των HepG2, όπως μετρήθηκε με μαθηματικό τύπο (cumulative doubling population). Αντίθετα, η επαναθεραπεία (retreatment, RT) με πολλαπλές δόσεις εξενατίδης, μείωσε τον αριθμό κυττάρων στις κυτταροκαλλιέργειες (Διάγραμμα 7) μακροχρόνια ( $p < 0,001$  vs control,  $p < 0,001$  vs liraglutide RT, E1). Λαμβάνοντας υπ' όψιν το μεγάλο πρόβλημα της ανάπτυξη αντίστασης στα διαθέσιμα χημειοθεραπευτικά μέσα (πχ σισπλατίνη), δηλαδή την αδυναμία τους να διατηρήσουν την καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο χρόνο, προκύπτει από τις παρούσες εργασίες ότι η εξενατίδη διατηρεί την ικανότητα της για καταστολή του πολλαπλασιασμού των

κυττάρων ηπατώματος στο χρόνο, δηλαδή δεν αναπτύσσεται αντίσταση σε αυτήν in vitro. Πράγματι, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 7, η επαναθεραπεία με εξενατίδη (exenatide RT), παρουσιάζει σταθερή και γραμμική διατήρηση της καταστολής του πολλαπλασιασμού ενώ αντίθετα η επαναθεραπεία με σισπλατίνη (cisplatin RT), που εξυπηρετεί το ρόλο του θετικού μάρτυρα, μετά την αρχική κατακρήμνιση του πολλαπλασιασμού, οδηγεί σε σημαντική αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού, υποδεικνύοντας ανάπτυξη αντίστασης. Αυτή η παρατήρηση, που χρειάζεται περαιτέρω μελέτη, μπορεί να αποτελέσει ελπίδα για ανάπτυξη νέων χημικοθεραπευτικών μέσων με βελτιωμένες ιδιότητες.

## 7.10 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ

Με δεδομένο τον κεντρικό ρόλο των TGF- $\alpha$  και HGF στην ικανότητα μετάστασης των ανθρώπινων κυττάρων ηπατώματος HuH7, φάνηκε ότι το GLP-1 ανάλογο σε δόση 200 $\mu$ M κατέστειλε σε σημαντικό βαθμό την επαγόμενη από τους παραπάνω παράγοντες μεταστατική δυναμική ( $p < 0,05$  compared to the value of TGF- $\alpha$  alone και  $p < 0,05$  compared to the value of TGF- $\alpha$  alone αντιστοίχως, E5). Η παραπάνω παρατήρηση ενισχύθηκε από την διαπίστωση, κατά την οποία όταν το GLP-1 ανάλογο προστέθηκε στις κυτταροκαλλιέργειες απουσία TGF- $\alpha$  και HGF δεν προκάλεσε καμιά μείωση της μετανάστευσης.

Επιπροσθέτως, μελετήθηκε πειραματικά ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο το GLP-1 ανάλογο αναστέλλει την επαγόμενη από τους TGF- $\alpha$  και



Διάγραμμα 8

HGF μετανάστευση και βρέθηκε ότι αυξάνει σημαντικά την συγκέντρωση του

ενδοκυττάριου cAMP ( $p < 0.05$ , compared to the value of the control cells without the stimulation, E5) και αυτό ακριβώς προκαλεί την καταστολή των υπεύθυνων αυξητικών παραγόντων ( $p < 0.05$ , E5), μέσω διέγερσης της PKA ( $p < 0.05$ , E5). Όταν στις κυτταροκαλλιέργειες προστέθηκαν TGF- $\alpha$  και HGF με GLP-1 ανάλογο και επιπλέον αναστολέα PKA (H89), παρατηρήθηκε πλήρης αναστροφή της ευεργετικής δράσης του GLP-1 σχετικά με την μετανάστευση. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το GLP-1 ανάλογο προκάλεσε σημαντική εξασθένηση της φωσφορυλίωσης του SAPK/JNK από τους TGF- $\alpha$  και HGF ( $p < 0,05$  και για τα δύο, E5), όπου και αυτό το φαινόμενο φάνηκε να εξαρτάται από την προκαλούμενη από το GLP-1 ανάλογο αύξηση του cAMP. Συμπεραίνεται συνεπώς, πως το GLP-1 ανάλογο αυξάνει το ενδοκυττάριο cAMP, το οποίο με τη σειρά του αφ' ενός ενεργοποιεί την PKA και αφετέρου προκαλεί σημαντική εξασθένηση της φωσφορυλίωσης του SAPK/JNK από τους TGF- $\alpha$  και HGF με κοινό αποτέλεσμα την ανασταλτική δράση στους TGF- $\alpha$  και HGF και ως εκ τούτου αναστολή της μετανάστευσης των HuH7. Η υπόθεση που προκύπτει από το πείραμα συνοψίζονται στο Διάγραμμα 8.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### 8.1 ΚΥΡΙΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

#### 8.1.1 ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

**Το πρωτεύον συμπέρασμα** που εξάγεται από την παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση είναι ότι GLP-1 αγωνιστές φαίνεται να αναστέλλουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων ηπατώματος στις κυτταροκαλλιέργειες *in vitro*, να μειώνουν το μέγεθος του όγκου του ΗΚΚ *in vitro* στα πειραματόζωα και να αναστέλλουν το μεταστατικό δυναμικό τους.

**Σα δευτερεύον συμπέρασμα** της ανασκόπησης προκύπτει ότι ο πιο σημαντικός μηχανισμός με τον οποίο τα GLP-1 ανάλογα (με πιο καλά μελετημένη τη λιραγλουτίδη) αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και άρα επιδεικνύουν χημειοθεραπευτική δράση στο ΗΚΚ είναι η πρόκληση αυτοφαγίας μέσω αναστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR.

Επιπλέον ασκούν χημειοθεραπευτικές ιδιότητες μέσω πρόκλησης κυτταρικής γήρανσης και ανοσολογικής νέκρωσης (ογκόλυση), μέσω ενίσχυσης της κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων εναντίον των καρκινικών κυττάρων και αύξησης της ευαισθησίας των κυττάρων του ηπατώματος στην κυτταρική λύση.

Η χημειοθεραπευτική ιδιότητα των GLP-1 αγωνιστών, λοιπόν, αναζητήθηκε και προκύπτει, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω, μέσω ενισχυτικής τους επίδρασης στους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου (αυτοφαγία, γηρασμός, ανοσολογική νέκρωση, με αμφιλεγόμενη την επίδραση τους στην απόπτωση), και στα πολλαπλά μονοπάτια μοριακής σηματοδότησης που σχετίζονται με αυτόν (mTOR, JNK, IL-6/STAT3, TGF-β1).

Τέλος, το αν οι είναι ικανοί να επάγουν απόπτωση στα κύτταρα ηπατώματος είναι αμφιλεγόμενο αφού τα στοιχεία από τις λιγοστές μελέτες είναι αντικρουόμενα.

Θα ακολουθήσει αναλυτική παράθεση των συμπερασμάτων που προκύπτουν από την παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση με τους εξής τίτλους: επιβίωση καρκινικών κυττάρων (viability), κυτταροτοξικότητα και νέκρωση, απόπτωση, αυτοφαγία, γήρανση, διατήρηση καταστολής πολλαπλασιασμού και μετανάστευση.

### **8.1.2 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ**

Τα ηπατοκύτταρα, όπως είναι πλέον γνωστό, διαθέτουν υποδοχείς GLP-1 [62,63], διαμέσω των οποίων οι GLP-1 αγωνιστές ασκούν τη δράση τους. Η ευρεία και αποτελεσματική τους χρήση στη θεραπεία του ΣΔ2, της μη αλκοολικής λιπώδους διήθησης του ήπατος και της παχυσαρκίας, οδήγησε στη συσσώρευση παρατηρήσεων για την πιθανή αντινεοπλασματική τους δράση. Πράγματι, υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία όπου οι GLP-1 αγωνιστές μείωσαν *in vitro* το ρυθμό πολλαπλασιασμού σε ποικίλα νεοπλάσματα, όπως προστάτη, μαστού και παγκρέατος[44,45,46].

Η παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση στηρίζει τα παραπάνω δεδομένα, αφού φαίνεται ότι η επώαση των κυττάρων ηπατώματος, ανθρώπινων ή ποντικών, με GLP-1 ανάλογο προκαλεί μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους στις κυτταροκαλλιέργειες σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Μάλιστα, η μείωση του ρυθμού φαίνεται να είναι δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη, καθώς τόσο η αύξηση του χρόνου έκθεσης και της δόσης αυξάνουν τη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, η εξενατίδη επιδεικνύει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη μείωση των ζώντων κυττάρων από τη λιραγλουτίδη.

### 8.1.3 ΟΓΚΟΛΥΣΗ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΝΕΚΡΩΣΗ

Η εφαρμογή ανοσοθεραπείας, αποτελεί μια σχετικά πρόσφατη και πολλά υποσχόμενη επιλογή τους ασθενείς με ΗΚΚ, καθώς συσσωρεύονται ενδείξεις ότι το φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον του ΗΚΚ συμβάλλει στην καταστολή των ανοσολογικών κυττάρων και μηχανισμών που έχουν αντινεοπλασματική δράση, όπως τα NK κύτταρα της φυσικής ανοσίας. Στο μικροπεριβάλλον του ΗΚΚ, το σηματοδοτικό μονοπάτι IL-6/STAT3 παίζει κεντρικό ρόλο στη συντήρηση της φλεγμονής του μικροπεριβάλλοντος[54] και ως εκ τούτου ευοδώνει την ανάπτυξή του, δηλαδή την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διεισδυτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων στους ιστούς[55]. Επιπλέον, διαδραματίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση του συστήματος φυσικής ανοσίας, συμπεριλαμβανομένων των NK cell, ειδικά στους καρκινοπαθείς. καταστέλλοντας την αντινεοπλασματική ανοσιακή απάντηση του οργανισμού απέναντι τον όγκο[56]. Με βάση τα παραπάνω, η ανοσοθεραπεία παραμένει βασικός και πολλά υποσχόμενος πυλώνας της θεραπείας στο ΗΚΚ. Επιπλέον, τα GLP-1 ανάλογα, με καλύτερα μελετημένα τη λιραγλουτίδη, έχει βρεθεί ότι ασκούν αντιφλεγμονώδη δράση το μικροπεριβάλλον της στεατοηπατίτιδας [64] και έτσι χρησιμοποιούνται με επίσημη ένδειξη για τη θεραπεία της (μελέτη LEAN).

Από την παρούσα ανασκόπηση προκύπτει ότι οι GLP-1 αγωνιστές, ειδικότερα η λιραγλουτίδη, επιδεικνύει αντινεοπλασματικές και χημειοθεραπευτικές ιδιότητες στις κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων ηπατώματος και στους ηπατοκυτταρικούς όγκους ποντικών, μέσω ενίσχυσης της κυτταρικής νέκρωσης από τα NK κύτταρα και της αύξησης της ευαισθησίας των ηπατοκυττάρων στην ογκόλυση από τα NK κύτταρα. Και τα δύο αυτά φαινόμενα, φάνηκε να οφείλονται στην καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού IL-6/STAT3 από τον GLP-1 αγωνιστή. Κοντολογίς, στην

παρούσα ανασκόπηση φωτίζεται μια νέα ιδιότητα των GLP-1 αγωνιστών, αυτή της ενίσχυσης της αντινεοπλασματικής δραστηριότητας του συστήματος φυσικής ανοσίας. Αν και σε γενικές γραμμές η αντινεοπλασματική ανοσολογική απάντηση του ανθρώπινου οργανισμού διαμεσολαβείται από τα CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα, η χρήση λιραγλουτίδης την ενίσχυσε με τη μεσολάβηση των NK κύτταρων της φυσικής ανοσίας και όχι μέσω των CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων.

#### 8.1.4 ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Η ανάπτυξη ΗΚΚ έχει ως υπόβαθρο τον αλόγιστο πολλαπλασιασμό και την ελαττωμένη απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Οι σηματοδοτικοί οδοί που ρυθμίζουν την απόπτωση φαίνεται να παίζουν κεντρικό ρόλο στην ηπατοκαρκινογένεση και αντίστοιχα η αναστολή τους να έχει πιθανά ευεργετική επίδραση. Το σηματοδοτικό μονοπάτι της JNK κινάσης, ανήκει στην οικογένεια των MAPK κινασών, εμπλέκεται στην προαγωγή της ανάπτυξης ΗΚΚ, αλλά επιπλέον ρυθμίζει και τις διαδικασίες του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της διείσδυσης και της μετανάστευσης[65].

Τα πειραματικά στοιχεία της παρούσας ανασκόπησης για την επίδραση των GLP-1 αγωνιστών στην απόπτωση βρέθηκαν να είναι αντιφατικά. Από τη μία, προκύπτει ότι η χορήγηση GLP-1 δεν επάγει απόπτωση στα κύτταρα του ηπατώματος σε βαθμό που να προκαλεί στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα στην αναστολή του πολλαπλασιασμού τους. Από την άλλη, παρουσία GLP-1 αγωνιστή, καταστέλλονται τα επίπεδα της ενεργοποιημένης JNK κινάσης (p-JNK), με επακόλουθο τη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων ηπατώματος μέσω αύξησης του ρυθμού απόπτωσής τους. Τα διαφορετικά αποτελέσματα οφείλονται εν μέρει στις διαφορετικές μεθόδους μελέτης της απόπτωσης και στις διαφορετικές συγκεντρώσεις

GLP-1 αγωνιστή που χορηγήθηκε, αλλά σίγουρα απαιτείται περαιτέρω μελέτη για να διευκρινιστεί αυτή η σχέση και κατά συνέπεια η κλινική εφαρμογή της.

#### **8.1.5 ΓΗΡΑΝΣΗ**

Όταν μελετήθηκε σε μοντέλα πειραματόζων, η επαγωγή κυτταρικής γήρανσης στα καρκινικά κύτταρα φάνηκε να συνδέεται με αντικαρκινικά αποτελέσματα, όπως αναστολή της εξέλιξης του όγκου[66]. Παράλληλα, ο TGF- $\beta$  βρέθηκε να είναι η κύρια κυτταροκίνη που έχει την ικανότητα να επάγει μαζικά γήρανση σε σειρές κυττάρων ηπατώματος[50].

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, από την παρούσα ανασκόπηση προκύπτει ότι από τα GLP-1 ανάλογα που χρησιμοποιήθηκαν, μόνο η λιραγλουτίδη και όχι η εξενατίδη έχει την ικανότητα να επάγει γήρανση σε στατιστικά σημαντικό αριθμό κυττάρων ηπατώματος με συνακόλουθη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους. Η δράση της δε αυτή, φαίνεται να διαμεσολαβείται από την αύξηση που προκαλεί στα επίπεδα του TGF- $\beta$  in vitro.

#### **8.1.6 ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ**

Η αυτοφαγία αναδεικνύεται σε σημαντικό μηχανισμό ρύθμισης του μεταβολισμού των λιπιδίων, μείωσης της αντίστασης στην ινσουλίνη και καταστολής της καρκινογένεσης[67], ενώ πυκνώνουν οι αναφορές για ευεργετική επίδραση των GLP-1 αγωνιστών σε αυτή [68]. Ρυθμίζεται από ένα σύνθετο πλέγμα μηχανισμών, με το σηματοδοτικό μονοπάτι της πρωτεΐνης mTOR να είναι ο πιο σημαντικός μηχανισμός καταστολής της[69]. Έχει επίσηςδειχθεί ότι οι GLP-1 αγωνιστές ασκούν τις ευεργετικές τους δράσεις στην ύφεση της φλεγμονής στη NASH, μέσω επαγωγής της αυτοφαγίας, που διαμεσολαβείται από την καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού mTOR[70].

Σε συνάφεια με τα παραπάνω, από την παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση προκύπτει ότι οι GLP-1 αγωνιστές σε ποικίλες δόσεις προκαλούν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό την επαγωγή αυτοφαγίας μέσω αναστολής της έκφρασης της πρωτεΐνης mTOR και μέσω ακριβώς αυτής της διαδικασίας ασκούν χημειοθεραπευτική δράση τα κύτταρα του ηπατώματος, μειώνοντας το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους. Φαίνεται δε ότι ανάμεσα στις διαδικασίες προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που προκαλούν *in vitro* αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του ηπατώματος, η αυτοφαγία είναι ο πιο αποτελεσματικός.

#### **8.1.7 ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ (REGROWTH)**

Ένα κοινό και σοβαρό πρόβλημα αναφορικά με τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται ως χημειοθεραπευτικά, πχ σισπλατίνη, στη θεραπεία νεοπλασμάτων είναι η ανάπτυξη αντοχής σε αυτά, με αποτέλεσμα μείωση της αποτελεσματικότητάς τους με επακόλουθο την εξέλιξη του υποκείμενου καρκίνου[71]. Η σισπλατίνη, όντας παλιό και ευρέως χρησιμοποιούμενο χημειοθεραπευτικό μέσο σε μεγάλη ποικιλία νεοπλασμάτων, αποτελεί πρότυπο σύγκρισης στη μελέτη αντικαρκινικών φαρμάκων. Κατά τη διάρκεια της χορήγησης της, όμως, τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αντοχή.

Τα πειραματικά αποτελέσματα που προκύπτουν από την παρούσα ανασκόπηση, φωτίζουν ότι η εξενατίδη, σε αντίθεση με τη σισπλατίνη, διατηρεί το χημειοθεραπευτικό της αποτέλεσμα στο χρόνο, εγείροντας υπόνοιες ότι δεν αναπτύσσεται αντίσταση σε αυτή από τα καρκινικά κύτταρα. Η παρατήρηση αυτή είναι σημαντική, καθώς δίνει ελπίδες στην ογκολογική κοινότητα για την εισαγωγή νέων φαρμάκων με βελτιωμένες ιδιότητες, είτε της εξενατίδης καθ'εαυτής είτε φαρμάκων που δρουν με παρόμοιο τρόπο με αυτή .

Αντίθετα, η λιραγλουτίδη, δε φάνηκε να έχει τέτοιες ιδιότητες.

### 8.1.8 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ

Στις ημέρες μας, διατίθενται οριστικές (curative) θεραπείες για το ΗΚΚ. Παρ'όλα αυτά, μιας και στο 90% αναπτύσσεται σε έδαφος κίρρωσης η οποία δε θεραπεύεται, το ποσοστό υποτροπής ή ανάπτυξης de novo ΗΚΚ, παραμένει υψηλό, στο 70%. Ο υποκείμενος μηχανισμός μετάστασης στο ΗΚΚ, δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως και επιπλέον δεν υπάρχουν αποτελεσματικά μέτρα για την πρόληψή της. Είναι γνωστό ότι μια ποικιλία αυξητικών παραγόντων με τους υποδοχείς τους εμπλέκονται στην μεταστατική ικανότητα του ΗΚΚ, με προεξάρχοντες τον TGF- $\alpha$  με τον υποδοχέα του (epidermal growth factor receptor, EGFR) και τον HGF με τον υποδοχέα του (c-mesenchymal-epithelial transition factor receptor, c-MET), καθιστώντας και τους δύο αντικείμενα μελέτης στο ΗΚΚ[57]. Παράλληλα, με την παγίωση της γνώσης ότι τόσο ο ΣΔ2, όσο και η NAFLD αποτελούν παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης ΗΚΚ, η χρήση των GLP-1 αγωνιστές πέραν των θεραπευτικών τους αποτελεσμάτων, φάνηκε να αναστέλλουν και την επαγόμενη από αυτές ηπατοκαρκινογένεση σε πειραματικά μοντέλα διαβητικών ποντικών[58].

Από την παρούσα εργασία, προκύπτει ότι τα GLP-1 ανάλογα καταστέλλουν σε σημαντικό βαθμό την επαγόμενη από τους TGF- $\alpha$  και HGF μεταστατική ικανότητα των κυττάρων ηπατώματος στις κυτταροκαλλιέργειες. Η καταστολή τους είναι αποτέλεσμα της επαγόμενης από το GLP-1 ανάλογο αύξηση του ενδοκυττάριου cAMP και της συνακόλουθης ενεργοποίησης της PKA., ενώ έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική εξασθένιση της φωσφορυλίωσης του SAPK/JNK, μόρια που μπλέκονται στην ικανότητα μετάστασης των κυττάρων ηπατώματος.

## 8.2 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗΣ

Στο σύνολο της, η παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση αναδεικνύει την ευεργετική δράση των GLP-1 αγωνιστών, ως χημειοθεραπευτικών παραγόντων, στα κύτταρα ηπατώματος σε κυτταροκαλλιέργειες.

Τα θετικά αυτά αποτελέσματα, αν και προκαλούν ενθουσιασμό, χρειάζεται να διαβαστούν κάτω από το πρίσμα των περιορισμών που ενέχονται στις ανασκοπούμενες εργασίες, οι οποίοι θα αναλυθούν παρακάτω.

Πρώτον, δε χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος GLP-1 αγωνιστής σε όλα τα πειράματα και ως εκ τούτου δεν είναι δυνατόν να γενικευτεί το όποιο θετικό αποτέλεσμα ενός μορίου σε όλα τα GLP-1 ανάλογα, αφού καθένα από αυτά έχει διαφορετική φαρμακοκινητική και μοριακή δομή. Πρακτικά, η γενίκευση πρέπει να βασιστεί σε πειράματα σε κάθε διαθέσιμο μόριο GLP-1 ξεχωρίστα.

Δεύτερον, οι δόσεις GLP-1 αγωνιστών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζουν ανομοιογένεια και μεγάλο εύρος τιμών (ελάχιστο: 0,01  $\mu$  M και μέγιστο: 20  $\mu$  M), γεγονός που επίσης δεν επιτρέπει γενίκευση για την ποσοτικοποίηση της δόσοεξαρτώμενης και χρονοεξαρτώμενης δράσης τους. Αν σκεφτούμε ότι το 1  $\mu$ mol λιραγλουτιδης αντιστοιχεί σε περίπου 1,8 mg, γίνεται αντιληπτό ότι οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν στις εργασίες απέχουν από τις εγκεκριμένες θεραπευτικές δόσεις της λιραγλουτιδης στον άνθρωπο, κάτι που ούτως ή άλλως μελετάται σε μελέτες φάσης II.

Τρίτον, οι εργαστηριακές μέθοδοι και τα διαγνωστικά χημικά διαλύματα (set) που χρησιμοποιήθηκαν για την διερεύνηση της επίδρασης των GLP-1 αναλόγων στις διαδικασίες του κυτταρικού θανάτου δεν είναι ταυτόσημες και άρα δε μπορεί να προκύψει τελικό ποσοτικό αποτέλεσμα, αλλά μόνο ένδειξη.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από 4 διαφορετικές κυτταρικές σειρές ηπατώματος, όπου πέραν της αθανασίας ως κοινό χαρακτηριστικό τους, παρουσιάζουν διαφορές αναφορικά με τις λειτουργίες και την έκφραση πρωτεϊνών. Συνεπώς, η επίδραση ενός GLP-1 αγωνιστή σε ένα από αυτά μπορεί να επιβεβαιώνεται τα υπόλοιπα λόγω διαφορετικής έκφρασης πρωτεϊνών.

### 8.3 ΚΕΝΑ ΣΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Στην κλινική πράξη, συχνά ερχόμαστε αντιμέτωποι με διαβητικούς ή παχύσαρκους ασθενείς, που σε αυτό το έδαφος αναπτύσσουν ΗΚΚ, ενώ παράλληλα εμφανίζουν ήπια διαταραχή ηπατικής λειτουργίας, όπως ποσοτικοποιείται με το Child Pugh score. Αυτοί οι ασθενείς είναι υποψήφιοι για οριστικές θεραπείες που προσδίδουν καλό προσδόκιμο επιβίωσης και άρα είναι ζωτικής σημασίας η αυστηρή γλυκαιμική ρύθμιση και η απώλεια βάρους. Τίθεται λοιπόν επιτακτικά το ζήτημα για το ρόλο των GLP-1 αγωνιστών σε αυτήν την ειδική κατηγορία ασθενών: συνέχιση ή διακοπή;

Αρχικά, δεν υπάρχουν μελέτες σε ανθρώπους που να περιγράφουν την επίδραση των GLP-1 αναλόγων σε ασθενείς που αναπτύσσουν ΗΚΚ και συνεχίζουν να είναι υπό αγωγή με GLP-1.

Επίσης, αν και δεν αντενδείκνυται η χρήση GLP-1 αγωνιστών σε διαβητικούς ή παχύσαρκους ασθενείς με ΗΚΚ, χωρίς σοβαρού βαθμού ηπατοπάθεια (Child Pugh score A και B), σύμφωνα με τα SPC τους, η χορήγησή τους είναι περιορισμένη, αφού αποτελούν ειδική ομάδα ασθενών. Συνεπώς, αν και υπάρχουν ενδείξεις από μελέτες σε πειραματόζωα, δεν έχει καταστεί δυνατόν να μελετηθεί η επίδραση των GLP-1 αγωνιστών στην εξέλιξη του ΗΚΚ στον ανθρώπινο οργανισμό.

Τέλος, δεν υπάρχει βιβλιογραφία για την επίδραση των GLP-1 αναλόγων σε επιπλοκές της χρόνιας ηπατικής νόσου που κατά κανόνα συνυπάρχει με την

ανάπτυξη ΗΚΚ, όπως η πυλαία υπέρταση και οι επιπλοκές της. Αυτό το κενό, καθιστά την επιστημονική κοινότητα διστακτική στη χορήγηση GLP-1 αναλόγων σε διαβητικούς και παχύσαρκους ασθενείς με ΗΚΚ.

#### **8.4 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ**

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, που προκύπτουν από την παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση σε συνδυασμό με τα προαναφερθέντα κενά τη βιβλιογραφία, ελπίζουμε να αποτελέσουν βάση για περαιτέρω μελέτη της σχέσης των GLP-1 αγωνιστών με το ΗΚΚ σε ανθρώπους.

Η μελέτη αυτή μπορεί να διεξαχθεί στα πλαίσια διδακτορικής διατριβής ή ερευνητικού πρωτοκόλλου από τα μεγάλα διαβητολογικά και ηπατολογικά κέντρα της χώρας μας, με την ελπίδα ότι στις πλειοτροπικές δράσεις των GLP-1 θα προστεθεί ακόμα μία: η χημειοθεραπευτική τους επίδραση στο ΗΚΚ.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet>.
- [2]. Ioannou GN, Splan MF, Weiss NS, *et al.* Incidence and predictors of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5:938.
- [3]. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines 2012. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis.
- [4]. Schlesinger S, Aleksandrova K, Pischon T, *et al.* Diabetes mellitus, insulin treatment, diabetes duration, and risk of biliary tract cancer and hepatocellular carcinoma in a European cohort. *Ann Oncol* 2013; 24: 2449–2455.
- [5]. Welzel TM, Graubard BI, Quraishi S, *et al.* Population Attributable Fractions of Risk Factors for Hepatocellular Carcinoma in the United States. *Am J Gastroenterol* 2013; 108: 1314–1321.
- [6]. Hidenori Sh, Kazuhide Y, Masayoshi. Human hepatocyte carcinogenesis (Review), *International Journal of Oncology* 2013; 42: 1133-1138.
- [7]. Schaff Z, Hsia CC, Sarosi I *et al.* Overexpression of transforming growth factor- $\alpha$  in hepatocellular carcinoma and focal nodular hyperplasia from European patients. *Hum Pathol* 1994; 25: 644-65.
- [8]. Singh S, Singh PP, Singh AG, *et al.* Statins are associated with a reduced risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* 2013; 144(2):323-332.
- [9]. Simon TG, Ma Y, Ludvigsson JF, *et al.* Association Between Aspirin Use and Risk of Hepatocellular Carcinoma. *JAMA Oncol* 2018; 4:1683.

- [10]. Tseng CH. Metformin and risk of hepatocellular carcinoma in patients with type 2 diabetes. *Liver Int* 2018; 38(11):2018-2027.
- [11]. Bravi F, Tavani A, Bosetti C, *et al.* Coffee and the risk of hepatocellular carcinoma and chronic liver disease: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer Prev* 2017; 26:368.
- [12] Freedman ND, Cross AJ, McGlynn KA, *et al.* Association of meat and fat intake with liver disease and hepatocellular carcinoma in the NIH-AARP cohort. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102:1354.
- [13] Baumeister SE, Schlesinger S, Aleksandrova K, *et al.* Association between physical activity and risk of hepatobiliary cancers: A multinational cohort study. *J Hepatol* 2019; 70:885.
- [14]. Prasad V, Lenzer J, Newman DH. Why cancer screening has never been shown to “save lives” and what we do about it. *BMJ* 2016; 352: h6080.
- [15]. Tzartzeva K, Obi J, Rich NE, *et al.* Surveillance Imaging and Alpha Fetoprotein for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis: A Meta-analysis. *Gastroenterology*. 2018;154(6):1706–1718.
- [16]. Tayob N, Lok AS, Do KA, *et al.* Improved Detection of Hepatocellular Carcinoma by Using a Longitudinal Alpha-Fetoprotein Screening Algorithm. *Clinical gastroenterology and hepatology* 2016;14(3):469–475.
- [17]. Lee E, Edward S, Singal AG, *et al.* Improving screening for hepatocellular carcinoma by incorporating data on levels of alpha-fetoprotein, over time. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2013;11(4):437–440.

- [18]. White DL, Richardson P, Tayoub N, *et al.* The Updated Model: An Adjusted Serum Alpha-Fetoprotein-Based Algorithm for Hepatocellular Carcinoma Detection With Hepatitis C Virus-Related Cirrhosis. *Gastroenterology*. 2015;149(7):1986–1987.
- [19]. Kim SY, An J, Lim YS, *et al.* MRI With Liver-Specific Contrast for Surveillance of Patients With Cirrhosis at High Risk of Hepatocellular Carcinoma. *JAMA oncology*. 2017;3(4):456–463.
- [20]. Yu M-W, Yeh S-H, Chen P-J, *et al.* Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:265–272.
- [21]. Cucchetti A, Piscaglia F, Cescon M, *et al.* Cost-effectiveness of hepatic resection vs. percutaneous radiofrequency ablation for early hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2013; 59:300–307.
- [22]. Lencioni R, de Baere T, Soulen MC, *et al.* Lipiodol transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: A systematic review of efficacy and safety data. *Hepatology* 2016; 64: 106–116.
- [23]. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359:378–390.
- [24]. Topalian, S. L., Drake, C. G., Pardoll, D. M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 2015; 27:451–461.
- [25]. Fehmann HC, Goke R, Goke B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide 1 and glucose dependent insulin releasing polypeptide. *Endocr Rev* 1995; 16:390–410.

- [26]. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 2006; 368:1696–170.
- [27]. Yip RGC, Wolfe MM. GIP biology and fat metabolism. *Life Sci* 2000; 66:91–103.
- [28]. Wang, X., Zhou, J., Doyle, M.E., *et al.* Glucagon-like peptide-1 causes pancreatic duodenal homeobox-1 protein translocation from the cytoplasm to the nucleus of pancreatic beta-cells by a cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A-dependent mechanism. *Endocrinology* 2001;142: 1820-1827.
- [29]. Li Y., Cao X., Li L.X., *et al.* betaCell Pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1. *Diabetes* 2005; 54:482-491.
- [30]. Burcelin R, Da Costa A, Drucker D, *et al.* Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes* 2001; 50: 1720–1728.
- [31]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Liraglutide>
- [32]. M Marre<sup>1</sup>, J Shaw, M Brändle, *et al.* Liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue, added to a sulphonylurea over 26 weeks produces greater improvements in glycaemic and weight control compared with adding rosiglitazone or placebo in subjects with Type 2 diabetes (LEAD-1 SU), *Diabet Med* 2009 ; 26(3):268-278.
- [33]. Xavier Pi-Sunyer, M.D., Arne Astrup, M.D., D.M.Sc., *et al.* A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management, *N Engl J Med* 2015; 373:11-22.

- [34]. Muskiet MHA, Smits MM, Morsink LM, *et al.* The gut-renal axis: do incretin-based agents confer renoprotection in diabetes? *Nat Rev Nephrol* 2014;10:88–103.
- [35]. Bergenstal RM, Wysham C, Macconell L, *et al.* Efficacy and safety of exenatide once weekly versus sitagliptin or pioglitazone as an adjunct to metformin for treatment of type 2 diabetes (DURATION-2): a randomised trial. *Lancet* 2010; 376:431–439.
- [36]. Pfeffer M.A., Claggett B., Diaz R., Lixisenatide in Patients with Type 2 Diabetes and Acute Coronary Syndrome . *N Engl J Med* 2015; 373:2247-2257.
- [37]. Armstrong, MJ, Gaunt, P, Aithal, GP *et al.* Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study, *The Lancet* 2016; 387: 679–690.
- [38]. Marso S.P., Daniels G.H., Brown-Frandsen K., *et al.* Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes, *N Engl J Med* 2016; 375:311-322.
- [39]. Pi-Sunyer X., Astrup A., Fujioka K., *et al.* A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management, *N Engl J Med* 2015; 373:11-22.
- [40]. Perry, T., Haughey, N.J., Mattson, M.P., *et al.* Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002; 302:881-888.
- [41] Qi, L., Ke, L., Liu, X., *et al.*. Subcutaneous administration of liraglutide ameliorates learning and memory impairment by modulating tau hyperphosphorylation via the glycogen synthase kinase-3 $\beta$  pathway in an amyloid  $\beta$  protein induced alzheimer disease mouse model. *European Journal of Pharmacology* 2016; 783:23-32.

- [42]. Athauda, D., Maclagan, K., Skene, *et al.* 2017. Exenatide once weekly versus placebo in Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2017; 390:1664-1675.
- [43] Chang, C.C., Lin T.C., Ho H.L., *et al.* GLP-1 analogue liraglutide attenuates mutant huntingtin-induced neurotoxicity by restoration of neuronal insulin signaling. *International Journal of Molecular Sciences* 2018; 19(9):2505.
- [44]. Zhao W, Zhang X, Zhou Z, *et al.* Liraglutide inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells through downregulation of microRNA-27a expression. *Mol Med Rep* 2018; 17: 5202-5212.
- [45]. Zhao H, Wang L, Wei R, *et al.* Activation of glucagon-like peptide-1 receptor inhibits tumorigenicity and metastasis of human pancreatic cancer cells via PI3K/Akt pathway. *Diabetes Obes Metab.* 2014; 16:850-860.
- [46]. Nomiya T, Kawanami T, Irie S, *et al.* Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, attenuates prostate cancer growth. *Diabetes.* 2014; 63:3891-3905.
- [47] Jennifer Rotonda, Donald W. Nicholson, *et al.* The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nature Structural Biology* 1996; 3: 619–625.
- [48]. Das M, Garlick DS, Greiner DL, *et al.* The role of JNK in the development of hepatocellular carcinoma. *Genes Dev* 2011; 25: 634-645.
- [49]. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:729–740.

- [50]. Senturk, S., Mumcuoglu, M., Gursoy-Yuzugullu, O., *et al.* Transforming growth factor-beta induces senescence in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth. *Hepatology* 2010; 52, 966–974.
- [51]. White E., DiPaola R.S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15: 5308–5316.
- [52]. Lu, Z., Luo, R.Z., Lu, Y., *et al.* The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J. Clin. Investig.* 2008; 118: 3917–3929.
- [53]. H. Sun, C. Sun, Z. Tian, *et al.* NK cells in immunotolerant organs. *Cellular & Molecular Immunology* 2013;10: 202–212.
- [54]. H. Yu, D. Pardoll, R. Jove. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* 2009; 9: 798–809.
- [55]. J. Lokau, V. Schoeder, J. Haybaeck, *et al.* Jak-Stat signaling induced by interleukin-6 family cytokines in hepatocellular carcinoma. *Cancers* 2019; 11:1704.
- [56]. M.K. Mirjačić, T. Srdić-Rajić, N. Babović, *et al.* Decreased expression of pSTAT, IRF-1 and DAP10 signalling molecules in peripheral blood lymphocytes of patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Pathol.* 2016; 69: 300–306.
- [57]. A.K. Chow, S.W. Yau, L. Ng. Novel molecular targets in hepatocellular carcinoma. *World J. Clin. Oncol.* 2020; 11:589–605.
- [58]. M. Kojima, H. Takahashi, T. Kuwashiro, *et al.* Glucagon-like peptide-1 receptor agonist prevented the progression of hepatocellular carcinoma in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis, *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21: 5722.

- [59]. Moscato, Stefania, *et al.*, Polyvinyl alcohol/gelatin Hydrogels Cultured with Hep G2 Cells as a 3D Model of Hepatocellular Carcinoma: A Morphological Study, *Journal of Functional Biomaterials* 2015;6 :16–32.
- [60]. G.M. Konjević, A.M. Vuletić, M.K. Mirjačić, A.K. *et al.* The role of cytokines in the regulation of NK cells in the tumor environment, *Cytokine* 2019;117: 30–40.
- [61]. Natalicchio A, De Stefano F, Orlando MR, *et al.* Exendin-4 prevents c-Jun N-terminal protein kinase activation by tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) and inhibits TNFalpha-induced apoptosis in insulin-secreting cells. *Endocrinology* 2010; 151: 2019-2029.
- [62]. Yoo J, Cho IJ, Jeong IK, *et al.*, Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, reduces hepatic steatosis and endoplasmic reticulum stress by inducing nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2 nuclear translocation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018; 360:18-29.
- [63]. N.A. Gupta, J. Mells, R.M. Dunham, *et al.*, Glucagon-like peptide-1 receptor is present on human hepatocytes and has a direct role in decreasing hepatic steatosis in vitro by modulating elements of the insulin signaling pathway, *Hepatology* 2010; 51:1584-1592.
- [64]. D.H. Ipsen, B. Rolin, G. Rakipovski, *et al.*, Liraglutide decreases hepatic inflammation and injury in advanced lean non-alcoholic steatohepatitis, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2018; 123: 704–713.
- [65]. Min L, He B, Hui L. Mitogen-activated protein kinases in hepatocellular carcinoma development. *Semin Cancer Biol* 2011; 21: 10-20.

- [66]. Sharpless, N.E., Bardeesy, N., Lee, *et al.*, Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 2001; 413: 86–91.
- [67]. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018; 19:349-64.
- [68]. Li Z, Huang L, Yu X, *et al.* Exenatide induces impairment of autophagy flux to damage rat pancreas. *Pancreas.* 2017; 46:83-88.
- [69]. Paquette M, El-Houjeiri L, Pause A. mTOR pathways in cancer and autophagy. *Cancers (Basel)* 2018; 10:18.
- [70]. He Q, Sha S, Sun L, *et al.* GLP-1 analogue improves hepatic lipid accumulation by inducing autophagy via AMPK/mTOR pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; 476:196-203.
- [71]. Rebucci M, Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem Pharmacol.* 2013; 85:1219-26.

