

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Ε. ΠΑΤΣΟΥΡΗΣ

ΜΠΣ : «ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ:
ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ
ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ»

**Η σημασία του Farnesoid X υποδοχέα (FXR)
στον καρκίνο του μαστού**

ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΚΑΡΑΝΔΡΕΑ, ΒΙΟΛΟΓΟΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ, 2017

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη

**ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΣΥΓΧΡΟΝΗ
ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ**

που απονέμει η Ιατρική Σχολή του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Σ. ΘΕΟΧΑΡΗΣ (Επιβλέπων)	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Ν. ΚΑΒΑΝΤΖΑΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Κ. ΓΙΑΓΚΙΝΗΣ	ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	σελ.
Συντομογραφίες.....	3
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	5
1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ.....	5
1.1 Επιδημιολογία	5
1.2 Παράγοντες κινδύνου.....	6
Εικ. 1 Γενετική του καρκίνου του μαστού.....	6
1.3 Επιθηλιακοί όγκοι μαστού.....	6
1.3.1 Προκαρκινικές αλλοιώσεις.....	7
1.3.2 Διηθητικά καρκινώματα μαστού	8
1.4 Μοριακοί υποτύποι καρκίνου του μαστού.....	13
1.5 Σταδιοποίηση.....	14
Πίν. 1 Ταξινόμηση κατά TNM.....	14
Πίν. 2 Σταδιοποίηση.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	17
2 FARNESOID X RECEPTOR.....	17
2.1 Οικογένεια πυρηνικών υποδοχέων	17
Εικ.2 Δομή της πρωτεΐνης FXR.....	18
2.2 Μηχανισμός δράσης πυρηνικών υποδοχέων	18
2.3 Ισομορφές του γονιδίου FXR	19
2.4 Στοιχεία απόκρισης του υποδοχέα στο DNA.....	19
2.5 Κατανομή του FXR στον οργανισμό.....	20
2.6 Προσδέτες του FXR.....	20
Εικ.3 Δομή χολικών οξέων.....	21
2.7 Ρόλος χολικών οξέων.....	21
2.7.1 Η εντεροηπατική λειτουργία των χολικών οξέων και οι φυσιολογικές δράσεις του FXR.....	22
Εικ.4 Σύνθεση χολικών οξέων.....	25
2.7.2 FXR και μεταβολισμός λιπιδίων και τριγλυκεριδίων	26

2.7.3 FXR και μεταβολισμός γλυκόζης.....	27
Εικ.5 Δράση του FXR στην εντεροηπατική λειτουργία.....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	29
3 FXR ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ.....	29
3.1 FXR και καρκίνος του μαστού.....	29
3.2 FXR και άλλοι τύποι καρκίνου.....	32
3.2.1 FXR, καρκίνος χοληφόρου οδού και ήπατος.....	32
3.2.2 FXR και καρκίνος του γαστρεντερικού συστήματος	35
3.2.3 FXR και καρκίνος του παγκρέατος.....	39
3.2.4 FXR και καρκίνος του των όρχεων.....	40
3.2.5 FXR και καρκίνος του προστάτη.....	40
3.2.6 Κλινικές μελέτες.....	41
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	43
4 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
4.1 Ασθενείς.....	43
4.2 Μέθοδοι.....	43
4.2.1 Ανοσοϊστοχημεία.....	43
4.2.2 Εκτίμηση ανοσοϊστοχημείας	44
4.2.3 Στατιστική ανάλυση.....	44
Φωτογραφία ανοσοϊστοχημικής έκφρασης FXR.....	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	46
5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	49
6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	49
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	51
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	53
ABSRTACT.....	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55

Συντομογραφίες

6-ECDCA: 6-Ethyl-chenodeoxycholic acid
ABCB: ATP binding cassette
ADT: Anethol dithiolthione
APC: Adenomatous polyposis coli
Apo: Apolipoprotein
AR: Androgen Receptor
ASBT: Apical sodium acid transporter
ATP: Adenosine triphosphate
BA: Bile acid
BAAT: BA-CoA- aminoacid N-acetyltranrasferase
BACS: BA-CoA synthase
BAR: Bile acid receptor
BCL2L2: B-cell lymphoma 2L2
BSEP: Bile salt export pump
BUB3: Mitotic checkpoint protein
CA: Cholic acid
CAF: Cancer associated fibroblasts
CAR: Constitutive androstane receptor
CARM1: co-activator-associated arginine methyltransferase 1
CCNB1: Cyclin B1
CDCA: Chenodeoxychlic acid
CDK4: Cyclin-dependent kinase 4
Cdx-2: Caudal related homeobox transcription factor
C/EBP: CCAAT- enhancer-binding protein α ?
CREB: cAMP regulatory element-binding protein
COX-2: Cyclogenase-2
CYP7A1: Cytochrome P450 7A1
CYP8B1: Cytochrome P450 8B1
DHT: Dihydrotestosterone
EGFR: Epidermal growth factor receptor
ER: Estrogen receptor
ERK: Extracellular-signal-regulated kinase
EcR: Ecdysone receptor
EXOCS1:
FAS: Fatty acid synthase
FBP1: Fructose 1,6-bis phosphatase
FGF15/19: Fibroblast growth factor 15/19
G6Pase: Glucose-6-phosphatase
HbA1c: Hemoglobin A1c
HBV: Hepatitis B virus
HNF4 α : Hepatic nuclear factor 4 α
HSC: Hepatic stellate cells
IBABP: Intestinal bile acid binding protein
IDL: Intermediate density lipoprotein
IP: Interferon gamma-induced protein 10
LBD: Ligand binding domain
LDL: Low density lipoprotein
LPL: Lipoprotein lipase
LPS: Lipopolysaccaride
LRH1: Liver receptor homologous 1
LRP1: Low density lipoprotein receptor-related protein 1
LXR: Liver X receptor
MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MCM5: Minichromosome maintenance protein
MDR3: Multidrug resistant protein 3
MUC 2: Mucin 2
NF- κ B: Nuclear Factor κ B
NDRG-2: N-myc downstream regulated gene 2
NTCP: Sodium-taurocholate cotransporter protein?
OATP: Organic anion transporting polypeptide?
OST α/β : Organic solute transporter
PAMPs: Pathogen associated molecular patterns
PEPCK: Phosphoenol-pyruvate carboxykinase
PGC1 α : PPAR- γ co-activator 1 α
PKC: Protein Kinase C
PLTP: Phospholipid transfer protein
PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor
PR: Progesterone receptor
PXR: Pregnane X receptor
RAR: Retinoic acid receptor
RE: Responsive element
RXR: Retinoid Xreceptor
SHP: Small heterodimer partner
SLC21A5: Solute carrier family 21
SOCS3: Suppressor of the cytokine signaling 3
SREBP1C: Sterol regulatory element-binding proteins
SULT2A1: Sulphotransferase 2A1
SXR: Steroid xenobiotics receptor
TGF β : Transforming growth factor β
TGR5: Membrane G protein-coupled receptor
TNF α : Tumor necrosis factor α
TR: Thyroid hormone receptor
Topo-II α : Topoisomerase-II α
VDR: Vitamin D receptor
VLDL: Very low density lipoprotein
VAPC1: Vasoactive intestinal peptide receptor-1
VEGF: Vascular endothelial growth factor
UGT2B4: UDP-glucuronosyltransferase
uPA: Urokinase-type plasminogen activator
uPAR: Urokinase-type plasminogen activator receptor
ΗΚΚ: Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ

1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

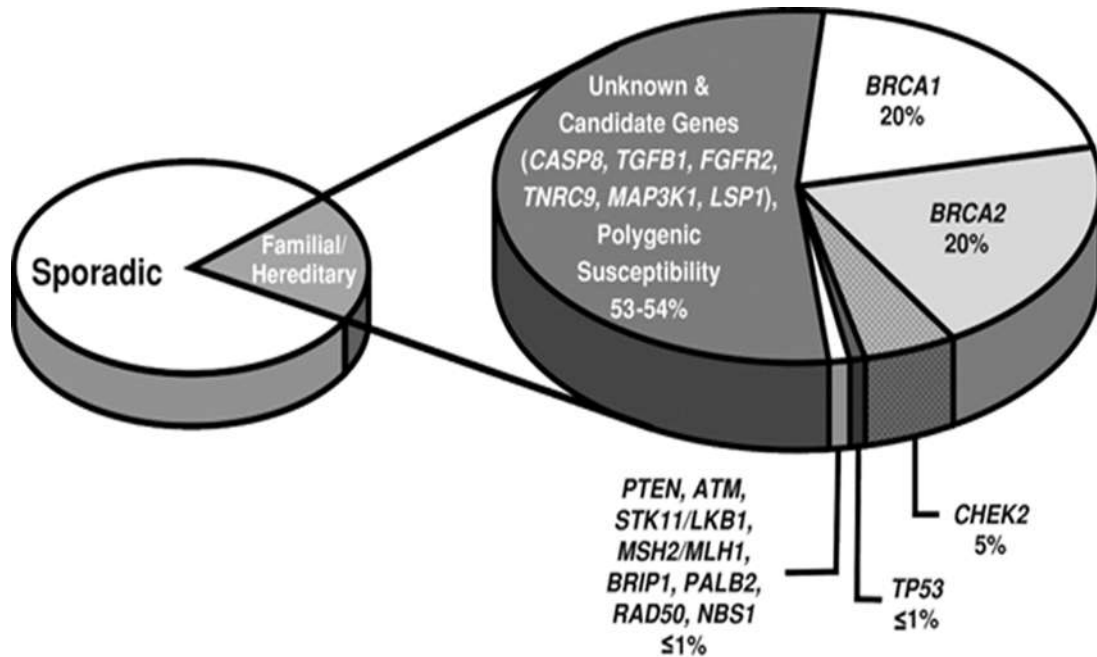
Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον συχνότερα διαγνωσμένο καρκίνο και την κύρια αιτία θανάτου στις γυναίκες, αποτελώντας το 23% των συνόλου των περιπτώσεων εμφάνισης καρκίνου και το 14% του συνόλου των θανάτων από καρκίνο (Jemal A et al. 2011). Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να παρουσιαστεί και σε άνδρες με συχνότητα 100 φορές μικρότερη από ότι στις γυναίκες, συνήθως έχει κακή πρόγνωση λόγω μη έγκαιρης διάγνωσης.

Οποιοδήποτε κύτταρο του μαζικού αδένου μπορεί να μετασχηματιστεί σε καρκινικό, με συνέπεια ο καρκίνος στο μαστό να εμφανίζει ευρύ φάσμα μορφολογικών χαρακτηριστικών, διαφορετικά πρότυπα έκφρασης δεικτών στην ανοσοϊστοχημεία και μοναδικούς ιστοπαθολογικούς τύπους που οδηγούν σε διαφορετική κλινική εικόνα και κλινική πορεία για την ασθενή. Είναι από τους πιο συχνούς καρκίνους στη σύγχρονη εποχή, στο δυτικό κόσμο. Ωστόσο, ο τακτικός έλεγχος με τη μαστογραφία συμβάλλει στον εντοπισμό προκαρκινωματοδών αλλοιώσεων, την πρώιμη διάγνωση και πρόληψη της νόσου (Makki J 2015, Dieci MV et al. 2014).

1.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί πολύπλοκη και ετερογενή νόσο σε τέτοιο βαθμό, ώστε να θεωρείται ότι δεν αποτελεί μία οντότητα, αλλά διαφορετικές, που η κάθε μία παρουσιάζει διαφορετικά ιστοπαθολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά, ανταπόκριση στη θεραπεία, βαθμό κινδύνου υποτροπής και εν γένει διαφορετική βιολογική συμπεριφορά. Ισχυρότατο παράγοντα κινδύνου για τη νόσο αποτελεί το οικογενειακό ιστορικό, καθώς γυναίκες με συγγενή πρώτου βαθμού με καρκίνο του μαστού έχουν δύο φορές υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Οικογενείς μορφές περιλαμβάνουν περίπου το 20% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού και φαίνεται να έχουν διαφορετική παθογένεια και πρόγνωση ανάλογα με το γονίδιο το οποίο εμπλέκεται. Τα υπεύθυνα γονίδια για κληρονομικό καρκίνο του μαστού δεν έχουν πλήρως αναγνωρισθεί. Τα μισά περιστατικά καρκίνων αφορούν μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια (tumor suppressor genes, TSGs) τα περισσότερα από τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες ελέγχου της πιστότητας της αντιγραφής του DNA. Τα δύο πιο γνωστά γονίδια υψηλού κινδύνου είναι τα BRCA1 και BRCA2. Άλλα γονίδια που σχετίζονται με οικογενή καρκινικά σύνδρομα είναι τα p53, PTEN, και ATM. Επιπλέον, χαμηλού έως μέτριου κινδύνου γονίδια αποτελούν τα CHEK2, BRIP1, PALB2, NBS1, RAD50 και τα γονίδια επιδιόρθωσης MSH2 και MLH (Εικ. 1)(Rudolph A, Chang-Claude J. and Schmidt MK, 2016; Michailidou K et al., 2015; Suzanne D et al., 2008). Άλλοι παράγοντες κινδύνου είναι η ηλικία

εμμηναρχής, η ατοκία, η ηλικία κατά την πρώτη γέννα και το θηλασμό και η ηλικία εμμηνόπαυσης. Ακόμα, η εκτεταμένη χρήση ορμονικής θεραπείας, ο υψηλός δείκτης μάζας σώματος (BMI), η έλλειψη σωματικής άσκησης και η κατανάλωση αλκοόλ αποτελούν επίσης παράγοντες υψηλού κινδύνου. (Torre LA et al., 2015; Rudolph A, Chang-Claude J. and Schmidt MK, 2016; Colditz GA, Bohlke K, 2014).



Εικ.1. Γενετική του καρκίνου του μαστού
Susanne D et al. 2008

1.3 ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΙ ΟΓΚΟΙ ΜΑΣΤΟΥ

Τα αδenoκαρκινώματα αποτελούν το 95% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού, με συνηθέστερη διηθητική μορφή το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (invasive ductal carcinoma, IDC) με επίπτωση 55% των διαγιγνωσόμενων περιστατικών. Ο καρκίνος του μαστού προκύπτει από την τελική πορολοβιακή μονάδα (terminal duct lobular unit, TDLU). Γενικά, ο καρκίνος του μαστού διακρίνεται στο *in situ* πορογενές καρκίνωμα (ductal carcinoma *in situ*) και στο πορογενές καρκίνωμα. Το *in situ* πορογενές καρκίνωμα είναι μη επιθετικός, δυνητικά κακοήθης πολλαπλασιασμός των επιθηλιακών κυττάρων που περιορίζονται στους πόρους και στα λόβια. Το επιθετικό ή διηθητικό καρκίνωμα αφορά κακοήθη ανώμαλο πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων τα οποία διεισδύουν στο στρώμα διαπερνώντας το τοίχωμα του πόρου. Ο διηθητικός τύπος και ο *in situ* τύπος

μπορούν περαιτέρω να χαρακτηρισθούν ως πορογενής ή λοβιακός, βάση της προέλευσης του όγκου από τους πόρους ή τα λόβια αντίστοιχα. Όμως τελευταία, η διάκριση μεταξύ των όρων βασίζεται στην ανοσοϊστοχημική έκφραση του δείκτη E-cadherin: Το πορογενές καρκίνωμα εκφράζει το δείκτη ενώ το λοβιακό όχι. (Dieci M.V. et al., 2014; Makki J., 2015).

1.3.1 Προκαρκινικές αλλοιώσεις

Το *in situ* πορογενές καρκίνωμα (Ductal Carcinoma In Situ, DCIS) και η λοβιακή νεοπλασία αποτελούν πρόδρομες αλλοιώσεις του μαστού, ακολουθώντας ωστόσο, διαφορετική κλινική πορεία και απαιτώντας διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση.

Πορογενές καρκίνωμα *in Situ*

Πρόκειται για μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων των πόρων που περιορίζεται στους πόρους ή στα λόβια και χαρακτηρίζεται από κυτταρική και πυρηνική ατυπία. Δυνητικά είναι κακόηθες και με πιθανότητα ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου. Τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα εξωτερικά του πόρου διατηρούνται, αλλά μπορεί να είναι λιγότερα από το φυσιολογικό. Η βλάβη κατά την οποία το πορογενές *in situ* καρκίνωμα επεκτείνεται παντού στους πόρους προς στο λοβιακό αδένιο ονομάζεται καρκινοποίηση των λοβίων.

Το DCIS θεωρείται πρόδρομη αλλοίωση διηθητικού καρκινώματος και αποτελεί παράγοντα υψηλότερου κινδύνου για διηθητικό καρκίνωμα στις γυναίκες που το εμφανίζουν από τις γυναίκες που δεν το εμφανίζουν. Θάνατοι εξ αιτίας του DCIS είναι εξαιρετικά σπάνιοι, εκτός αν διαφύγει του εντοπισμού διηθητικό τμήμα της αλλοίωσης κατά την αρχική διάγνωση ή υποτροπιάσει η διηθητική βλάβη μετά τη θεραπεία.

Μορφολογικά το DCIS διακρίνεται με βάση το αρχιτεκτονικό πρότυπο σε:

- A. Φαγεσωρικό
- B. Ηθμοειδές
- Γ. Θηλώδες
- Δ. Συμπαγές
- E. Μικροθηλώδες

Τα περισσότερα από τα DCIS παρουσιάζουν μεικτό αρχιτεκτονικό πρότυπο.

Σπανιότερες μορφές αποτελούν όγκοι με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου, με νευροενδοκρινική διαφοροποίηση ή πολυτύρηνα γιγαντοκύτταρα, κύτταρα με αποκρινή μετάπλαση και όγκοι με πλακώδη χαρακτηριστικά (Leal C. et al., 2001; Makki J., 2015).

Η πορεία σχηματισμού του DCIS εξαρτάται από τον τύπο και τον βαθμό διαφοροποίησης. Δεν εξελίσσεται απαραίτητα σε διηθητικό αλλά όταν συμβεί αυτό, η διάρκεια εξέλιξης διαρκεί χρόνια. Ο δε κίνδυνος εξέλιξης είναι ανάλογος του βαθμού

κακοήθειας. Το απλό IDC μπορεί να έχει ακολουθήσει διαφορετικά μοριακά μονοπάτια από ότι το IDC που προέρχεται από DCIS.

Λοβιακή υπερπλασία: Λοβιακό καρκίνωμα in situ (LCIS) και Άτυπη Λοβιακή Υπερπλασία (Atypical lobular hyperplasia ALH)

Στα λοβιακά νεοπλάσματα κατατάσσεται το LCIS, το πλειόμορφο λοβιακό καρκίνωμα (Pleomorphic Lobular Carcinoma In Situ, PLCIS) καθώς επίσης και η ALH. Η λοβιακή υπερπλασία αφορά πολλαπλασιασμό, εντός των λοβίων, μικρών, σχεδόν ομοιόμορφων στρογγυλών κυττάρων, χαλαρά συνδεδεμένων μεταξύ τους, που προέρχονται από την τελική ενδολοβιακή μονάδα, με ή χωρίς παζετοειδή ανάμειξη των τελικών λοβίων. Αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη διηθητικού καρκινώματος και συχνά διαγιγνώσκεται τυχαία κατά τη λήψη βιοψίας μαστού για άλλους λόγους. Στο LCIS, η αρχιτεκτονική δομή των λοβίων παραμένει ανέπαφη. Τα κύτταρα είναι μικρού έως μεσαίου μεγέθους, με ορθοχρωματικό πυρήνα. Δεν παρατηρούνται καθόλου ή παρατηρούνται σπάνια πλειομορφισμός, μιτώσεις και νέκρωση που είναι χαρακτηριστικά της ατυπίας (Hanby A.M. and Hughes T.A., 2008; Sinn H.P. and Kreipe H., 2013; Makki J., 2015).

Η διάκριση του LCIS από το DCIS βασίζεται στην απουσία έκφρασης ανοσοϊστοχημικά των δεικτών E-cadherin, β-catenin και κερατίνη υψηλού μοριακού βάρους (high molecular weight keratin, HMW) στην πρώτη περίπτωση. Παρεκκλίσεις από το παραπάνω πρότυπο έκφρασης των δεικτών υπάρχουν και δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις με συνδυασμό χαρακτηριστικών ανοσοϊστοχημικής έκφρασης και από τους δύο τύπους in situ καρκινώματος.

Πλειόμορφο Λοβιακό Καρκίνωμα in situ (PLCIS)

Το πλειόμορφο καρκίνωμα in situ (Pleomorphic Lobular Carcinoma In situ, PLCIS) έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά του LCIS, με τη διαφορά ότι οι πυρήνες είναι περισσότερο πλειόμορφοι και έχουν εμφανές πυρήνιο. Το PLCIS μπορεί να παρουσιάζει νέκρωση τύπου comedo και μικροαποπιτανώσεις, γεγονός που αυξάνει την πολύ έγκαιρη ανίχνευση τους στο μαστογραφικό έλεγχο. Η μορφολογία των κυττάρων και η έκφραση ανοσοϊστοχημικών δεικτών στο PLCIS μοιάζει με το διηθητικό πλειόμορφο λοβιακό καρκίνωμα και με το πορογενές καρκίνωμα υψηλής κακοήθειας. Έτσι, είναι συχνά ER/PR θετικό και HER2 θετικό. Ακόμα, παρατηρείται υψηλή έκφραση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 και έκφραση της πρωτεΐνης p53 (Hanby A.M. and Hughes T.A., 2008).

1.3.2. Διηθητικά Καρκινώματα Μαστού

Η μορφολογική ταξινόμηση (WHO) του διηθητικού καρκινώματος του μαστού έχει ως εξής:

- Διηθητικό καρκίνωμα μη ειδικού τύπου (No Special Type, NST), το οποίο άλλαξε την ονοματολογία του από Διηθητικό Πορογενές καρκίνωμα χωρίς ιδιαίτερα χαρακτηριστικά (Not Otherwise Specified, NOS) το 2012.
- Διηθητικό Λοβιακό καρκίνωμα
- Σωληνώδες καρκίνωμα
- Μυελοειδές καρκίνωμα

- Βλεννώδες καρκίνωμα
- Διηθητικό Ηθμοειδές καρκίνωμα
- Διηθητικό Μικροθηλώδες καρκίνωμα
- Διηθητικό Θηλώδες καρκίνωμα
- Φλεγμονώδες καρκίνωμα
- Αποκρινές καρκίνωμα
- Μεταπλαστικά καρκινώματα
- Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα, πλούσιο σε γλυκογόνο
- Εκκριτικό, ογκοκυτταρικό, αδενοκυστικό, κυψελιδικό, σμηγματογόνο, πλούσιο σε λιπίδια καρκίνωμα (Σπάνιοι τύποι καρκίνου του μαστού)(Makki J. 2015, Sinn H.P. and Kreipe H.2013)

Διηθητικό καρκίνωμα μη ειδικού τύπου (NST)

Ο ορισμός του διηθητικού καρκινώματος (NST) αντικαθιστά τον όρο διηθητικού πορογενούς καρκινώματος αφού το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα δεν περιλαμβάνει μια ομοιόμορφη ομάδα καρκινωμάτων.

Κλασσικό IDC NST

Είναι ο πιο κοινός τύπος διηθητικού καρκίνου του μαστού με συχνότητα 40-70%. Αρχιτεκτονικά, ο όγκος μπορεί να εμφανίζει ετερογένεια με τα νεοπλασματικά κύτταρα να σχηματίζουν αδένια, χορδές ή συμπαγείς αθροίσεις με πυρήνες καλής, μέτριας ή χαμηλής διαφοροποίησης. Η παρουσία του στρώματος μπορεί να είναι αυξημένη ή ελαττωμένη με έντονη δεσμοπλαστική αντίδραση. Σε μερικά καρκινώματα υπάρχουν περιοχές νέκρωσης ή/και αιμορραγίας και εναποθέσεις αλάτων ασβεστίου. Συχνά μέσα ή στην περιφέρεια του όγκου συνυπάρχει in situ καρκίνωμα (συνήθως πορογενές ή/και λοβιακό) (Makki J, 2015; Sinn H.P. and Kreipe H., 2013).

Σωληνώδες καρκίνωμα

Αποτελεί σπάνια μορφή καρκίνου του μαστού με εξαιρετική πρόγνωση. Σύμφωνα με τη νέα ταξινόμηση της WHO, απαραίτητη προϋπόθεση για τη διάγνωση αυτών των τύπων είναι η ύπαρξη των χαρακτηριστικών τους σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% των καρκινικών κυττάρων. Μερικές φορές συνυπάρχουν δυνητικά κακοήθεις αλλοιώσεις όπως DCIS, LCIS και επίπεδη επιθηλιακή νεοπλασία. Για να χαρακτηριστεί ένα καρκίνωμα σωληνώδες, θα πρέπει ο όγκος να έχει αυτή τη μορφολογία σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90%. Το αρχιτεκτονικό πρότυπο εμφανίζει αυξημένο αριθμό γωνιωδών, οβάλ και επιμηκυσμένων σωληναρίων με τυχαία διάταξη. Σε περίπτωση που ο όγκος έχει περιοχές με διηθητικό λοβιακό και σωληνώδες καρκίνωμα σε διαφορετικά ποσοστά, αναφέρεται ως σωληνολοβιακός. Στο 10% των περιπτώσεων συμβαίνουν μεταστάσεις στους μασχαλιαίους λεμφαδένες. Η πρόγνωση για μικτούς όγκους (παρουσία IDC NST) είναι χειρότερη από ότι στο αμιγώς σωληνώδες καρκίνωμα (Makki J., 2015; Sinn H.P. and Kreipe H., 2013).

Διηθητικό Ηθμοειδές καρκίνωμα

Αποτελεί σπάνιο τύπο καρκινώματος με ευνοϊκή πρόγνωση. Μορφολογικά, τα κύτταρα είναι ομοιόμορφα, σχηματίζουν νησίδα και έχουν χαμηλού βαθμού ατυπία,

Εμφανίζουν ηθμοειδή κατανομή (όπως και στο ηθμοειδές DCIS) με σαφή διήθηση του στρώματος. Σε περίπτωση συνύπαρξης με σωληνώδη διαφοροποίηση ο καλά διαφοροποιημένος όγκος χαρακτηρίζεται, μικτός ηθμοειδής-σωληνώδης όγκος (Makki J., 2015; Sinn H.P. and Kreipe H., 2013).

Μυελοειδές καρκίνωμα

Σπάνιος όγκος καρκίνου του μαστού (1-7%), καλά περιγεγραμμένος και μαλακός στην ψηλάφηση. Εμφανίζεται σε γυναίκες περίπου 50 ετών, οι οποίες συνήθως έχουν μετάλλαξη στο BRCA1. Απαραίτητες προϋποθέσεις για τον χαρακτηρισμό ενός όγκου, ως μυελοειδές καρκίνωμα είναι: 1) Νεοπλασματικά κύτταρα με χαμηλής διαφοροποίησης πυρήνες και μεγάλη μιτωτική δραστηριότητα, 2) όγκος καλά περιγεγραμμένος με απωθητική παρυφή, 3) συγκυτιακή ανάπτυξη των κυττάρων στο 75% του όγκου, 4) παρουσία λεμφοπλασματοκυτταρικής διήθησης το στρώμα 5) Απουσία αδενικής διαφοροποίησης. Εάν ένα καρκίνωμα δεν έχει όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά, αλλά μοιάζει με μυελοειδές τότε μπορεί να χαρακτηριστεί ως άτυπο μυελοειδές, είναι όμως ουσιαστικά διηθητικό πορογενές, NOS με έντονη λεμφοπλασματοκυτταρική αντίδραση του στρώματος (Makki J., 2015; Sinn H.P. and Kreipe H., 2013).

Βλεννώδες καρκίνωμα

Σύμφωνα με τη νέα κατάταξη της WHO, το βλεννώδες καρκίνωμα και το καρκίνωμα με διαφοροποίηση signet-ring περιγράφονται μαζί. Το βλεννώδες καρκίνωμα αποτελεί το 2% των καρκινωμάτων του μαστού. Εμφανίζεται συχνότερα σε γυναίκες μεγάλης ηλικίας (μέση ηλικία 68 έτη). Είναι μαλακός όγκος, καλά περιγεγραμμένος, ποικίλου μεγέθους. Τα κύτταρά του είναι καλά διαφοροποιημένα και σχηματίζουν μικρές αθροίσεις μέσα σε άφθονη εξωκυττάρια βλέννη. Υπάρχουν και άλλοι τύποι βλεννοπαραγωγών καρκινωμάτων του μαστού τα οποία χαρακτηρίζονται από την παραγωγή άφθονης εξωκυττάριας ή/και ενδοκυττάριας βλέννης. Το καρκίνωμα με διαφοροποίηση signet-ring ανήκει στα διηθητικά καρκινώματα του μαστού, αλλά δεν θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει ένα τύπο από μόνο του. Μπορεί να συνυπάρχει είτε με διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα, είτε με διηθητικό μη ειδικού τύπου, είτε σπάνια με υψηλής κακοήθειας βλεννώδες καρκίνωμα. Το αμιγώς βλεννώδες καρκίνωμα έχει εξαιρετική πρόγνωση, αλλά η πρόγνωση για τα μικτά βλεννώδη καρκινώματα είναι παρόμοια με αυτή των όγκων NOS (Makki J., 2015; Sinn H.P. and Kreipe H., 2013).

Διηθητικό Θηλώδες καρκίνωμα

Σπάνιος υπότυπος καρκίνου του μαστού, με πρόγνωση καλύτερη από το κλασσικό IDC, που προσβάλλει μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Τα κακοήθη κύτταρα έχουν ήπια έως μέτρια πυρηνική ατυπία και σχηματίζουν θηλές. Αν η μορφολογία του διηθητικού τμήματος του όγκου περιγράφεται ως θηλώδης σε ποσοστό μικρότερο από 90%, τότε ο όγκος χαρακτηρίζεται ως διηθητικό καρκίνωμα με θηλώδεις αλλοιώσεις. (Makki J., 2015; Sinn H.P. and Kreipe H., 2013).

Διηθητικό Μικροθηλώδες καρκίνωμα

Τα νεοπλασματικά κύτταρα σχηματίζουν μικρές θηλές μέσα σε διατεταμένους ιστοικούς χώρους που μοιάζουν με λεμφαγγεία, αλλά στερούνται ενδοθηλιακής επένδυσης. Το αμιγώς μικροθηλώδες, πορογενές καρκίνωμα είναι σπάνιο και η αναγνώριση του ως ειδικός υπότυπος IDC είναι πρόσφατη. Έχει κακή κλινική πρόγνωση και χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης από το συμβατικό IDC. Συχνά υποτροπιάζει τοπικά και δίνει μεταστάσεις στους λεμφαδένες. (Makki J, 2015; Sinn HP and Kreipe H, 2013).

Μεταπλαστικό καρκίνωμα

Το μεταπλαστικό καρκίνωμα είναι επιθετικό διηθητικό καρκίνωμα που χαρακτηρίζεται από μεταπλαστική διαφοροποίηση (πλακώδης, μεσεγχυματική). Ο μέσο όρος ηλικίας στην οποία εμφανίζεται είναι τα 55 έτη, σπάνια δε, δίνει μεταστάσεις σε μαχαλιαίους λεμφαδένες. Δεν είναι γνωστός ο τύπος κυττάρου από το οποίο προέρχεται. Μορφολογικά είναι συνδυασμός κυρίαρχου μεταπλαστικού ιστού, παρουσία IDC, που περιλαμβάνει πλακώδη κύτταρα με ή χωρίς ατρακτοκυτταρική διαφοροποίηση και μεσεγχυματική διαφοροποίηση όπως χονδροειδής, οστέινη και μυοεπιθηλιακή μετάπλαση. Τυπικά, το μεταπλαστικό καρκίνωμα είναι τριπλά αρνητικός όγκος, αλλά με χειρότερη πρόγνωση από άλλους τριπλά αρνητικούς όγκους (Makki J., 2015; Sinn HP and Kreipe H, 2013).

Νευροενδοκρινής όγκος

Καρκινώματα με νευροενδοκρινή διαφοροποίηση στο μαστό είναι όγκοι μορφολογικά παρόμοιοι με τους νευροενδοκρινείς όγκους του γαστρεντερικού σωλήνα και των πνευμόνων. Τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορεί να είναι στρογγυλά, μικρά και ατρακτόμορφα με ηωσινόφιλο συχνά κυτταρόπλασμα. Οι πυρήνες έχουν χαμηλού έως ενδιάμεσου βαθμού ατυπία και η χρωματίνη εμφανίζει πολλές φορές μοτίβο «αλατοπίπερου». Δημιουργούν ροζέτες και παρουσιάζουν χαρακτηριστικό οργανοειδές ή δοκιδώδες πρότυπο ανάπτυξης, όπου τα περιφερικά κύτταρα διατάσσονται κατά σειρές κάθετα στην περιφέρεια των νησιδίων του όγκου (πασαλλοειδής διάταξη). Εκφράζει δείκτες νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης χρωμογρανίνη και συναπτοφυσίνη (Makki J, 2015; Sinn HP and Kreipe H, 2013).

Αποκρινές καρκίνωμα

Σπάνιος τύπος καρκινώματος που υπολογίζεται στο 1-4% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού. Συνήθως είναι υψηλού βαθμού κακοήθειας με πτωχή πρόγνωση. Τα κύτταρα είναι μεγάλα, με άφθονο οξύφιλο, κοκκώδες κυτταρόπλασμα θετικό για χρώση PAS (Periodic Acid Schiff) και φέρουν φουσαλιδώδεις πυρήνες με προέχον πυρήνιο. Τα νεοπλασμάτα αυτά είναι συχνά αρνητικά για ER ή PR και συχνά εκφράζουν ανδρογονικούς υποδοχείς και HER2 (Makki J, 2015; Sinn HP and Kreipe H, 2013).

Σπάνια είδη όγκων

Εξαιρετικά σπάνια είδη όγκων είναι το εκκριτικό καρκίνωμα στήθους, το οποίο προσβάλλει άτομα νεαρής ηλικίας και το ογκοκυτταρικό καρκίνωμα, που μοιάζει με

ογκοκυτταρικό καρκίνωμα νεφρού και θυρεοειδή. Άλλα σπάνια είδη όγκων περιλαμβάνουν το πολύμορφο καρκίνωμα, το καρκίνωμα πλούσιο σε λιπίδια, το αδενοκυψελιδικό καρκίνωμα και το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα πλούσιο σε γλυκογόνο (Makki J., 2015; Sinn H.P. and Kreipe H., 2013).

Διηθητικό Λοβιακό καρκίνωμα (ILC)

Το διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (Invasive Lobular Carcinoma, ILC) αποτελεί το 5-15% των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού. Συνήθως, προσβάλλει γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας. Στην κλασική του μορφή αποτελείται από μικρά, ομοιόμορφα κύτταρα με πυρήνα χωρίς ατυπία και με πολύ μικρή μιτωτική δραστηριότητα. Τα νεοπλασματικά κύτταρα αναπτύσσονται κατά χορδές (Indian file pattern), οι οποίες συχνά συγκεντρώνονται γύρω από προϋπάρχοντες πόρους. Συνήθως υπάρχει αρκετό ινώδες στρώμα με ελάστωση γύρω από πόρους και αγγεία. Χαρακτηριστική είναι η απουσία της έκφρασης της Ε-καντχερίνης λόγω μετάλλαξης, απώλειας ετεροζυγωτίας ή μεθυλίωσης ιδιαίτερα στο πολύμορφο καρκίνωμα (Hanby AM and Hughes TA, 2008; Makki J, 2015; Sinn HP and Kreipe H, 2013).

Παραλλαγές του διηθητικού λοβιακού καρκινώματος αποτελούν το συμπαγές λοβιακό καρκίνωμα, το κυψελιδικό, το ιστοκυτταροειδές, το σωληνολοβιακό, τοπολύμορφο και το λοβιακό καρκίνωμα με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου (signet ring). Τα νεοπλασματικά κύτταρα στο συμπαγές και κυψελιδικού τύπου καρκίνωμα μοιάζουν με αυτά στο κλασικό λοβιακό καρκίνωμα, αρχιτεκτονικά όμως σχηματίζουν ευμεγέθη συμπαγή ή κυψελιδικά, αντίστοιχα, αθροίσματα με λιγοστό στρώμα μεταξύ τους.

Στο ιστοκυτταροειδές λοβιακό καρκίνωμα τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι μεγάλα παρουσιάζουν διάχυτο πρότυπο ανάπτυξης. Το αφρώδες κυτταρόπλασμα τους φέρει κοκκία και γενικά η συνολική μορφολογία τους θυμίζει μακροφάγα. Στις περισσότερες περιπτώσεις είναι αρνητικά για Ε-καντχερίνη (Hanby AM and Hughes TA, 2008; Makki J, 2015).

Το σωληνολοβιακό έχει μορφή λοβιακού καρκινώματος, περιέχει όμως και μικρούς αδενικούς σχηματισμούς με ελάχιστο αυλό. Οι περισσότερες μελέτες έδειξαν ότι είναι θετικό στην Ε-καντχερίνη και στην β-κατενίνη. Θεωρείται ότι έχει την καλύτερη πρόγνωση από όλους τους τύπους καρκίνου μαστού (Hanby AM and Hughes T.A., 2008).

Το πολύμορφο λοβιακό καρκίνωμα χαρακτηρίζεται από κύτταρα που αναπτύσσονται κατά δοκίδες, με ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και μεγάλη πυρηνική πολυμορφία. Οι όγκοι αυτοί εμφανίζουν υψηλό μιτωτικό δείκτη και γενικά έχουν πιο επιθετική συμπεριφορά. Ανοσοϊστοχημικά παρατηρείται υπερέκφραση HER2, p53 και σε μερικές περιπτώσεις απώλεια έκφρασης ER/PR (Hanby AM and Hughes TA, 2008; Makki J, 2015; Sinn HP and Kreipe H, 2013).

Στο «δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου» λοβιακό καρκίνωμα, ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων έχει μορφολογία signet ring, όπου ένα μεγάλο κενοτόπιο απωθεί τον

πυρήνα στην περιφέρεια του κυτταροπλάσματος. Το συγκεκριμένο νεόπλασμα δεν πρέπει να συγχέεται με το βλεννώδες καρκίνωμα με κύτταρα signet ring, αφού έχει διαφορετική πρόγνωση από αυτό (Hanby AM and Hughes TA 2008, Makki J, 2015).

1.4 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο μαζικός αδένας περιέχει δυο κατηγορίες επιθηλιακών κυττάρων, αυτά της βασικής στιβάδας (μυοεπιθηλιακά) και αυτά του αυλού. Μπορούν εύκολα να διακριθούν μεταξύ τους από το πρότυπο έκφρασης κερατινών. Οι περισσότεροι όγκοι καρκίνου του μαστού προέρχονται από το επιθήλιο του αυλού. Όμως 3-15% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού φαίνεται να προέρχονται από το μυοεπιθηλιακά κύτταρα και είναι από τις πιο επιθετικές μορφές καρκίνου (Sørliie T et al., 2001; Perou CM et al., 2000).

Τα τελευταία χρόνια, με τη βοήθεια τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας, προέκυψε νέα κατάταξη των διηθητικών τύπων καρκίνου του μαστού, με βάση το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης το οποίο αντανακλάται και στην κλινική πορεία της νόσου. Αναγνωρίζονται τέσσερις υποομάδες: Αυλικού τύπου A (ER+/PR+/HER2-), Αυλικού τύπου B (ER+/PR+/HER2+), τριπλά αρνητικά που συχνά είναι Βασικού τύπου (ER-/PR-/HER2-) και ο HER2 τύπος (ER-/PR-/HER2+) (Tamimi RM et al., 2012).

Αυλικού τύπου A

50% των διηθητικών CA μαστού ανήκουν σε αυτή την κατηγορία, εκφράζουν ER και PR ενώ είναι αρνητικά για HER2. Έχουν καλή πρόγνωση και τυπικά είναι υψηλού βαθμού διαφοροποίησης.

Αυλικού τύπου B

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει το 20% των διηθητικών καρκινωμάτων μαστού. Είναι θετικά για ER και PR, ενώ η έκφραση μπορεί να είναι είτε θετική είτε αρνητική. Ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 και ο βαθμός κακοήθειας είναι υψηλότερα από ότι στα Αυλικού τύπου A. Ανοσοϊστοχημικά, εκφράζουν χαμηλού μοριακού βάρους κερατίνες και έχουν ενδιάμεση έως χαμηλή έκφραση σε ορμονικούς υποδοχείς. Η πρόγνωση είναι πιο φτωχή από τα Αυλικού τύπου A.

Τριπλά αρνητικά-Βασικού τύπου

Αποτελούν το 15% όλων των διηθητικών καρκινωμάτων μαστού. Δεν εκφράζουν ER/PR και HER2. Ανοσοϊστοχημικά είναι θετικά για CK5/6 και/ή για EGFR. Εμφανίζουν επίσης, μετάλλαξη στο TP53 και υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67. Δεν ανταποκρίνονται στην ορμονική θεραπεία αλλά ούτε και στη στοχεύουσα θεραπεία έναντι του HER2 με trastuzumab (Herceptin), αφού δεν εκφράζουν τα αντίστοιχα μόρια στόχους των παραπάνω θεραπειών, ωστόσο, φαίνεται να έχουν ευαισθησία στη χημειοθεραπεία με πλατίνα και με αναστολείς πολυμεράσης. Γενικά είναι πτωχής πρόγνωσης (Makki J., 2015).

HER2 Υπερέκφραση

Στην κατηγορία αυτή ανήκει το 15% όλων των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού. Συνήθως είναι αρνητικά για ER/PR και θετικά για HER-2. Η μετάλλαξη TP53 είναι συχνή και ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 είναι υψηλός. Εμφανίζουν συνήθως χαμηλή διαφοροποίηση και δίνουν συχνά λεμφαδενικές μεταστάσεις. Είναι ευαίσθητα στη θεραπεία με trastuzumab, αλλά παρουσιάζουν πτωχή πρόγνωση.

1.5 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Η σταδιοποίηση αποτελεί τον κώδικα επικοινωνίας μεταξύ ιατρών διαφορετικών ειδικοτήτων, που εμπλέκονται στη διάγνωση και θεραπεία ασθενών με νεοπλασματική νόσο. Ταυτόχρονα συμβάλλει στην ομαδοποίηση των ασθενών με όσο το δυνατόν περισσότερα κοινά χαρακτηριστικά της νόσου, προκειμένου να ακολουθήσουν την καταλληλότερη για αυτούς θεραπεία. Ερευνητικά, βοηθάει στην παρατήρηση και ερμηνεία φαινομένων, εξαγωγή συμπερασμάτων, διατύπωση πιθανών μηχανισμών και συνεπώς στο σχεδιασμό μελλοντικών ερευνητικών πρωτοκόλλων. Στην ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού κατά TNM, ο καρκίνος του μαστού σταδιοποιείται ανάλογα με το μέγεθος της πρωτοπαθούς εστίας (T), την προσβολή σύστοιχων μασχαλαίων λεμφαδένων (N) και την παρουσία ή όχι μεταστάσεων (M) (Πιν 1). Οι όγκοι πρέπει να σταδιοποιηθούν πριν τη θεραπεία (κλινική σταδιοποίηση, cTNM) και μετά τη χειρουργική επέμβαση (παθολογική σταδιοποίηση, pTNM). Το T παίρνει συνήθως τιμές από το 0 έως το 4 (T0-T4) και εκφράζει το αυξανόμενο μέγεθος και την έκταση του πρωτοπαθούς όγκου. Το N παίρνει τέσσερις τιμές (N0-N3) και χωρίζεται περαιτέρω σε υποκατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό, το μέγεθος και την εντόπιση των προσβεβλημένων λεμφαδένων. Το M έχει δυο τιμές, (M0 και M1) δηλαδή απουσία και παρουσία καρκινικών κυττάρων σε περιοχές εκτός του μαστού και λεμφαδένων. Η απλή αυτή σχηματοποίηση της σταδιοποίησης είναι ο στόχος του συστήματος TNM και επιτυγχάνει μια σχετικά ακριβή περιγραφή και καταγραφή της ανατομικής έκτασης της νόσου (Πιν. 2) (Greene F.L. and Sobin L.H., 2008).

Πίνακας 1: Ταξινόμηση κατά TNM

Πρωτοπαθής Όγκος (T)	
Tx	Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
T0	Καμία απόδειξη παρουσίας όγκου
Tis	Καρκίνωμα in situ Tis (DCIS) - πορογενές καρκίνωμα in situ Tis (LCIS) -λοβιακό καρκίνωμα in situ Tis (Paget's) - νόσος Paget's της θηλής χωρίς όγκο

T1	Όγκος 2εκ. ή μικρότερος στη μεγαλύτερη διάσταση T1mic - μικροδιηθητικός 0.1εκ. ή μικρότερος T1a - όγκος μεγαλύτερος από 0.1εκ. αλλά όχι μεγαλύτερος από 0.5εκ. T1b - όγκος μεγαλύτερος από 0.5εκ. αλλά όχι μεγαλύτερος από 1.0εκ. T1c - όγκος μεγαλύτερος από 1.0εκ. αλλά όχι μεγαλύτερος από 2.0εκ.
T2	Όγκος μεγαλύτερος από 2.0εκ. αλλά όχι μεγαλύτερος από 5.0εκ. στη μεγαλύτερη διάσταση
T3	Όγκος μεγαλύτερος από 5.0εκ. στη μεγαλύτερη διάσταση
T4	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με επέκταση σε θωρακικό τοίχωμα ή δέρμα: T4a - επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα (δεν περιλαμβάνεται ο μείζον θωρακικός μυς) T4b - οίδημα (συμπεριλαμβανομένης και όψης φλοιού πορτοκαλιού) ή εξέλκωση δέρματος μαστού ή δορυφόροι δερματικοί όζοι περιορισμένοι στον ίδιο μαστό T4c - T4a και T4b T4d - φλεγμονώδης καρκίνος μαστού
Λεμφαδένες (N)	
Nx	Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν. Πιθανόν λόγω προηγούμενης αφαίρεσης.
N0	Χωρίς μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες
N1	Μετάσταση σε κινητούς επιχώριους μασχαλιαίους λεμφαδένες ομόπλευρα του προσβεβλημένου μαστού
N2	Μετάσταση σε καθηλωμένους επιχώριους μασχαλιαίους λεμφαδένες ή μετάσταση, κλινικά ανιχνεύσιμη, σε έσω μαστικούς λεμφαδένες λεμφαδένες ομόπλευρα του προσβεβλημένου μαστού, απουσία κλινικά εμφανών προσβεβλημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων N2a - μετάσταση σε ομόπλευρους καθηλωμένους επιχώριους μασχαλιαίους λεμφαδένες N2b - μετάσταση κλινικά ανιχνεύσιμη σε έσω μαστικούς λεμφαδένες ομόπλευρα του προσβεβλημένου μαστού, απουσία κλινικά εμφανών προσβεβλημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων
N3	Μετάσταση σε ομόπλευρους υποκλείδιους λεμφαδένες με ή χωρίς συμμετοχή μασχαλιαίων λεμφαδένων ή κλινικά εμφανής προσβολή ομόπλευρων έσω μαστικών λεμφαδένων, παρουσία κλινικά εμφανών μασχαλιαίων λεμφαδένων ή μετάσταση σε ομόπλευρους υπερκλείδιους λεμφαδένες με ή χωρίς προσβολή μασχαλιαίων ή έσω μαστικών λεμφαδένων N3a - μετάσταση σε ομόπλευρους υποκλείδιους λεμφαδένες N3b - κλινικά εμφανής προσβολή ομόπλευρων έσω μαστικών λεμφαδένων, παρουσία κλινικά εμφανών μασχαλιαίων λεμφαδένων N3c - μετάσταση σε ομόπλευρους υπερκλείδιους λεμφαδένες
Μεταστάσεις (M)	
Mx	Η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων δεν μπορεί να εκτιμηθεί
M0	Απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων cM0(i+) – Απουσία μεταστάσεων σε φυσική εξέταση, απεικονιστική ή ακτίνες X

εξέταση, αλλά καρκινικά κύτταρα βρίσκονται στο αίμα, μυελό των οστών ή στους λεμφαδένες μακριά από το μαστό, τα κύτταρα ανιχνεύονται με εργαστηριακές εξετάσεις

M1 Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

(AJCC Cancer Staging Poster, Breast Cancer, 2010)

Πίνακας 2. Σταδιοποίηση

ΣΤΑΔΙΟ	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Οποιοδήποτε T	N3	M0
IV	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

(AJCC, Breast Cancer Staging, 2010)

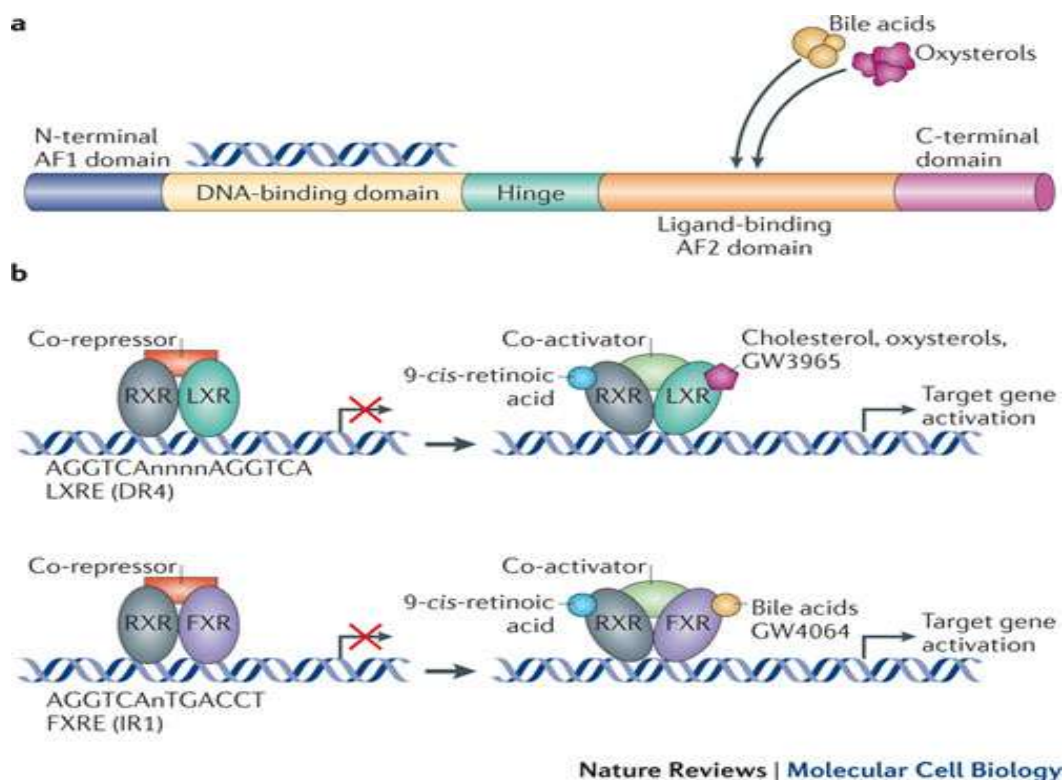
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

FARNESOID X RECEPTOR

2.1 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Ο Farnesoid X Receptor (FXR) ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων οι οποίοι λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Τα συγκεκριμένα μόρια ενεργοποιούνται μετά τη σύνδεση τους με τον κατάλληλο προσδέτη, μετακινούνται στον πυρήνα και αφού προσδεθούν σε ρυθμιστικές περιοχές ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων (Gadaleta RM et al 2015). Μέσω αυτού του ρυθμιστικού τους ρόλου, οι πυρηνικοί υποδοχείς παίζουν σημαντικό ρόλο σε πλήθος φυσιολογικών διαδικασιών όπως η αναπαραγωγή, η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα η υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων αριθμεί 48 μέλη (Mangelsdorf DJ et al. 1995). Στην ομάδα αυτή δεν περιλαμβάνονται μόνο οι κλασσικοί ενδοκρινικοί υποδοχείς των οποίων τη δράση διαμεσολαβούν στεροειδείς ορμόνες, ορμόνες θυροειδούς, λιποδιαλυτές βιταμίνες A και D αλλά και μια άλλη κατηγορία υποδοχέων των λεγομένων ορφανών υποδοχέων, αυτών δηλ. που αρχικά ήταν άγνωστος ο προσδέτης τους, το γονίδιο-στόχος και εν γένει η φυσιολογική λειτουργία τους.

Όλοι οι πυρηνικοί υποδοχείς έχουν παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά, παρόλο που ο κάθε υποδοχέας μπορεί να συνδέεται με διαφορετική ισχύ με τον προσδέτη του. Με ελάχιστες εξαιρέσεις, αυτές οι πρωτεΐνες περιέχουν στο αμινοτελικό άκρο μία περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής, η οποία ενεργοποιείται ανεξάρτητα από την σύνδεση με το προσδέτη (ligand independent Activation Function AF-1), μία κεντρική περιοχή πρόσδεσης στο DNA, αποτελούμενη από δύο πολύ συντηρητικές περιοχές δακτυλίων ψευδαργύρου που συνδέουν τον υποδοχέα σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA γνωστές ως στοιχείο απόκρισης στην ορμόνη (HRE hormone response element), την περιοχή αρμού που καθιστά εύκαμπτο το μόριο προκειμένου να μπορεί ταυτόχρονα να διμερισθεί με άλλον υποδοχέα και να συνδεθεί και στο DNA, και στο καρβοξυτελικό άκρο μια μεγάλη περιοχή που περιλαμβάνει την περιοχή σύνδεσης με τον προσδέτη, την επιφάνεια επαφής με τον άλλο υποδοχέα κατά το διμερισμό και την περιοχή ενεργοποίησης η οποία ενεργοποιείται μετά την πρόσδεση με τον προσδέτη (ligand dependent Activation Function AF-2)(Εικ. 2).



Εικ. 2: Δομή της πρωτεΐνης FXR **a**. AF1: Περιοχή που ενεργοποιείται ανεξάρτητα από τον προσδέτη, DNA binding domain: Περιοχή πρόσδεσης στο DNA, Hinge: Αρμός, AF2: Περιοχή που ενεργοποιείται μετά την πρόσδεση του προσδέτη **b** Ο FXR αδρανοποιημένος και ο RXR σε ενεργό μορφή (Nature Reviews Molecular Cell Biology 13, 213-224, 2012)

Το 1995 ανακαλύφθηκε στα ποντίκια μια πρωτεΐνη η οποία συνδέεται με τον RXR και ονομάστηκε με τον RXR αλληλοεπιδρούσα πρωτεΐνη 14 (RXR-Interacting Protein 14, RIP14) (Seol W et al. 1995). Την ίδια χρονιά, μια ανεξάρτητη ερευνητική ομάδα κλωνοποίησε το ομόλογο γονίδιο RIP14 σε αρουραίο, και έδειξε ότι υπερβολικές ποσότητες της ένωσης farnesol (ένα ενδιάμεσο προϊόν του μονοπατιού της σύνθεσης της χοληστερόλης) ήταν ικανές να ενεργοποιήσουν το συγκεκριμένο γονίδιο (Forman BM et al 1995). Από τότε η RIP14 ονομάστηκε Farnesoid X Receptor (FXR). Αργότερα, το 1999, αποκαλύφθηκε ότι τα πρωτογενή λιπαρά οξέα είναι οι φυσικοί προσδέτες του υποδοχέα και για αυτό το λόγο ο υποδοχέας ονομάζεται επίσης πυρηνικός υποδοχέας των λιπαρών οξέων (Bile Acid Nuclear Receptor, BAR) (Wang H et 1999, Parks DJ et al. 1999, Makishima et al 1999).

2.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Η υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων μπορεί να χωρισθεί, όπως αναφέρθηκε, σε δύο κατηγορίες: Η μία περιλαμβάνει τους κλασικούς υποδοχείς στεροειδών ορμονών μεταξύ των οποίων ο GR, των αλατοκορτικοειδών MR, των ιστρογόνων ER, της προγεστερόνης PR, των ανδρογόνων AR. Οι υποδοχείς των

στεροειδών ορμονών προσδένονται στο DNA ως ομοδιμερή, και οι προσδέτες τους συντίθενται αποκλειστικά από ενδογενείς (ενδοκρινείς) αδένες που υπόκεινται στον έλεγχο του άξονα υποθαλάμου- υπόφυσης. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τους ορφανούς υποδοχείς που σχηματίζουν ετεροδιμερή με τον Retinoic X receptor (RXR). Σε αυτήν ανήκουν οι υποδοχείς Peroxisome Proliferator-Activated receptor (PPAR), Liver X Receptor (LXR), Farnesoid X Receptor (FXR), Steroid xenobiotics receptor/Pregnane X Receptor (SXR/PXR) και Constitutive Androstane Receptor (CAR). Ενεργοποιούνται από τα λιπίδια της διατροφής και ως εκ τούτου η συγκέντρωσή τους δεν ρυθμίζεται από τον άξονα υποθαλάμου- υπόφυσης όπως στην προηγούμενη κατηγορία, αλλά από την περιεκτικότητα των λιπιδίων στην προσλαμβανόμενη από τον οργανισμό τροφή. Έχουν χαμηλή συγγένεια με τους προσδέτες τους και ως εκ τούτου για να ενεργοποιηθούν απαιτούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του προσδέτη τους από αυτές που συνήθως υπάρχουν φυσιολογικά στην προσλαμβανόμενη τροφή. Λειτουργούν ως ανιχνευτές λιπιδίων, καθώς μετά την πρόσδεση με τους προσδέτες τους ενεργοποιούν οδούς που καταλήγουν σε ενεργοποίηση μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται σε διαδικασίες μεταβολισμού, αποθήκευσης, μεταφοράς και περιορισμού των λιπιδίων, προκειμένου να διατηρηθεί η λιπιδική ομοιόσταση στο σώμα. Επιπλέον με τους ορφανούς υποδοχείς, υπάρχει και μια άλλη κατηγορία υποδοχέων που επίσης σχηματίζουν ετεροδιμερή με τους RXR, ωστόσο ρυθμίζονται με έναν τρόπο που δεν μοιάζει απόλυτα με κανέναν με τον οποίο ρυθμίζονται οι υποδοχείς των κατηγοριών που αναφέρθηκαν αλλά περιέχει στοιχεία ρύθμισης τόσο από τον τρόπο ρύθμισης των κλασικών όσο και των ορφανών υποδοχέων. Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται ο Thyroid hormone receptor (TR), Retinoic acid receptor (RAR), Vitamin D Receptor (VDR) και Ecdysone Receptor (EcR). (Chawla A et al. 2001)

2.3 ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ FXR

Στον άνθρωπο έχουν ανιχνευθεί δύο γονίδια για τον FXR, το *FXRα* και το *FXRβ*. Το *FXRα* κωδικοποιεί τέσσερις ισομορφές (*FXRα1*, *FXRα2*, *FXRα3*, *FXRα4*) που προκύπτουν από την ενεργοποίηση διαφορετικών υποκινητών και από εναλλακτικό μάτισμα του RNA. Το *FXRβ* είναι ένα ψευδογονίδιο και η λειτουργία του δεν είναι γνωστή. Τα περισσότερα γονίδια-στόχοι του FXR ρυθμίζονται ανεξάρτητα από όλες τις ισομορφές του γονιδίου *FXRα*, ενώ κάποια άλλα επιλεκτικά από τις ισομορφές *FXRα2* και *FXRα4* (Lee FY et al. 2006).

2.4 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΟ DNA

(FXR Responsive Elements- FXREs)

Ο FXR σχηματίζει ετεροδιμερή με τον RXR και προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες του DNA της ρυθμιστικής περιοχής γονιδίων που ρυθμίζονται από αυτόν. Οι περιοχές αυτές είναι γνωστές ως στοιχεία απόκρισης του FXR. Η δομή τους ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων γονιδίων, ωστόσο το στοιχείο που φέρει δύο διαδοχικές αλληλουχίες AGGTCA, όπου η πρώτη είναι σε κανονική κατεύθυνση ενώ

η δεύτερη ακολουθεί μετά από ένα νουκλεοτίδιο με ανάστροφη κατεύθυνση (Inverted Repeat-1), είναι αυτό με το οποίο το ετεροδιμερές FXR-RXR συνδέεται πιο ισχυρά. Απουσία προσδέτη, το σύμπλοκο FXR-RXR είναι προσδεμένο σε ανενεργή μορφή στο DNA, μαζί με κατασταλτικές πρωτεΐνες. Η πρόσδεση λιπαρών οξέων στον υποδοχέα προκαλεί αλλαγές στη στερεοδομή του συμπλέγματος, απελευθερώνοντας από το σύμπλεγμα τις πρωτεΐνες καταστολής μεταγραφής (π.χ NCoR). Ακολούθως, άλλες πρωτεΐνες που είναι παράγοντες ενεργοποίησης της μεταγραφής (π.χ., CARM1)(Ananthanarayanan M et al. 2004) προσεγγίζουν το μεταγραφικό σύμπλεγμα, αρχίζοντας την ενεργοποίηση της μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων.

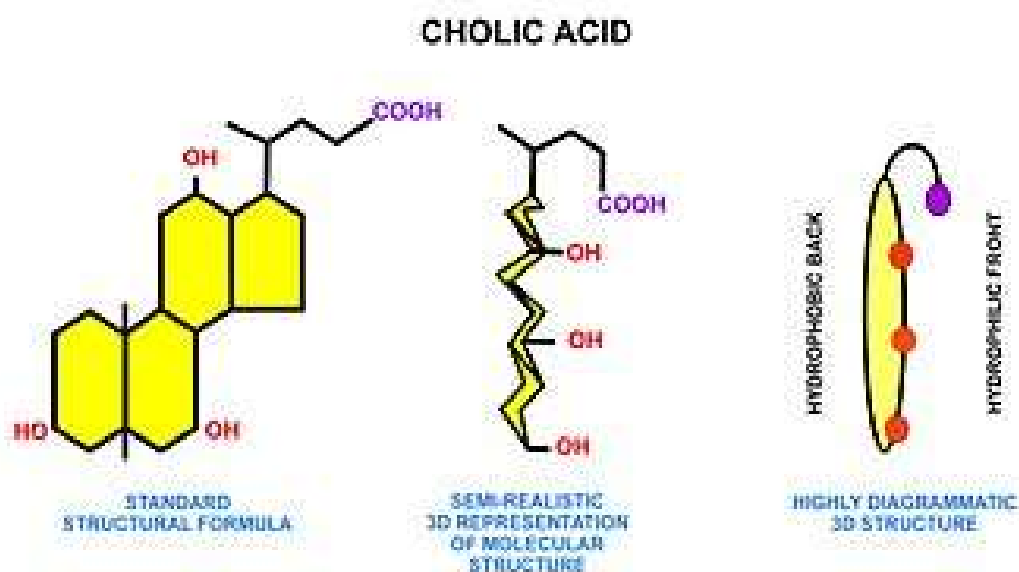
2.5 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ FXR ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

Δεδομένου ότι η κύρια λειτουργία του υποδοχέα είναι ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων, έχει δειχθεί μια ειδική κατά ιστό κατανομή του υποδοχέα, κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, με αυξημένη παρουσία στο ήπαρ και στον ειλεό, στα νεφρά και στα επινεφρίδια (Timothy T et al.1995, Forman BM et al 2001). Χαμηλά επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα παρατηρούνται στην καρδιά, στο λιπώδη ιστό (Zhang Y et al. 2003) καθώς επίσης και σε ορισμένους ορμονοαποκρινόμενους ιστούς, όπως πχ είναι ο μαστός (Swales KE et al. 2006).

2.6 ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ ΤΟΥ FXR

Οι πιο ισχυροί φυσικοί προσδέτες του υποδοχέα είναι δύο κύρια χολικά οξέα το Chenodeoxycholic acid (CDCA) και Cholic acid (CA) (Wang H et 1999, Parks DJ et al. 1999, Makishima et al 1999). Τα χολικά οξέα έχουν δομή απορρυπαντικού που συντίθενται από την χοληστερόλη στο ήπαρ, αποθηκεύονται στη χοληδόχο κύστη και απελευθερώνονται στο γαστρικό σωλήνα μετά την πρόσληψη τροφής προκειμένου να διευκολυνθεί η απορρόφηση των λιπιδίων διατροφής και των λιποδιαλυτών βιταμινών.

Η χημική δομή των χολικών οξέων συνίσταται σε πυρήνα με στερεοειδή δακτύλιο με μια πλευρική όξινη αλυσίδα. Είναι αμφίφιλα μόρια χαρακτηριζόμενα από ένα υδρόφιλο α-μέτωπο και ένα υδρόφοβο β-μέτωπο. Η υδρόφοβη περιοχή του FXR αλληλεπιδρά με τα χολικά οξέα κυρίως μέσω της β επιφάνειας (Ligand Binding Domain, LBD). Η α επιφάνεια περιέχει αρκετές υδροξυλικές ομάδες οι οποίες επιδρούν στην ικανότητα του κάθε προσδέτη να ενεργοποιήσει τον υποδοχέα (Εικ. 3) (Fujino T et al. 2004).



Εικ.3 Δομή χολικών οξέων

Η βέλτιστη ενεργοποίηση του υποδοχέα από το προσδέτη επιτυγχάνεται μέσω της κατάλληλης προσαρμογής της έλικας 3 έναντι της έλικας 12 προκειμένου να σχηματισθεί η θέση πρόσδεσης. Τα χολικά οξέα δεν είναι αποκλειστικά προσδέτες του FXR. Με διαφορετική αποτελεσματικότητα ενεργοποιούν και άλλους πυρηνικούς υποδοχείς, όπως τους PXR, CAR, VDR και TGR5 (Fiorucci S et al. 2009). Με βάση τα δεδομένα αυτά έχουν δημιουργηθεί ημισυνθετικά και συνθετικά μόρια που είναι πιο ισχυροί και πιο επιλεκτικοί προσδέτες-ενεργοποιητές του FXR από ότι τα χολικά οξέα. Ένα συνθετικό μόριο από τους πιο ισχυρούς και ειδικούς προσδέτες του FXR είναι ο αγωνιστής GW4046 (Maloney PR et al. 2000). Δρα και *in vivo* και *in vitro*, αλλά δείχνει περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα (ποσοστό χορηγούμενου φαρμάκου που φθάνει το στόχου του) γεγονός που το αποκλείει από την πιθανότητα να χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές. Άλλοι αγωνιστές όπως το ημισυνθετικό (παραγώγο του χηνοδεοξυχολικού οξέος CDCA) 6-ECDCA και FXR-450, ελέγχονται για την φάση II/III κλινικών δοκιμών για μεταβολικές και χρόνιες παθήσεις του ήπατος (Thomas C et al 2008). Σε μια πρόσφατη μελέτη δείχθηκε ότι η χορήγηση παραγώγου 6-ECDCA του συγκεκριμένου μορίου σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη και μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος σε φάση II κλινικής δοκιμής αύξησε τα επίπεδα ευαισθησίας της ινσουλίνης και ελάττωσε δείκτες φλεγμονής και ίνωσης στο ήπαρ (Mudaliar S et al. 2013). Αυτό φανερώνει την ασφάλεια και την ανοχή των ασθενών σε αυτά τα φάρμακα (Gadaleta RM et al. 2015).

2.7 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΧΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Τα χολικά οξέα επιτελούν δύο κύριες λειτουργίες: α) ασκούν απορροπτική δράση στα λιπαρά σωματίδια της τροφής ελαττώνοντας την επιφανειακή τους τάση

και επιτρέποντας, έτσι στο λεπτό διαμερισμό των λιποσφαιρίων με τη μηχανική ανάδευση της τροφής μέσα στο έντερο, β) και σπουδαιότερο από τη γαλακτωματοποιητική δράση, τα χολικά οξέα βοηθούν στην απορρόφηση των λιπαρών οξέων, των μονογλυκεριδίων, της χοληστερόλης και άλλων λιποειδών από τον εντερικό σωλήνα (Guyton A 1990).

Ανακυκλώνονται έντονα στο σώμα μέσω της εντεροηπατικής λειτουργίας. Στην πραγματικότητα, επαναπροσροφώνται στον τελικό ειλεό, εκκρίνονται στην πυλαία φλέβα και ακολούθως επιστρέφουν πίσω στο ήπαρ όπου και επαναπροσροφώνται.. Κατά αυτό τον τρόπο ανακυκλώνεται το 95% των χολικών οξέων, και μόνο 5% αυτών συντίθεται εκ νέου στον οργανισμό. Έτσι, διατηρεί ο οργανισμός μια σταθερή δεξαμενή χολικών οξέων αποφεύγοντας την υπερβολική κατανάλωση ενέργειας που απαιτείται για την σύνθεσή τους.

Δεδομένου της φύσης τους (δομή απορρυπαντικού) είναι ισχυρά κυτταροτοξικά και για αυτό θα πρέπει οι συγκεντρώσεις τους να είναι αυστηρά ελεγχόμενες. Η κατάλληλη συγκέντρωση και κυκλοφορία των χολικών οξέων βασίζεται στη συνδυασμένη λειτουργία του ήπατος και του εντέρου. Η σύνθεση, η μεταφορά, και ο μεταβολισμός των χολικών οξέων είναι συνδεδεμένες διαδικασίες ρυθμιζόμενες από μηχανισμούς ανάδρασης και επανατροφοδότησης.

Σημαντική ρύθμιση των επιπέδων των χολικών οξέων στα ηπατοκύτταρα, στα κύτταρα του εντέρου και την εντεροηπατική κυκλοφορία επιτελείται διαμέσου επικοινωνίας μεταξύ μοριακών μονοπατιών του ήπατος και του εντέρου με συντονισμό τους από την εξειδικευμένη κατά ιστό δράση του FXR. Λαμβάνοντας υπόψη το μεγάλο εύρος λειτουργιών του FXR, ο ενεργοποιούμενος από τα χολικά οξέα υποδοχέας ελαττώνει την εκ νέου σύνθεση των χολικών οξέων στο ήπαρ, αυξάνει την έκκριση χολικών οξέων στο λεπτό έντερο, προάγει την επαναπροσρόφηση τους από το έντερο και παρεμποδίζει την πλαγιοβασική πρόσληψη των χολικών οξέων από το ήπαρ (Gadaleta RM et al. 2015).

2.7.1 Η εντεροηπατική λειτουργία των χολικών οξέων και οι φυσιολογικές δράσεις του FXR

FXR στο ήπαρ

Η εκ νέου σύνθεση των χολικών οξέων επιτελείται μέσω μονοπατιού, όπου με την επίδραση διαφόρων ενζύμων μετατρέπεται η χοληστερόλη στα δύο κύρια προϊόντα καταβολισμού της το CDCA και CA (Gadaleta RM 2015). Περίπου 500 μg χοληστερόλης ημερησίως μετασχηματίζονται σε χολικά οξέα στο ήπαρ ενός ενήλικα. Η αντίδραση σχηματισμού των χολικών οξέων αφορά την τροποποίηση της δομής του δακτυλίου της χοληστερόλης, οξειδωση και σμίκρυνση της πλάγιας αλυσίδας, και την σύνδεση τελικά των χολικών οξέων με ένα αμινοξύ (Εικ.4). Η χοληστερόλη 7 α-

υδροξυλάση, γνωστή ως κυτόχρωμα P450 7A1 (CYP7A1), είναι το ένζυμο ρυθμιστής στη διαδικασία μετατροπής χοληστερόλης σε χολικά οξέα, που αφορά το 90% της παραγωγής στον άνθρωπο (Wang H et 1999, Parks DJ et al. 1999, Makishima et al 1999). Τα νεοσυντιθέμενα χολικά οξέα ενεργοποιούν κατά ειδικό τρόπο τον FXR στο ήπαρ, ο οποίος στη συνέχεια επάγει την έκφραση ενός ορφανού πυρηνικού υποδοχέα του Small heterodimer partner (SHP). Ο SHP μη διαθέτοντας ο ίδιος τμήμα πρόσδεσης στο DNA, προσδένεται σε έναν άλλο ορφανό υποδοχέα τον Liver receptor homologous 1 (LRH-1) προκειμένου να καταστείλει, την μεταγραφική δραστηριότητα του τελευταίου, με αποτέλεσμα την ελαττωμένη έκφραση του CYP7A1, γονίδιο στόχο του LRH-1 (Goodwin B et al. 2000, Lee YK 2008 et al. 2008, Lu TT et al. 2000) του οποίου το προϊόν ρυθμίζει τη σύνθεση των χολικών οξέων. Ο FXR διαμεσολαβεί κατά παρόμοιο τρόπο στην παρεμπόδιση της μεταγραφής ενός άλλου γονιδίου που επίσης ανήκει στην υπεροικογένεια του κυτοχρώματος P450, του CYP8B1, του οποίου η πρωτεΐνη ελέγχει την αναλογία CA και CDCA, μέσω SHP μεσολαβούμενης καταστολής με τη βοήθεια του Hepatic nuclear factor 4α (HNF 4α) (Zhang M and Chiang JYL 2001), ο οποίος συνδέεται απευθείας στο υποκινητή (promoter) του γονιδίου CYP8B1. Προκειμένου να αυξηθεί η υδατοδιαλυτότητα τους και συνεπώς να ελαττωθεί η κυτταροτοξικότητά τους (Moschetta A et al. 2001), τα CA και CDCA συνδέονται είτε με το αμινοξύ ταυρίνη είτε με το αμινοξύ γλυκίνη μετά από τη σύνθεσή τους (Falany CN et al 1994). Τα δύο ένζυμα BA-CoA synthase (BACS) και BA-CoA- aminoacid N-acetyltransferase (BAAT) (Solaas K et al. 2000) που είναι υπεύθυνα για αυτή τη σύνδεση ρυθμίζονται θετικά από τον FXR (Pircher PC et al 2003).

Στη συνέχεια, τα χολικά οξέα μαζί τα υπόλοιπα συστατικά της χολής τη φωσφατιδυλοχολίνη και τη χοληστερόλη εκκρίνονται από το ήπαρ. Ο FXR παίζει επίσης ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης πρωτεϊνών υπεύθυνων για τα μεταφορά και έκκριση των χολικών οξέων από το κύτταρο (Calkin AC et al. 2012). Έτσι, ο ενεργοποιούμενος από τα χολικά οξέα FXR προκαλεί αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών Bile salt export pump/ ATP binding cassette (BSEP/ABCA11) (Gerloff T et al. 1998) και Multidrug resistant protein 3/ATP binding cassette (MDR3 /ABCB4) (Huang L et al. 2003). Η BSEP είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που μεταφέρει ενεργητικά τα χολικά άλατα στο εξωτερικό του κυττάρου, χρησιμοποιώντας ενέργεια από το την υδρόλυση ATP. Ο σχηματισμός της χολής επιτελείται στην κορυφαία πλευρά των ηπατοκυττάρων Στα ποντίκια καταστροφή και των δύο αλληλομόρφων του γονιδίου της BSEP προκαλεί ολική βλάβη της ροής της χολής με ελάττωση της συνολικής παραγωγής των χολικών οξέων κατά 30% (Wang R et al. 2001). Η MDR3 είναι επίσης μια αντλία ενεργητικής μεταφοράς που συμμετέχει στην έκκριση της φωσφατιδυλοχολίνης στα χοληφόρα σωληνάκια. Στη χολή ποντικών με αδρανοποιημένα και τα δύο αλληλόμορφα γονίδια MDR3 (null) δεν ανιχνεύονταν χολικά φωσφολιπίδια, ενώ στη χολή ποντικών με αδρανοποιημένο το ένα μόνο αλληλόμορφο ανιχνεύονταν μισή περίπου ποσότητα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ζώα (Smit JJ et al. 1993). Μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες BSEP και MDR3 είναι υπεύθυνες για την βαθμιαία οικογενή ενδοηπατική χολόσταση (Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis PFIC) τύπου 2 (Strautnieks SS et al. 1998) και 3 (De Vree ML et al. 1998) αντίστοιχα. Η συνακόλουθη FXR εξαρτώμενη ενεργοποίηση BSEP και MDR3 έχει έναν εκτενή και προστατευτικό ρόλο για τον οργανισμό αφού η

κυτταροτοξικότητα των χολικών οξέων αποφεύγεται με την ενσωμάτωση τους στα φωσφολιπιδικά μυκήλλια. Σε κατάσταση νηστείας, τα χολικά οξέα αποθηκεύονται στη χοληδόχο κύστη, όπου συγκεντρώνεται η χολή, και σε ετοιμότητα, αναμένοντας ένα ερέθισμα που ακολουθεί κάποιο γεύμα μεταβαίνοντας από την κατάσταση νηστείας σε κατάσταση κορεσμού (Gadaleta RM et al. 2015).

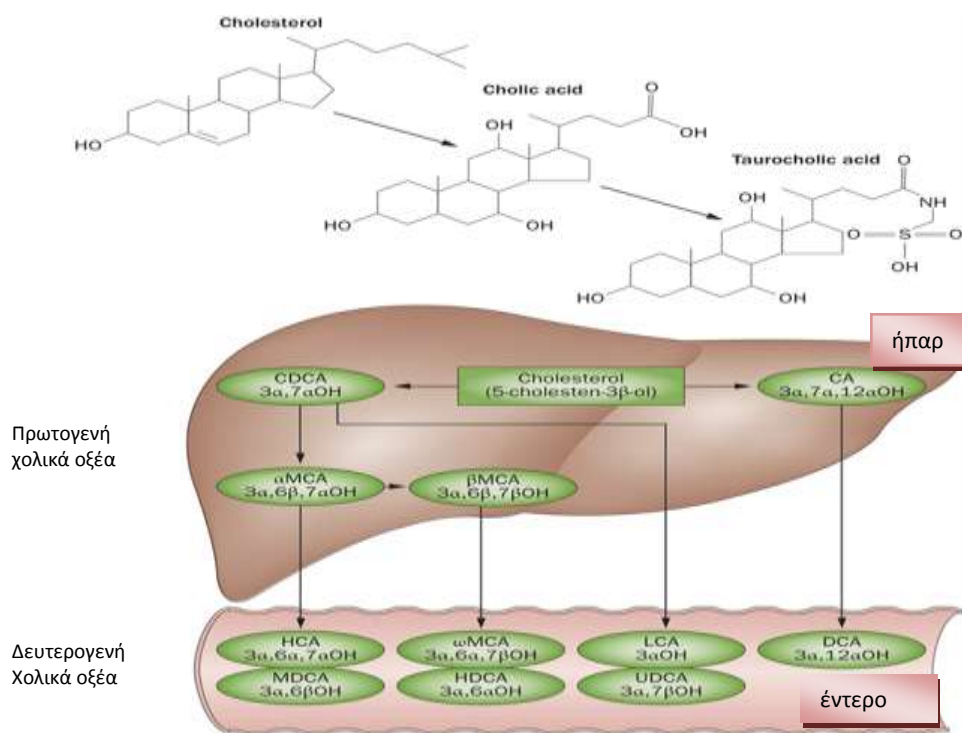
FXR στη χοληφόρο οδό

Κανονικά τα βακτήρια και τα προερχόμενα από το έντερο μοριακά πρότυπα παθογόνων μικροοργανισμών (Pathogen Associated Molecular Patterns PAMPS) απομακρύνονται από το αίμα με τη βοήθεια των κυτάρων Kupffer (Δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα που επενδύουν τα φλεβικά κολλοειδή του ήπατος) και κατόπιν εκκρίνονται στη χολή. Οι υγιείς χοληφόροι οδοί είναι στείροι και ανθεκτικοί σε προφλεγμονώδη ερεθίσματα προκαλούμενα από τα μοριακά πρότυπα παθογόνων μικροοργανισμών. Στην πραγματικότητα, αυτά είναι εξουδετερωμένα από την αλκαλική φωσφατάση και από ουσίες που εκκρίνονται από τους Toll-like receptor (TLR, β -defensins) της χοληφόρου οδού κατά την απόκριση σε λοίμωξη (Chignard N et al. 2009). Ο FXR έχει δείξει, ότι συμμετέχει στη διατήρηση του στείρου περιβάλλοντος της χοληφόρου οδού μέσω διαφόρων μηχανισμών: βοηθάει στη λειτουργία του υποδοχέα του Vasoactive intestinal peptide receptor-1 (VPAC1, μόριο ρυθμιστής της έκκρισης της χολής) (Chignard N et al. 2005), προάγει την έκφραση της α -crystallin (ένα μόριο το οποίο παρεμποδίζει το οξειδωτικό stress), και μαζί με το ενεργοποιημένο VDR επάγουν την έκφραση του αντιμικροβιακού πεπτιδίου cathelicidin στα επιθηλιακά κύτταρα της χοληδόχου κύστης (Chignard N et al. 2009, D'Aldebert E et al. 2009).

FXR στο έντερο

Μετά την είσοδο της τροφής στο στομάχι, η ορμόνη χολοκυστοκινίνη εκκρίνεται από την εγγύτατη εντερική οδό προκαλώντας σύσπασση της χοληδόχου κύστης και έκκριση της χολής στο λεπτό έντερο. Μετά, τα χολικά οξέα ταξιδεύουν κατά μήκος του εντέρου και επιτελούν την κύρια λειτουργία τους, διευκολύνοντας την απορρόφηση μορίων λιπιδικής σύστασης. Φθάνοντας στο άπω ειλεό, το 95% των χολικών οξέων επαναπροσροφώνται ενεργητικά με τη βοήθεια του ASBT (Wong MH et al. 1995). Στον ειλεό, η από τα χολικά οξέα εξαρτώμενη ενεργοποίηση του FXR επάγει την ενεργοποίηση του FGF 15/19 (ποντίκι/άνθρωπος αντίστοιχα). Ο Fibroblast growth factor 15/19 (FGF 15/19) είναι μια ορμόνη που εκκρίνεται στην πυλαία κυκλοφορία μέσω της οποίας φθάνει στο ήπαρ όπου και συνδέεται με το σύμπλεγμα FGFR4/ β -Klotho (Inagaki T et al 2005). Μετά από αυτή την σύνδεση ενεργοποιείται ένα από την JNK ενεργοποιούμενη c-jun εξαρτώμενο από την τελική N-κινάση μονοπάτι, το οποίο τελικά οδηγεί στην καταστολή του CYP7A1. Αυτός ο μηχανισμός δρα συνεργικά με την FXR-SHP εξαρτώμενη παρεμπόδιση της μεταγραφής του CYP7A1 στο ήπαρ (Kim I et al.2007). Στα εντεροκύτταρα, τα χολικά οξέα μεταφέρονται από την κορυφαία στην πλαγιοβασική μεμβράνη μέσω της πρωτεΐνης του εντέρου Intestinal bile acid binding protein (IBABP) (Gong YZ et al

2004, Tochtrop GP et al. 2004, Toke O et al. 2006) και ακολούθως εκκρίνονται στην πυλαία κυκλοφορία μέσω του ετεροδιμερούς Organic solute transporter (OSTα/β) (Dawson PA et al. 2005). Ενεργοποίηση του FXR στον άπω ειλεό καταστέλλει την έκφραση του ASBT, ενώ ενισχύεται η έκφραση του IBABP (Seol W et al 1995, Tochtrop GP et al. 2004, Toke O et al. 2006) και του OSTα/β (Landrier JF et al 2006, Rao A et al. 2008). Μέσω της πυλαίας φλέβας, τα χολικά οξέα μεταφέρονται πάλι πίσω στο ήπαρ, όπου η μεγαλύτερη ποσότητα επαναπορροφάται μέσω της πρωτεΐνης Sodium-taurocholotecotransporter protein (NTCP) και του πεπτιδίου Organic anion transporting polypeptide (OATP), τα οποία και τα δύο ρυθμίζονται αρνητικά από τον FXR με αποτέλεσμα να περιορίζεται αύξηση των χολικών οξέων στο ήπαρ. Κατόπιν, ο ενεργοποιούμενος στο ήπαρ FXR επάγει την έκφραση διαφόρων γονιδίων που τροποποιούν τα χολικά οξέα, προκειμένου να προστατευθεί το ήπαρ από την τοξική δράση τους. Αυτά τα γονίδια αφορούν τις πρωτεΐνες CYP3A4 και CYP3A11, τα οποία υδροξυλιώνουν τα χολικά οξέα, καθώς επίσης και τις πρωτεΐνες Sulphotransferase 2A1 (SULT2A1) και UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B4), οι οποίες τα θειώνουν και τα γλυκουρονιδιώνουν (Gnerre C et al 2004, Song CS et al 2001) αντίστοιχα. Τελικά τα χολικά οξέα εκκρίνονται και πάλι στη χολή κλείνοντας την εντεροηπατική κυκλοφορία (Εικ. 5)(Love MW et al. 1998).



Εικ.4 Σύνθεση χολικών οξέων (Nature Reviews Endocrinology 10, 488-498, 2014)

2.7.2 FXR και μεταβολισμός λιπιδίων και τριγλυκεριδίων

Η εξάλειψη του FXR από τα ποντίκια (FXR^{-/-}) αποκάλυψε τη σημασία του υποδοχέα στον μεταβολισμό των λιπιδίων. Τα συγκεκριμένα πειραματόζωα εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο αίμα και ελαττωμένη απορρόφηση χοληστερόλης στο έντερο (Calkin AC et al. 2012). Η εικόνα αυτή αποδίδεται στην ικανότητα του FXR να ελέγχει γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες μεταφέρουν τα υδρόφοβα λιπίδια σε όλα το σώμα. Τα τριγλυκερίδια και οι εστέρες χοληστερόλης, λόγω της υδρόφοβης φύσης τους, καταλαμβάνουν το εσωτερικό των λιποπρωτεϊνών, ενώ τα υδρόφιλα φωσφολιπίδια καταλαμβάνουν την επιφάνεια, επιτρέποντας έτσι την μετακίνηση των λιποπρωτεϊνών μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Οι πρωτεΐνες Very low density lipoprotein (VDLV, που περιέχουν μεγάλη ποσότητα τριγλυκεριδίων και μέτριες ποσότητες φωσφολιποειδών και χοληστερόλης) παράγονται στο ήπαρ από τα χυλομικρά τα οποία σχηματίζονται στο έντερο από τα λιπίδια της τροφής. Καθώς αυτές οι πρωτεΐνες κυκλοφορούν στο αίμα, αλληλεπιδρούν με ένζυμα και πρωτεΐνες που βρίσκονται στο αίμα ή στην επιφάνεια των κυττάρων, τροποποιώντας οι ίδιες την μορφή τους. Οι VLDL και τα χυλομικρά αλληλεπιδρούν με την Lipoprotein lipase (LPL) μέσω Apolipoprotein (APOCII), με αποτέλεσμα τα τριγλυκερίδια να απελευθερώνονται από τα συσσωματώματα και να υδρολύονται περαιτέρω σε λιπαρά οξέα. Ο FXR επάγει το *ApoC2* (γονίδιο της πρωτεΐνης APOCII), συμβάλλοντας στην ελάττωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων. Παρέχοντας σε φυσιολογικά ποντίκια τροφή πλούσια σε χολικά οξέα αυξάνεται η έκφραση APOCII και ελαττώνεται η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων. Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε σε ποντίκια FXR^{-/-}. Η πρωτεΐνη APOCIII δρα κατά αντίστροφο τρόπο και παρεμποδίζει την LPL (μέλος της οικογένειας των λιπασών). Αρνητική ρύθμιση του *ApoC3* από τον FXR επίσης μπορεί επίσης να συμβάλλει στην ελάττωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα. Αύξηση της έκφρασης *Vldlr* (γονίδιο του υποδοχέα της VDLV), *Pltp* (γονίδιο της PLTP) και *ApoE* (γονίδιο της πρωτεΐνης ApoE προκαλείται επίσης από την ενεργοποίηση του FXR γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ελάττωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα (Calkin AC et al. 2012).

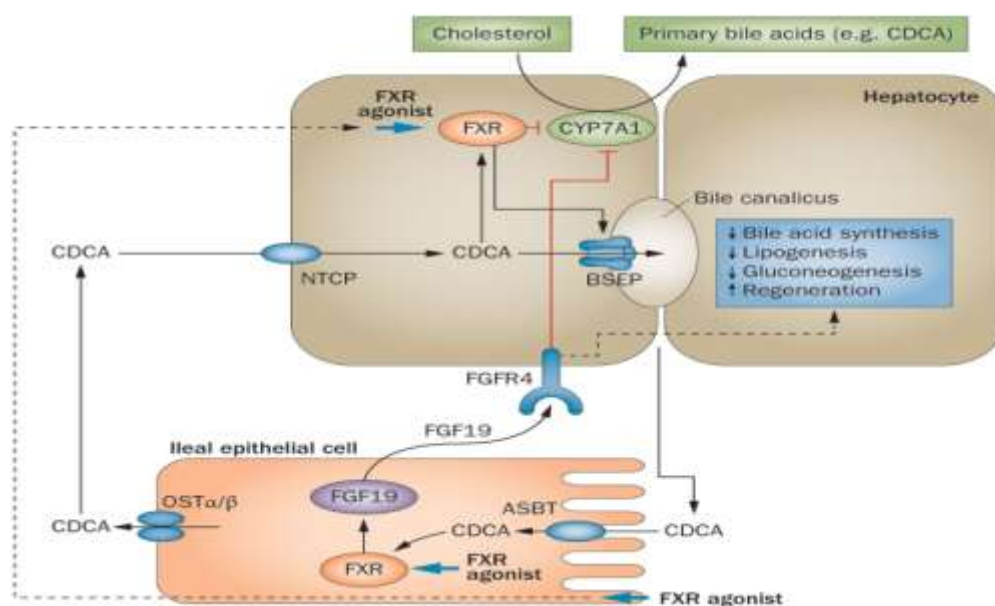
Ενεργοποίηση του FXR, έχει δειχθεί ότι ενεργοποιεί τα μονοπάτια λιπογένεσης. Ο FXR ελαττώνει την έκφραση της Sterol regulatory element-binding protein (SREBP1C) μέσω επαγωγής του SHP, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στα Shp^{-/-} ποντίκια. Το γονίδιο *Fas* επίσης έχει στον υποκινητή του μια περιοχή IR1 που μπορεί να αποτελεί θέση πρόσδεσης του FXR στο DNA και επομένως να αποτελεί και αυτό ένα γονίδιο στόχο του FXR. Στον άνθρωπο αλλά όχι στο ποντίκι, ενεργοποίηση του FXR επάγει την έκφραση του PPARα και τα γονίδια στόχους αυτού, αποτελούν ένα μονοπάτι μεταφοράς και οξειδωσης των λιπαρών οξέων. Τελικά ο FXR επάγεται από το PPAR-γ co-activator 1 α (PGC1α) άμεσα και έμμεσα μέσω PPARγ και Hepatic nuclear factor 4α (HNF4α). Το PGC1α είναι γνωστός ρυθμιστής ομάδας γονιδίων που συμμετέχουν στον ενεργειακό μεταβολισμό. Με τους παραπάνω μηχανισμούς φαίνεται ότι συνδράμει ο FXR στην ελάττωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα: ελαττώνοντας δηλ. την λιπογένεση και αυξάνοντας την

πρόσληψη, τον καταβολισμό και την οξειδωση των τριγλυκεριδίων και των λιπαρών οξέων (Calkin AC et al. 2012).

2.7.3 FXR και μεταβολισμός γλυκόζης

Ο FXR εμπλέκεται επίσης στο μεταβολισμό της γλυκόζης στο ήπαρ. Σε κατάσταση σίτισης, η γλυκόζη μετατρέπεται σε γλυκογόνο μέσω της γλυκογένεσης και αποθηκεύεται σε αυτή τη μορφή. Σε κατάσταση νηστείας, η γλυκόζη καταβολίζεται μέσω γλυκόλυσης και παράγει Adenosine triphosphate (ATP), το οποίο επίσης μπορεί να παραχθεί από μια άλλη διαδικασία μετατροπής μη υδατανθρακικών υποστρωμάτων, τη γλυκονογένεση. Ποντίκια με αδρανοποιημένα και τα δύο αλληλόμορφα γονίδια *FXR* εμφανίζουν ήπια δυσανεξία στη γλυκόζη και έλλειψη ευαισθησίας στην ινσουλίνη (Zhang Y et al. 2006), και τα νηστικά ζώα εμφανίζουν επίσης υψηλά επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα, καθώς γερνάνε (Ma K et al. 2006). Ενεργοποίηση του FXR ελαττώνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και καταστέλλει και το μονοπάτι της γλυκονογένεσης (Zhang Y et al. 2006, Cariou B et al. 2006). Ο FXR μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία στην ινσουλίνη όχι μόνο στο ήπαρ αλλά και σε άλλους περιφερειακούς ιστούς, όπως οι σκελετικοί μύες και στο λιπώδη ιστό, ελαττώνοντας τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Στο ήπαρ ενεργοποίηση του FXR επάγει τη σύνθεση του γλυκογόνου και καταστέλλει τα τρία ένζυμα που συμμετέχουν στη διαδικασία της γλυκονογένεσης: Phosphoenol-pyruvate carboxykinase (PEPCK), Fructose 1,6-bisphosphatase (FBP1), Glucose-6-phosphatase (G6Pάση). Η καταστολή της γλυκονογένεσης επιτυγχάνεται μέσω FGF15/19 (πρωτεΐνη που όπως αναφέρθηκε συμμετέχει στο σχηματισμό των χολικών οξέων), ο οποίος απελευθερώνεται μετά από γεύμα στο λεπτό έντερο και παρεμποδίζει την γλυκονογένεση στο ήπαρ, όπως και η ινσουλίνη με τη διαφορά ότι η ινσουλίνη, αυξάνεται στη μέγιστη συγκέντρωση της 15 λεπτά μετά την πρόσληψη της τροφής ενώ ο FGF15/19 45 λεπτά μετά την πρόσληψη τροφής, αφού αυξηθούν τα επίπεδα των χολικών οξέων στο έντερο. Ο FGF15/19 καταστέλλει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη γλυκονογένεση μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει αποφωσφορυλίωση και αδρανοποίηση της cAMP regulatory element-binding protein (CREB) η οποία με τη σειρά της αδρανοποιεί τον PGC1α και άλλα γονίδια που συμμετέχουν στη λειτουργία του ήπατος. Υπερέκφραση του PGC1α καταστέλλει την ανασταλτική δράση του FGF15/19 στα γονίδια της γλυκονογένεσης. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο FGF15/19 δρα ακολούθως της ινσουλίνης ως ένας ρυθμιστής της ομοιόστασης των υδατανθράκων στο ήπαρ μετά από πρόσληψη της τροφής (Calkin AC et al. 2012). Ο αγωνιστής του FXR, GW4064, αυξάνει τη σύνθεση γλυκογόνου στο ήπαρ, παράλληλα με την αύξηση των επιπέδων γλυκογόνου σε διαβητικά ποντίκια (Zhang Y et al. 2006, Cariou B et al. 2006). Έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση FGF19 σε κύτταρα 3T3-L1 (κύτταρα με φαινότυπο λιποκυττάρων), προκάλεσε αύξηση της πρόσληψης της γλυκόζης (Kurosu H et al. 2007) και ότι ο FGF19 επηρεάζει την σύνθεση του γλυκογόνου στο ήπαρ ανεξάρτητα από την επίδραση της ινσουλίνης και χωρίς να επηρεάζει τη λιπογένεση (Potthoff MJ et al. 2011). Το γεγονός ότι η ενεργοποίηση του FXR οδηγεί στη φωσφορυλίωση του IRS-1 μόριο που ακολουθεί την ενεργοποίηση υποδοχέα της ινσουλίνης καθιστά τους προσδέτες του FXR πιθανά φάρμακα στην θεραπεία των ασθενών με διαβήτη τύπου 2 (Ma K et

al. 2006). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η Akr 1b7, ένας καινούργιος προσδέτης του FXR ελαττώνει επίσης την γλυκόζη στο πλάσμα καθώς επίσης και τα επίπεδα ενζύμων που συμμετέχουν στη γλυκονογένεση και στη λιπογένεση (Ma K et al. 2006, Cariou B et al. 2006, Kurosu H et al. 2007, Potthoff MJ et al. 2011, Ge H et al. 2012). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι τροποποίηση της δραστηριότητας του FXR και του μεταβολισμού των χολικών οξέων βελτιώνουν γλυκαιμικούς δείκτες σε παχύσαρκα ποντίκια και σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 (Bays HE et al. 2008, Li T et al. 2010, Shang Q et al. 2010). Ωστόσο, σε μελέτες με ποντίκια που λάμβαναν τροφή πλούσια σε λιπαρά οξέα και ως εκ τούτου ήταν παχύσαρκα, η ενεργοποίηση του FXR από τον συνθετικό προσδέτη GW4064 προκάλεσε αύξηση του βάρους και δυσανεξία στη γλυκόζη. Επιπλέον ελαττώθηκε η βιοσύνθεση και τα αποθέματα των λιπαρών οξέων η κατανάλωση ενέργειας και γενικά επιδεινώθηκε η φυσιολογική κατάσταση του ήπατος και του λιπώδους ιστού. Χορήγηση λιπαρών οξέων σε αυτά τα ζώα προκάλεσε επαναφορά των αποθεμάτων των χολικών οξέων στα κανονικά επίπεδα και αναστροφή των ανωμαλιών του μεταβολισμού του ήπατος κατά τρόπο ανάλογο της δόσης της χορήγησης των λιπαρών οξέων. Η μελέτη αυτή δείχνει ότι μακροχρόνια χορήγηση συνθετικών αγωνιστών του FXR δεν είναι χρήσιμη στην αντιμετώπιση του μεταβολικού συνδρόμου αφού προκάλεσε αύξηση βάρους και δυσανεξία στη γλυκόζη ενώ αντίθετα, χορήγηση λιπαρών οξέων μπορεί να είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση του μεταβολικού συνδρόμου (Watanabe M et al. 2011). Ακόμα κλινικές μελέτες τα τελευταία χρόνια δείχνουν ότι η χρήση των παραγώγων λιπαρών οξέων για τη μείωση των επιπέδων της Low density lipoprotein (LDL) για την πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων, είχαν ως αποτέλεσμα την βελτίωση της κατάστασης των ασθενών με υπερλιπιδαιμία και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Bays HE et al. 2011, Fonseca VA et al. 2008, Garg A et al. 1994, Goldberg RB et al. 2008, Rosenson RS et al. 2009, Rosenstock J et al. 2010, Schwartz SL et al. 2010, Staels B et al. 2007, Zieve FJ et al. 2007).



Εικ.5 Δράση του FXR στην εντεροηπατική λειτουργία, (Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology 11, 55-67, 2014)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. FXR ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

Επιπλέον του ρόλου του FXR στη ρύθμιση μεταβολισμού των χολικών οξέων, λιπιδίων και γλυκόζης, σημαντική εμπλοκή εμφανίζει ο υποδοχέας στην καρκινογένεση στο ήπαρ και στο γαστρεντερικό σύστημα.

3.1 FXR και καρκίνος του μαστού

Ανοσοϊστοχημικά η πρωτεΐνη του FXR εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα των πόρων του φυσιολογικού μαστού, καθώς επίσης σε υψηλά ποσοστά και στα κύτταρα του διηθητικού πορογενούς αδενοκαρκινώματος (Swales et al. 2006). Μελέτη σε 65 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού έδειξε θετική συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του FXR με τους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες ER και του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 και TopoIIa. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι ο FXR σχετίζεται με κακή πρόγνωση ομάδας όγκων που εκφράζουν ER (Journe F. 2009).

Ειδικά για τον δείκτη Ki67 αναφέρεται συσχέτιση με τον FXR μόνο σε περιπτώσεις όγκων, θετικών σε ER, από μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Σε άλλη μελέτη, σε περιστατικά με καλή πρόγνωση διαπιστώνεται έντονη συσχέτιση της έκφρασης του FXR με την έκφραση των πρωτεϊνών Cyclin D και p27, μορίων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, ενώ σε περιστατικά κακής πρόγνωσης με την πρωτεΐνη c-myc. Η έκφραση του FXR σε όγκους αυλικού τύπου με θετικό ER ήταν αυξημένη σε σχέση με όγκους με αρνητικό ER, γεγονός που φανερώνει ότι ο FXR εκφράζεται λιγότερο σε λιγότερο διαφοροποιημένους όγκους, αλλά δεν παρατηρήθηκε σχέση του FXR σε όγκους θετικούς σε ER που υποτροπίασαν. Σε ότι αφορά τα επίπεδα DCA στο πλάσμα, αυτά ήταν κατά 52% αυξημένα σε ασθενείς, σε σχέση με υγιείς γυναίκες, ενισχύοντας την υπόθεση ότι τα DCA μπορεί να εμπλέκονται στο μηχανισμό δημιουργίας αυτής της νεοπλασίας (Costarelli and Sanders 2002). Σε υγιείς γυναίκες η έκφραση του FXR συνδέεται με τον BMI (δείκτη μάζας σώματος) και επομένως ίσως να αποτελεί ένα σύνδεσμο μεταξύ παχυσαρκίας και δημιουργίας και εξέλιξης του καρκίνου του μαστού (Kounalakis N et al. 2009).

Έκφραση του FXR παρατηρήθηκε σε δύο κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού: Τη σειρά MCF-7 που τα κύτταρά της εκφράζουν ER και τη σειρά MDA-MB-231 που τα κύτταρά της δεν εκφράζουν ER. Στις συγκεκριμένες σειρές μελετήθηκε ο ρόλος του FXR στη διήθηση των καρκινικών κυττάρων μέσω uPA και uPAR. Το uPA και ο υποδοχέας του uPAR καθώς επίσης και η F actin είναι από τους κύριους παράγοντες που συμβάλλουν στη μετανάστευση των νεοπλασματικών κυττάρων και την δημιουργία μεταστάσεων στον καρκίνο του μαστού (Rabani SA and Xing RH 1998, Kjoller L. and Hall A.). Στην καρκινική κυτταρική σειρά MDA-MB-231 η έκφραση του FXR ήταν χαμηλή ενώ όταν χορηγήθηκαν τα χολικά οξέα DC και CDC σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις προκάλεσαν μετατόπιση του FXR στον πυρήνα και την ακόλουθη ενίσχυση της μεταγραφής των γονιδίων uPA και uPAR από τον FXR και

τον σχηματισμό F actin. Αντίθετα, χορήγηση του Z guggulsterone, ανταγωνιστή του FXR προκάλεσε αύξηση της απόπτωσης, αντισταθμίζοντας τη δράση του αγωνιστή του FXR, DC. Όμως, οι συγκεντρώσεις του Z guggulsterone που απαιτούνται για να επαχθεί η απόπτωση είναι πολύ υψηλότερες από αυτές που θεωρείται ότι αντιστοιχούν στη χημική συγγένεια του με τον FXR. Για αυτό το λόγο εικάζεται ότι στην πυροδοτούμενη από το Z guggulsterone απόπτωση, εκτός από την αδρανοποίηση του FXR, ενεργοποιούνται παράλληλα και άλλα μονοπάτια μεταβίβασης σήματος. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης οδηγούν στο συμπέρασμα ότι, αρχικά το DC προσδένεται στον FXR, ο οποίος στη συνέχεια επάγει την μεταγραφή του δικού του γονιδίου αλλά και του uPA. Το εκκρινόμενο uPA δεσμεύεται στην επιφάνεια των κυττάρων στον υποδοχέα του uPAR, επάγοντας το σχηματισμό της F-actin και την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Έτσι, σωστή ρύθμιση της διατροφής που ελαττώνει τα επίπεδα DC, ή χορήγηση του ανταγωνιστή του FXR όπως το μόριο Z guggulsterone μπορεί να αποτελέσει σημαντικό όπλο στον καρκίνο του μαστού (Silva et al. 2006). Οι ενεργοποιητές του FXR, ο συνθετικός CDCA και GW4064 προκαλούν απόπτωση στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και MDA-MB-231 ανεξάρτητα από την έκφραση ER. Το μόριο CDCA δεν επηρέασε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και παρόλο που απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις του μορίου GW4064 ώστε να προκληθεί ο κυτταρικός θάνατος απ' ότι επαγωγή της μεταγραφής, η εξάρτηση του κυτταρικού θανάτου από το FXR θεωρείται σίγουρη. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες που προτείνουν ότι τα χολικά οξέα προάγουν την ανάπτυξη και μετάσταση του καρκίνου του μαστού. Από τα γονίδια στόχους του FXR που είναι πρωτεΐνες-μεταφορείς των χολικών οξέων, χορήγηση του προσδέτη GW4064 στην κυτταρική σειρά MCF-7 προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του IBABP και MRP2. Βέβαια, άλλες πρωτεΐνες-μεταφορείς μεταξύ των οποίων τα μόρια BSEP, ASBT, OATP8 και SLC21A6, επίσης γονίδια στόχοι του FXR δεν εκφράζονται ούτως ή άλλως σε αυτή την κυτταρική σειρά ανεξαρτήτως χορήγησης του συγκεκριμένου προσδέτη, ενώ τα MRP1 και SLC21A5 ελαττώθηκαν. Η ελάττωση του MRP1 μπορεί να φανεί επωφελής στην αντιμετώπιση της αντοχής καρκινικών κυττάρων στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Η έκφραση της ABCG2 μιας πρωτεΐνης που καθιστά ανθεκτικό τον καρκίνο και η πρωτεΐνη Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) δεν μεταβάλλονται. Η ενεργοποίηση του FXR δεν επηρεάζει τη δράση του φαρμάκου paclitaxel στα κύτταρα MCF-7, ένα φάρμακο που σχετίζεται με την υψηλή χημειοανθεκτικότητα. Τα μόρια SHP και LRH-1 εκφράζονται και στις δύο προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές και μάλιστα το SHP αυξάνεται μετά τη χορήγηση του GW4064. Η έκφραση του μορίου aromatase παρεμποδίστηκε από το GW4064 τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης, φανερώνοντας ότι το μονοπάτι FXR- SHP-LRH-1 είναι ενεργό στις κυτταρικές σειρές και μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να επιτευχθεί η αδρανοποίηση της έκφρασης του aromatase. Παρόμοια, στα κύτταρα MCF-7, το GW4064 καταστέλλει το αντιαποπτωτικό GADD45h. Από τα παραπάνω συνάγεται, ότι ο FXR μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον στην αντιμετώπιση του πορογενούς καρκίνου του μαστού (Swales KE et al. 2006). Η επαγόμενη από farnesol ενεργοποίηση του FXR σε κύτταρα MCF-7 οδήγησε σε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω αλληλεπίδρασης της θετικής έκφρασης του ER. Η αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατεστάλη εντελώς μετά από χορήγηση αντι-οιστρογόνων

Αντίθετα, τα κύτταρα MDA-MB-231 δεν επηρεάστηκαν από τη χορήγηση farnesol, δείχνοντας μια εμπλοκή του ER στην αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επί πλέον, το farnesol αυξάνει την έκφραση του PR (που χρησιμοποιείται ως δείκτης ενεργοποίησης του ER). Η συνεργασία του FXR με τον ER στην αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μπορεί να ληφθεί υπόψη στην κλινική χρήση των προσδετών του FXR για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού (Journe F et al. 2008).

Η ενεργοποίηση του FXR από το CDCA δεν είχε καμία επίδραση σε κύτταρα MCF-7 όταν αυτά καλλιεργούνταν σε μέσο με οιστρογόνα, ενώ ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός επάγονταν όταν αυτά καλλιεργούνταν χωρίς παρουσία οιστρογόνων (μοντέλο ορμονικής κατάστασης εμμηνοπαυσιακών γυναικών). Η συσχέτιση της έκφρασης του FXR με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό θα μπορούσε επεκταθεί και στην περίπτωση των ασθενών που παίρνουν αναστολείς της αρωματάσης, καθώς αυτά τα φάρμακα ελαττώνουν τα επίπεδα των οιστρογόνων στο πλάσμα απενεργοποιώντας ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση της αρωματάσης. Έτσι, πιθανότατα αυτή η επικοινωνία του FXR με τον ER, επάγει την κυτταρική διαίρεση και αναπτύσσουν τα καρκινικά κύτταρα την αντίσταση στη εφαρμοζόμενη θεραπεία. Προτείνεται ο FXR ως δείκτης χαρακτηρισμού του ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε όγκους που εκφράζουν τον ER (Journe F et al. 2009).

Τα καρκινικά κύτταρα μαστού 4T1 από ποντικό χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθεί η επίδραση του DCA στην απόπτωση σε σχέση με τις αλλαγές του μεταβολισμού σφιγγολιπιδίου κεραμιδίου, ενώ για τη μελέτη της επίδρασης του στη μετάσταση χρησιμοποιήθηκε πειραματικό μοντέλο με ποντίκια συγγενικά με αυτά από όπου προέρχονται τα καρκινικά κύτταρα μαστού 4T1. Στη συγκεκριμένη διαδικασία, όπου το DCA προάγει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει το μόριο VEGF μέσω του υποδοχέα του Flk-1 (Krishnamurthy K et al. 2008).

Το μόριο αποαμίνης το οποίο είναι ενεργοποιητής του FXR (Howard WR et al. 2000) χορηγήθηκε στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και MDA-MB-231 προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Niesor EJ et al. 2001). Μετά από χορήγηση 72 ωρών παρατηρήθηκε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στις δύο κυτταρικές σειρές ενεργοποιώντας σε συγκεκριμένο μονοπάτι τα μόρια κασπάσης και p38 MAPK και χωρίς να επηρεάζει τον εντοπισμό του Ras. Προσθήκη του μορίου metanolate (ενδιάμεσο μόριο στο σχηματισμό των χολικών οξέων) δεν παρεμπόδισε την δράση του aroamine (Lowe LC et al. 2005). Ακόμη χορήγηση του aroamine ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στην πλειονότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών που προέρχονταν από λευχαιμία, παχύ έντερο, ήπαρ, ωθήκες. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το μόριο aroamine μπορεί να λειτουργήσει ως ένα συνθετικό ανάλογο τη φαρνεσόλη εμπλέκοντας τον FXR στη διαδικασία της απόπτωσης (Flach J et al. 2000).

Είναι γνωστό ότι οι ινοβλάστες, στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον (CAFs), παίζουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νεοπλασίας. Σημαντικός ρυθμιστής της επικοινωνίας μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των CAFs θεωρείται η λεπτίνη, η οποία φαίνεται να ρυθμίζεται από τον FXR. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο συνθετικός

αγωνιστής του FXR GW4064 παρεμποδίζοντας τη δράση της leptin, παρεμβαίνει στην ογκογενετική δράση των CAFs. Συγκεκριμένα, ο GW4064 παρεμπόδισε την από leptin επαγόμενη αύξηση, κινητικότητα και διήθηση των κυττάρων σε κυτταρικές σειρές, που καλλιιεργήθηκαν σε μέσο παρουσία CAFs. Ο FXR αύξησε την έκφραση του SOCS3, αναστολέα της δράσης της λεπτίνης, με αποτέλεσμα την καταστολή δράσης των γονιδίων που επάγονται από αυτήν. Χορήγηση GW4064 σε πειραματόζωα που είχαν δεχθεί μοσχεύματα από κύτταρα MCF-7 μόνα τους ή μαζί με CAFs προκάλεσε ελάττωση των όγκων. Όγκοι στους οποίους είχε χορηγηθεί GW4064 εμφάνισαν ελαττωμένα επίπεδα πρωτεϊνών που ρυθμίζονται από την λεπτίνης, ενώ η έκφραση του SOCS3 ήταν έντονη. Επομένως οι προσδέτες του FXR μπορεί να συμπεριληφθούν στην αντικαρκινική θεραπεία προκειμένου να αποδυναμωθεί η υποστήριξη που παρέχουν οι CAFs στα καρκινικά κύτταρα. (Giordano C et al. 2016).

3.2 FXR ΚΑΙ ΑΛΛΟΙ ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

3.2.1 FXR, καρκίνος χοληφόρου οδού και ήπατος

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) είναι ο πέμπτος σε συχνότητα και η δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο. Η αιτιολογία της ασθένειας ποικίλλει και αφορά χρόνια ηπατική φλεγμονή και κυρίως ηπατίτιδα Β και C, η αλκοολική και μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος, χολόσταση και σε μικρότερη έκταση, κληρονομική αιμοχρωμάτωση, έλλειψη α-1-αντιθρυψίνης και μερικοί υπότυποι πορφυρίας (Bruix et al 2004).

Τα χολικά οξέα φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία καρκινωμάτων στις χοληφόρες οδούς, παρόλο που δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός δράσης τους. Η συμβολή τους στην καρκινογένεση επιβεβαιώνεται με χορήγηση χολικού οξέος GCDC σε κύτταρα χολαγγειοκαρκινώματος (ΧΚ), όπου παρατηρείται να επάγει την αύξηση του Cyclogenase-2 (COX-2, που ενοχοποιείται για τη δημιουργία καρκίνου) μέσω ενεργοποίησης μονοπατιού Mitogen-activated protein kinase (MAPK) από το Epidermal growth factor receptor (EGFR). Η παρουσία FXR έχει ανιχνευθεί σε αθανατοποιημένα κύτταρα χολαγγειοκαρκινώματος. (Yoon JH et al. 2002).

Μελέτη έχει δείξει, ότι ο SHP ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ότι η αδρανοποίησή του οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του ήπατος. Το γεγονός ότι ασθενείς με καρκίνο του ήπατος με ελαττωμένα επίπεδα του SHP φαίνεται να έχουν φτωχότερη πρόγνωση σε σύγκριση με ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα SHP, προσδίδει στον SHP πιθανότητα και ρόλο ογκοκατασταλτικού γονιδίου στο ήπαρ του ανθρώπου. Στο ήπαρ ασκεί τη συγκεκριμένη δράση του, καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων όπως Cyclin dependent kinase 4 (CDK4), Minichromosome maintenance protein (MCM5), EXOCS1, Cyclin B1 (CCNB1), BUB3, B cell like 2 L (BCL2L) που παίζουν ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Park YY et al. 2010). Ποντίκια με αποσιωπημένο το

γονίδιο SHP (SHP^{-/-}) ηλικίας 12 με 15 μηνών ανέπτυξαν ΗΚΚ με αυξημένο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αυξημένα επίπεδα Cyclin D1, οι δε ινοβλάστες εμφάνιζαν χαρακτηριστικά κακοήθων μετασχηματισμένων κυττάρων. Σε διαγονιδιακά ποντίκια, όπου η έκφραση SHP ήταν ενισχυμένη, το φαινόμενο αντιστράφηκε, και τα επίπεδα Cyclin D1 ελαττώθηκαν (Zhang Y et al. 2008). Η συσχέτιση μεταξύ ανάπτυξης ΗΚΚ και διαταραχής του μεταβολισμού των χολικών οξέων έχει παρατηρηθεί σε ζωικά μοντέλα, καθώς επίσης και σε ασθενείς. Αποτελώντας τον κύριο ρυθμιστή της ομοιόστασης των χολικών οξέων και βάσει των τελευταίων δεδομένων, ο FXR προστατεύει τον οργανισμό από το ΗΚΚ σε διάφορα επίπεδα. Ελέγχει την ομοιόσταση των χολικών οξέων προκειμένου να προστατευθεί το ήπαρ από την προκαλούμενη από αυτά βλάβη (Yang F et al. 2007, Zhang L et al. 2009, Kim I et al. 2009). Χρόνια αυξημένα επίπεδα προκαλούν οξειδωτική βλάβη στο DNA, φλεγμονή, αντίσταση στην απόπτωση αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, προάγοντας τον μετασχηματισμό των φυσιολογικών ηπατοκυττάρων σε καρκινικά (Jiang Y et al. 2013). Εργασίες αναφέρουν ότι ολική έλλειψη του FXR γονιδίου σε θηλυκούς και αρσενικούς αρουραίους στους οποίους ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα χολικών οξέων στον ορό, εμφανίζουν ΗΚΚ σε ηλικία 12 και 15 μηνών (Yang F et al. 2007, Zhang L et al. 2009, Kim I et al. 2009). Στα συγκεκριμένα ποντίκια τα επίπεδα έκφρασης της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-1β, του πρωτοογκογονιδίου β-κατενίνης και του αντίστοιχου γονιδίου-στόχου c-myc ήταν ήδη αυξημένα από την ηλικία των 3 μηνών (Yang F et al. 2007, Wolfe et al. 2011). Διατροφή πλούσια σε χολικά οξέα σε διαγονιδιακά ποντίκια με ηπατίτιδα Β προάγει το σχηματισμό ηπατοκυτταρικών όγκων και δίαιτα πλούσια σε CA προάγει την χημικά επαγόμενη ηπατοκυτταρική καρκινογένεση (Yang F et al. 2007).

Ο FXR φαίνεται να εμποδίζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης NF κB, η οποία συμμετέχει σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις και ενοχοποιείται σύμφωνα με μελέτες για το σχηματισμό όγκων. Εξ αιτίας αυτών αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων του, πιστεύεται ότι ο FXR συμβάλλει στην παρεμπόδιση ανάπτυξης του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Ωστόσο η αλληλεπίδραση του FXR με τον NF κB σε ότι αφορά τη ρύθμιση γονιδίων με αντιαποπτωτική λειτουργία π.χ. γονίδια της οικογένειας Bcl-2, όπως Bcl-Xl και Bfl-1/A1, ή των γονιδίων cIAP1 cIAP2, TRAF1, TRAF2 GADD45β παραμένει ανέπαφη. Δηλαδή, ο FXR επηρεάζει επιλεκτικά τον NF κB στη ρύθμιση των γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή μόνο και όχι αυτών που σχετίζονται με την παρεμπόδιση της απόπτωσης. Από την άλλη πλευρά, μελέτη σε φυσιολογικά ηπατικά κύτταρα από ποντικό έδειξε ότι, όταν ο NF κB ενεργοποιείται από τον Tumor necrosis factor α (TNF-α) καταστέλλει τον από τον προσδέτη GW4064 ενεργοποιούμενο FXR, γεγονός που δείχνει αμοιβαία παρεμπόδιση λειτουργίας των δύο μονοπατιών. Η καταστολή αυτή που παρατηρήθηκε μετά από επώαση των κυττάρων ηπατοβλαστώματος HepG2, με λιποσακχαρίτη (πρόκληση φλεγμονής), οφείλεται στην υπερέκφραση της υπομονάδας p65 του NF κB η οποία παρεμποδίζει την πρόσδεση του RXR στο DNA και επομένως και τον ετεροδιμερισμό του με τον FXR. Επομένως η ενεργοποίηση του FXR και η συμμετοχή του στην αντιβακτηριδιακή άμυνα μπορεί να είναι επωφελής για τον οργανισμό σε ό,τι αφορά την φλεγμονή/καρκινογένεση στο ήπαρ (Wang et al. 2008b).

Τα παραπάνω δεδομένα, που αφορούν την προστατευτικό ρόλο του FXR μέσω αποφυγής της ηπατικής φλεγμονής, συνάδουν και με δεδομένα από μελέτες σε πειραματόζωα. Σε ποντίκια ηλικίας 12 μηνών με πλήρως απενεργοποιημένο το γονίδιο του FXR (FXR^{-/-}) στο ήπαρ, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του Tumor necrosis factor (TNF α), Interleukin 1a (IL-1a), Interleukin 2 (IL2), καθώς επίσης, μετά από χορήγηση λιποσακχαρίτη, καθώς επίσης και τα επίπεδα Inducible nitric oxide synthase (iNOS), COX-2, Interferon gamma-induced protein 10 (IP 10, που επάγεται από την ιντερφερόνη) σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα. Ακόμα, τα επίπεδα του ALT, που αποτελεί δείκτη καταστροφής του ήπατος μετά από λήψη λιποσακχαρίτη, ήταν αυξημένα στα (FXR^{-/-}) πειραματόζωα. Άλλα γονίδια στόχοι του FXR που καταστέλλονται από τον NF κ B είναι το SHP και το BSEP και αυτό έχει δειχθεί τόσο σε κυτταροκαλλιέργειες όσο και σε πειραματόζωα (Wang et al. 2008b).

Στα πρώιμα γεγονότα της ανάπτυξης του ΗΚΚ περιλαμβάνονται η καταστολή των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών όπως του ρετινοβλαστώματος, P53, HNF4a, της πρωτεΐνης α που συνδέεται στον ενισχυτή CCAAT. Η παραπάνω διαδικασία αδρανοποίησης επιτυγχάνεται με τη βοήθεια μιας υπομονάδας του πρωτεοσώματος (μηχανισμός αποδόμησης πρωτεϊνών) γνωστής ως gankyrin, η οποία είναι ενεργοποιημένη σε πολλούς τύπους καρκίνου. Η αποσιώπηση του γονιδίου της gankyrin σε ποντίκια με την χρήση παρεμβαλλόμενων μικρών μορίων RNA (small interfered RNA), οδήγησε σε ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης καρκίνου του ήπατος. Ο FXR εμπλέκεται καταστέλλοντας την μεταγραφή του γονιδίου της gankyrin μετά την πρόσδεση του στον υποκινητή του γονιδίου της. Απουσία του FXR οδηγεί σε άρση της αναστολής της δράσης του υποδοχέα της gankyrin και ταυτόχρονη ανάπτυξη του καρκίνου σε μυσ ηλικίας 12 μηνών (Jiang Y et al.2013). Ο ενεργοποιημένος FXR μπορεί να καταστείλει τον σχηματισμό των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive oxygen species ROS) οι οποίες προκαλούν καταστροφή του DNA, γενωμική αστάθεια και επομένως και καρκινογένεση. Επίσης, η ενεργοποίηση του FXR ελαττώνει την ευαισθησία των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων στον παράγοντα Transforming growth factor β (TGF β), μία πρωτεΐνη που ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και καταστέλλει την έκκριση της εξωκυττάριας ουσίας από τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα (Hepatic stellate cells HSC). Πραγματικά, η έκφραση του FXR ελαττώνεται στα HSC σε ινωτικό ήπαρ γεγονός που συμβάλλει όπως φαίνεται στην ενίσχυση της ίνωσης (Fickert P et al.2009). Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει ο FXR και στον περιορισμό των μεταστάσεων. Συγκεκριμένα ενεργοποιεί το γονίδιο *Ndrp2*, το οποίο πιστεύεται ότι καταστέλλει τη μετάσταση κακοήθων κυττάρων από όγκους του ήπατος. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης NDRG2 στο ΗΚΚ, σε υψηλού κινδύνου αδένωμα, στο καρκίνωμα του παχέος εντέρου (Kim Y-J et al. 2009, Lorentzen A et al. 2007, Piepoli A et al. 2009) και σε άλλες κακοήθειες (Kim Y-J et al. 2010, Lorentzen A et al. 2012, Piepoli A et al. 2008) είναι ελαττωμένα. Η σχέση του γονιδίου με τον FXR έχει επίσης δειχθεί πειραματικά σε ήπαρ ποντικού και σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου ηπατώματος. Έτσι τα επίπεδα του mRNA του *Ndrp2* ελαττώνονται στο ήπαρ ποντικού με πλήρη έλλειψη του γονιδίου *FXR* σε σχέση με το φυσιολογικό ήπαρ ποντικών και σε δείγματα πρωτοπαθών ΗΚΚ σε διάφορα στάδια συγκρινόμενα με φυσιολογικό ήπαρ στον άνθρωπο και ακόμα το mRNA του *Ndrp2* μπορεί να επαχθεί από μη στεροειδείς αγωνιστές του FXR στο ήπαρ φυσιολογικών μυών. Η σταθερή

υπερέκφραση και ενεργοποίηση του FXR σε ποντίκια στα οποία είχαν ενεθεί SK-Hep-1 κύτταρα ηπατώματος ελάττωσε τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη του όγκου, τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και τον σχηματισμό μεταστάσεων (Lorentzen A et al. 2012).

Σε μοντέλα iVP16FXR διαγονιδιακών ποντικίων όπου ο FXR ήταν συνεχώς ενεργός ο οργανισμός ήταν προστατευμένος από χημικά και γενετικά επαγόμενη χολόσταση μέσω ελάττωσης της σύνθεσης των χολικών οξέων και αύξηση της απόθεσης των χολικών οξέων στο έντερο (Modica S et al. 2012). Σημαντικές ποσότητες FXR στο έντερο είναι δυνατόν να προστατεύσουν τον οργανισμό από την καρκινογένεση στο ήπαρ περιορίζοντας το υπερβολικό φορτίο χολικών οξέων, διορθώνοντας τον Fgf15/Fgfr4 άξονα σηματοδοτικού μονοπατιού και ενισχύοντας τους μηχανισμούς αποτοξίνωσης από τα χολικά οξέα και εκροής τους. Επιπλέον, ο ειδικά στο έντερο ενεργοποιούμενος FXR προστατεύει επίσης το ήπαρ ελατώνοντας τη φλεγμονή, από την αυξημένο ρυθμό κυτταρικής διαίρεσης FXR και την εναπόθεση κολλαγόνου (Degirolamo C et al. 2015)

Παρόλο που απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση, αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι ο FXR είναι αρνητικός ρυθμιστής της φλεγμονής και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο ήπαρ. Επομένως η φαρμακευτική ρύθμιση του FXR και του άξονα FXR-FGF19 θα ήταν επωφελής για τους ασθενείς με χολόσταση και ΗΚΚ (Gadaleta RM et al. 2015).

3.2.2 FXR και καρκίνος του γαστρεντερικού

Καρκίνος οισοφάγου

Ο καρκίνος του οισοφάγου είναι πτωχής πρόγνωσης με συνολική πενταετή επιβίωση περίπου 10%. Ο οισοφάγος Barrett θεωρείται ως ένας παράγοντας ανάπτυξης αδenoκαρκινώματος του οισοφάγου. Μελέτες δείχνουν αυξημένη έκφραση του FXR στην οισοφαγίτιδα, στον οισοφάγο Barrett και στο αδenoκαρκίνωμα σε σχέση με την έκφραση του στο φυσιολογικό βλεννογόνο. Στο αδenoκαρκίνωμα, η έκφραση του FXR ήταν ελάχιστη έως απύσα σε σχέση με την οισοφαγίτιδα και στον οισοφάγο Barrett (De Cottardi A. et al. 2006). Επιπλέον, τα επίπεδα mRNA του FXR και των γονιδίων *IBABP*, *SHP*, *IL-8* και *macrophage inflammatory protein 3 alpha* (*MIP3α*), που ρυθμίζονται από αυτόν, ήταν αυξημένα στον οισοφάγο Barrett (Capello A. et al. 2008). Οι πρωτεΐνες MUC παίζουν προστατευτικό ρόλο για τον βλεννογόνο του οισοφάγου. Στην υψηλόβαθμη δυσπλασία και στον οισοφάγο Barrett τα γονίδια των πρωτεϊνών *MUC1* και *MUC4* είναι αυξημένα. Έχει δειχθεί, ότι τα χολικά οξέα επάγουν την μεταγραφή του γονιδίου *MUC4* του οποίου η πρωτεΐνη εμπλέκεται στην αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε συνεργασία με την πρωτεΐνη ErbB2 (Mariette C. et al. 2004). Σε καλλιέργειες κυττάρων οισοφάγου Barrett, ο ανταγωνιστής gugglesterone του FXR προκάλεσε αύξηση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών και ελάττωση των αποπτωτικών πρωτεϊνών (Capello A. et al. 2008).

Καρκίνος στομάχου

Η παλίνδρομη ροή της χολής στο στομάχι συμβάλλει στην εντερική μεταπλασία και την καρκινογένεση στο στομάχι. Έχει δειχθεί ότι τα χολικά οξέα CDCA και DCA επάγουν τα μόρια Cdx2 και Mucin 2 (MUC2) σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης τα οποία προκαλούν μεταπλασία στην κυτταρική σειρά από φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα στομάχου αρυραίου RGM-1 με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Ο αγωνιστής του FXR, GW4064, επίσης επάγει την έκφραση Cdx2 και MUC2 φαινόμενο που αντιστρέφεται από τη χορήγηση του guggulsterone (ανταγωνιστή του FXR). Επομένως η ενεργοποίηση του FXR μπορεί να παίζει πιθανότατα σημαντικό ρόλο στην έναρξη της εντερικής μεταπλασίας και καρκινογένεσης στο στομάχι (Xu Y et al. 2010)

Καρκίνος του παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ο τρίτος πιο συχνός διαγιγνωσκόμενος καρκίνος στους άντρες και ο δεύτερος στις γυναίκες. Στον δυτικό κόσμο, ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι η τέταρτη αιτία θανάτου στους ενήλικες (Karsa LV et al. 2010). Η παθογένεια της νόσου είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία που περιλαμβάνει πολλές γενετικές μεταλλαγές κατά την μετατροπή του αδενώματος σε καρκίνωμα. Η διατροφή και εν γένει ο τρόπος ζωής είναι οι επιδημιολογικοί παράγοντες που σχετίζονται με την ογκογένεση στο παχύ έντερο. Ο καθιστικός τρόπος ζωής σε συνδυασμό με διατροφή πλούσια σε λίπη και υδατάνθρακες μεταβάλλουν την έκκριση των χολικών οξέων (Slattery ML 2000) και φαίνεται ειδικά τα δευτερογενή χολικά οξέα να συνδέονται με τη δημιουργία καρκίνου παχέος εντέρου (Peterlik M 2008). Μελέτες σε ζώα και επιδημιολογικά δεδομένα σε ανθρώπους δείχνουν ότι η εξέλιξη του όγκου μια διατροφή πλούσια σε λιπαρά συνδέεται με αυξημένες συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων στο έντερο και υψηλότερα επίπεδα τους στα κόπρανα (Bianchini F et al. 1989, Reddy BS et al. 1978). Επιπλέον η χολοκυστεκτομή η οποία αυξάνει την έκθεση του εντερικού σωλήνα στα χολικά οξέα, φαίνεται να είναι ένας παράγοντας προδιάθεσης για την ανάπτυξη του καρκίνου του εντέρου. Τα χολικά, δεοξυχολικά και τα λιθοχολικά οξέα μπορούν να επάγουν το σχηματισμό όγκου στο παχύ έντερο επηρεάζοντας άμεσα τον πολλαπλασιασμό των αδιαφοροποίητων επιθηλιακών κυττάρων του βλεννογόνου (Debruyne PR et al. 2001, Zimber A et al. 1994, Zimber A et al. 2000, Zimber A et al. 2008).

Επιπλέον, η χρόνια φλεγμονή που υπάρχει στην ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο σχηματισμού όγκων. Παράγοντες κινδύνου σε ασθενείς με τη συγκεκριμένη νόσο αποτελούν η διάρκεια της νόσου, το οικογενειακό ιστορικό σε περιπτώσεις σποραδικού καρκίνου του παχέος εντέρου, η ενεργή φλεγμονή του παχέος εντέρου και η συνδεόμενη με πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (Ullman TA et al. 2011). Ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα και συνδεόμενη δυσπλασία ή καρκίνωμα εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα χολικών οξέων στα κόπρανα σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς νεοπλασία. Έκθεση των κυττάρων του εντέρου σε υψηλότερο φορτίο δευτερογενών χολικών οξέων έχει θεωρηθεί μια

πιθανή εξήγηση της καρκινογένεσης που εμφανίζεται σε μία ομάδα ασθενών με πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγειίτιδα (Hill MJ et al. 1987).

Τα χολικά οξέα πιστεύεται ότι εμπλέκονται στον καρκίνο του παχέως εντέρου παρόλο που δεν είναι πλήρως κατανοητός ο μηχανισμός εμπλοκής. Σε αδενώματα παρατηρήθηκε ελαττωμένη έκφραση του FXR σε σχέση με το φυσιολογικό βλεννογόνο του παχέως εντέρου. Η ελάττωση αυτή ήταν ακόμη πιο έντονη σε κακοήθεις όγκους. Σε σειρές SW-480 και SW620 με κύτταρα μεταστατικού αδενοκαρκινώματος δεν ανιχνεύθηκε FXR ενώ σε σειρές Caco-2 και HT29 με κύτταρα καλύτερα διαφοροποιημένα παρατηρήθηκε σημαντική έκφραση FXR. Συνεπώς, φαίνεται η παρουσία του FXR να σχετίζεται αντίστροφα με αποδιαφοροποιημένα κύτταρα των όγκων (De Gottardi A et al. 2004). Σε ποντίκια ηλικίας 12 μηνών με έλλειψη FXR παρατηρήθηκαν περιοχές παχέως εντέρου με λαχνωτή υπερπλασία, ενώ στα αντίστοιχα πειραματόζωα ηλικίας 2 μηνών η μορφολογία του παχέως εντέρου ήταν παρόμοια με των φυσιολογικών πειραματοζώων. Ανεξαρτήτου ηλικίας, τα ποντίκια με έλλειψη FXR εμφάνιζαν μετρίως αυξημένο ύψος κρυπτών, με λιγότερες περιοχές λεμφοκυττάρων και ελαττωμένο αριθμό κυττάρων goblet (Maran RR et al. 2009)

Ποντίκια με μετάλλαξη (Min=Multiple intestinal neoplasia) στο γονίδιο *Adenomatous polyposis coli* (*APC* που είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο) και απενεργοποίηση του αλληλομόρφου του γονιδίου *FXR* (*APC^{Min/+}, FXR^{+/-}*) εμφάνισαν αυξημένο αριθμό και μέγεθος όγκων σε σχέση με ποντίκια *APC^{-/+}, FXR^{+/+}*. Ποντίκια *APC^{Min/+}, FXR^{-/-}* ηλικίας 7-8 εβδομάδων είχαν ήδη στο έντερο βλάβες τύπου αδενώματος και η έντονη παρουσία ουδετερόφιλων και μακροφάγων στο έντερο που θεωρείται πιθανή αιτία της ανάπτυξης όγκων. Η χορήγηση cholestyramin, μιας ουσίας που δεσμεύει τα χολικά οξέα και εμποδίζει την επαναπροσρόφησή τους από το έντερο, σε ποντίκια ηλικίας ενός μηνός *APC^{Min/+}, FXR^{+/+}* και *APC^{Min/+}, FXR^{-/-}* δεν προκάλεσε διαφορές στην εμφάνιση βλαβών μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων. Επομένως, η απουσία του FXR από το εντερικό επιθήλιο και όχι αυτά κάθε αυτά τα αυξημένα επίπεδα των χολικών οξέων καθιστούν το έντερο ευάλωτο στην καρκινογένεση. Σε ποντίκια που ενέθηκαν καρκινικά κύτταρα των σειρών LS174T και HT29, ενεργοποίηση του FXR αύξησε σημαντικά την απόπτωση και ελάττωσε τον ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού περιορίζοντας έτσι την αύξηση του μεγέθους του όγκου. Η ενεργοποίηση του FXR από τον προσδέτη του GW4064 περιόρισε την εξέλιξη των όγκων επάγοντας τη μεταγραφή προαποπτωτικών γονιδίων (Modica S et al. 2008). Ελάττωση των αδενωμάτων σε ποντίκια *APC^{Min/+}* προκάλεσε και η χορήγηση NaTC σε αυτά, όπου παρατηρήθηκε αύξηση της μεταγραφής γονιδίων στόχων του FXR όπως *SHP*, *FGF15* και *IBABP*. Ο μηχανισμός δράσης σχετίζεται με την ελάττωση των επιπέδων Cyclin D1 μέσω *SHP* (Smith DL et al. 2010).

Τα επίπεδα της πρωτεΐνης-μεταφορέα των χολικών οξέων *IBABP* ήταν αυξημένα στο νεοπλασματικό βλεννογόνο του παχέως εντέρου. Συγκεκριμένα, η έκφρασή της ήταν 4,9 φορές αυξημένη σε αδενώματα του παχέως εντέρου σε σχέση με το με το φυσιολογικό βλεννογόνο παχέως εντέρου, 17,4 φορές αυξημένη σε καρκινώματα σταδίου I και 38,6 φορές αυξημένη σε καρκινώματα σταδίου IV σε σχέση με το φυσιολογικό παχύ έντερο (De cottardi et al 2004). Ένα καινούργιο μετάγραφο του ονομαζόμενο *IBABP-L*, το οποίο δεν ρυθμίζεται από τον FXR όπως το *IBABP* αλλά

από το NF-κβ (που σχετίζεται με την απόκριση σε φλεγμονή) είναι απαραίτητο για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Φυσιολογικά επίπεδα χολικού οξέος DCA μέσω σύνδεσης με το IBABP-L καθιστούν τα καρκινικά του παχέος εντέρου ανθεκτικά στην απόπτωση. Αδρανοποίηση του γονιδίου IBABP-L τα καρκινικά κύτταρα οδηγούνται στον κυτταρικό θάνατο (Fang C et al. 2007).

Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Src kinase θεωρείται συχνό και πρώιμο συμβάν στην πρόοδο του καρκίνου του εντέρου. Η χορήγηση χολικών οξέων σε σειρές καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου PCmsrc διέγειρε την διηθητική ικανότητα τους μέσω ενεργοποίησης των πρωτεϊνών RhoA/Rho οι οποίες τελικά προάγουν την ενεργοποίηση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης με επακόλουθο την ενεργοποίηση μονοπατιών υπεύθυνων για την κυτταροκίνηση και τέλος διείσδυση και επέκταση των καρκινικών κυττάρων (Debruyne PR et al. 2002)

Εξ αιτίας του ρόλου του FXR στη ρύθμιση της ομοιόστασης, της φλεγμονής και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, πιστεύεται ότι ο FXR παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του παχέως εντέρου (Maran RR et al. 2009, Modica S et al. 2008)

Επίσης έχει δειχθεί ότι η έκφραση του FXR είναι ελαττωμένη σε ασθενείς με πρωτοπαθή σκληρυντική αγγειίτιδα και σε περιπτώσεις κολίτιδας συνδεδεμένες με νεοπλασία (Torres J et al. 2013). Σημειωτέον, ότι ελαττωμένα επίπεδα έκφρασης FXR στο βλεννογόνο του εντέρου συνδέονται αντιστρόφως με την συχνότητα εμφάνισης καρκίνου κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα. Ο ειλεός, ο οποίος φυσιολογικά έχει υψηλά επίπεδα έκφρασης FXR εμφανίζει χαμηλή επίπτωση καρκίνου, ενώ στο παχύ έντερο συχνά εμφανίζεται καρκίνος στα περιφερικά τμήματα όπου η έκφραση του FXR είναι χαμηλή. Χαμηλή έκφραση των επιπέδων του mRNA έχει αναφερθεί σε πολύποδες και ακόμα χαμηλότερη στο αδενοκαρκίνωμα του παχέως εντέρου. Επιπλέον, η έκφραση του FXR ελαττώνεται νωρίς κατά την εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Η χαμηλή έκφραση μπορεί να οφείλεται στη μεθυλίωση του DNA και στη σηματοδότηση του KRAS (Bailey AM et al. 2014.).

Αρκετές μελέτες δείχνουν, σε ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου FXR αυξημένα επίπεδα κυτταρικού πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων και σχηματισμό όγκου και ότι η παρουσία του καταστέλλει την καρκινογένεση στο έντερο ποντικών *Arc*^{min/+} και σε ποντίκια με χρόνια κολίτιδα ρυθμίζει το μονοπάτι Wnt και την απόπτωση. Έχει δειχθεί ότι ενεργοποιημένα μακροφάγα επάγουν επιπλέον την ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt/β κατενίνη και την ανάπτυξη καρκίνου σε ποντίκια με φυσιολογικό το γονίδιο *Arc* μέσω του TNFα. Δεδομένου ότι τα ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου FXR έχουν ευαίσθητο έντερο με διαπερατή δομή (Gadaleta RM et al. 2011), μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω ευαισθησία στον καρκίνο του παχέος εντέρου με επιπλέον ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt/β κατενίνης μέσω του TNFα που απελευθερώνεται από μακροφάγα που διαπερνούν τον βλεννογόνο του εντέρου (Modica S et al. 2008).

Έχει επίσης δειχθεί ότι το ταυροχολικό νάτριο των χολικών αλάτων εμποδίζει τον σχηματισμό αδενώματος στο έντερο *Arc*^{Min/+} ποντικών μέσω ενεργοποίησης του FXR με ενίσχυση του γονιδίου *Shp* και καταστολή της Cyclin D1 (Smith DL et al..

2010). Αντίθετα με τους όγκους στο ήπαρ, η ευαισθησία των ποντικών $FXR^{-/-}$ στην καρκινογένεση του εντέρου δεν συνδέεται με αυξημένα επίπεδα χολικών οξέων, όπως φαίνεται με χορήγηση της cholestyramin (συστατικό της χολής), δείχνοντας ότι η απώλεια του FXR και όχι τα μερικώς αυξημένα επίπεδα χολικών οξέων, οδηγούν στην καρκινογένεση (Modica S et al. 2008). Στον καρκίνο του παχέος εντέρου στον άνθρωπο η Src κινάση ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με τη βοήθεια αλληλεπίδρασης του FXR και του EGFR. Παρεμπόδιση της δράσης του FXR με τον φυσικό ανταγωνιστή FXR guggulsterone επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με ενεργοποίηση του EGFR και των μορίων που ενεργοποιούνται από αυτόν όπως η ERK, ενώ η ενεργοποίηση του FXR από το μόριο GW4064 εμποδίζει αυτή τη διαδικασία (Peng Z et al.2012).

3.2.3 FXR και καρκίνος του παγκρέατος

Ο καρκίνος του παγκρέατος είναι ένας από τους πιο επιθετικούς καρκίνους αριθμώντας 200.000 θανάτους παγκοσμίως, το χρόνο (Raimondi S et al. 2009). Αποσιώπηση του γονιδίου *FXR* σε καρκινικές σειρές κυττάρων του παγκρέατος MIA-PaCa2 και PANC-1 παρεμπόδισε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση κυττάρων και στις δύο σειρές. Επιπλέον, όταν ενεργοποιήθηκε ο FXR με χορήγηση του guggulsterone (ανταγωνιστή του FXR), και στις δύο κυτταρικές σειρές παρατηρήθηκε ελάττωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης των κυττάρων και της διήθησης σε βαθμό ανάλογο της χορηγούμενης δόσης. Χορήγηση του αγωνιστή GW4064 αύξησε την κυτταρική μετανάστευση και διήθηση, και στις δύο σειρές.

Τα φυσικά παράγωγα των ισοπρενοειδών, όπως υπεραλλυλική αλκοόλη (perillyl alcohol), φαρνεσόλης (farnesol) και γερανιόλης (geraniol) μειώνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στην σειρά MIA-PaCa2, διατηρώντας τα κύτταρα στη φάση G0/G1 του κυτταρικού κύκλου, γεγονός που συμπίπτει με την αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών p21Cip1 και p27Kip1 και την ελάττωση των επιπέδων Cyclin A, Cyclin B1, Cdk2. Το farnesol προκάλεσε παρόμοια αποτελέσματα όταν χορηγήθηκε και στην καρκινική κυτταρική σειρά BxPC-3. Παρόλο που δεν συνδέεται ισχυρά με τον FXR και ως εκ τούτου ο τρόπος δράσης του FXR μέσω ενεργοποίησης του farnesol δεν αποτελεί ένα γενικευμένο μηχανισμό δράσης του τελευταίου στην απόπτωση, ωστόσο δεν μπορεί να αποκλεισθεί αλληλεπίδραση των παραγόντων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τον FXR (Wiseman DA et al. 2007). Μετά από 48ωρη χορήγηση υπεραλλυλικής αλκοόλης, φαρνεσόλης και γερανιόλης στην καρκινική σειρά κυττάρων παγκρέατος BxPC3 παρατηρήθηκε 3 έως 10 φορές αύξηση στην απόπτωση και υψηλότερη έκφραση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bak. Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος ελαττώθηκε σε πειραματόζωα με διατροφή που περιείχε υπεραλλυλική αλκοόλη και φαρνεσόλη, ενώ ο ρυθμός της απόπτωσης αυξήθηκε και σχεδόν απουσίαζε η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη BCL-XL (Burke YD et al. 2002).

Σε περιστατικά καρκινώματος παγκρέατος, η έκφραση του FXR ανιχνεύθηκε στο 70,6% των περιπτώσεων με λεμφαδενική μετάσταση, σε αντίθεση με τα περιστατικά

χωρίς λεμφαδενική μετάσταση όπου ανιχνεύθηκε FXR μόνο στο 17,6% των περιπτώσεων. Αυτό δείχνει φτωχότερη πρόγνωση των ασθενών με όγκο θετικό για το FXR (Lee JY et al. 2011).

Σε πρόσφατη μελέτη 55 περιστατικών αδενοκαρκινώματος παγκρέατος, αναγνωρίστηκε πυρηνική ή/και κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική έκφραση του FXR σε 33 περιπτώσεις. Η έκφραση του FXR ήταν εντονότερη σε ασθενείς με μικρό μέγεθος όγκου και απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων. Επιπλέον ασθενείς με υψηλή έκφραση του FXR εμφάνιζαν μεγαλύτερο διάστημα συνολικής επιβίωσης σε σχέση με ασθενείς με χαμηλή έκφραση. Στην ίδια μελέτη, η συνέκφραση FXR/RXRα παρατηρήθηκε κυρίως σε ασθενείς με χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης, συνέκφραση FXR/RXRβ σε όγκους πρωιμότερου σταδίου, μικρότερο μέγεθος όγκου και απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά) και συνέκφραση FXR/RXRγ παρατηρήθηκε σε όγκους σε πρωιμότερο στάδιο, μικρότερο μέγεθος και απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν τον δυνητικό ρόλο του FXR και RXR στην εξέλιξη της κακοήθειας στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος και ενδεχομένως τη χρήση στη θεραπευτική αγωγή (Giaginis C et al. 2015)

3.2.4. FXR και καρκίνος των όρχεων

Η υπερέκφραση της αρωματάσης παίζει σημαντικό ρόλο στην υπέρμετρη παραγωγή οιστρογόνων τα οποία συντηρούν την ογκογένεση των κυττάρων Leydig. Έχει δειχθεί ότι ο FXR εκφράζεται σε φυσιολογικούς ιστούς και όγκους όρχεων σε αρουραίους Fischer και σε φυσιολογικά κύτταρα Leydig καθώς επίσης και στις αντίστοιχες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Στην καρκινική σειρά R2C κυττάρων Leydig, οι ενεργοποιητές του FXR, CDCA και GW4064, κατέστειλαν την έκφραση του μορίου *aromatase* τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης, καθώς επίσης και τη δραστηριότητα του ως ένζυμο. Στην προκειμένη περίπτωση ο FXR ανταγωνίζεται τον παράγοντα SF-1 κατά την πρόσδεσή του στον υποκινητή PII του γονιδίου του *aromatase*. Η έκφραση του SHP δεν επηρεάζεται από την ενεργοποίηση του FXR στα καρκινικά κύτταρα Leydig, ενώ αδρανοποίηση του *aromatase* συνέβη ακόμα και στην περίπτωση που το SHP ήταν πλήρως αδρανοποιημένο. Επομένως, φαίνεται να μην είναι απαραίτητη, τουλάχιστον στα κύτταρα R2C, η λειτουργία του SHP. Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αντεστράφη κατόπιν αδρανοποίησης του FXR με χρήσης siRNA. Η αδρανοποίηση του μορίου *aromatase* ελάττωσε την παραγωγή οιστραδιόλης στα R2C κύτταρα (Catalano S et al. 2010).

3.2.5 FXR και καρκίνος του προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη είναι η δεύτερος πιο συχνός διαγνωσμένος καρκίνος και ο έκτος σε αιτία θανάτου στους άντρες (Jemal et al. 2011). Τα ανδρογόνα στον προστάτη αδρανοποιούνται στα συζυγή υδρόφιλα γλυκουρονίδια τα οποία στον άνθρωπο σχηματίζονται από τα ένζυμα UDP-glucuronosyltransferase B15 και B17 (UGT2B15 και UGT2B17). Ο FXR ανιχνεύεται στα επιθηλιακά του προστάτη και έχει επιβεβαιωθεί ότι οι ενεργοποιητές του ρυθμίζουν τον μεταβολισμό των ανδρογόνων στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη LNCaP. Η ενεργοποίηση του FXR προκαλεί

δραματική ελάττωση της έκφρασης των γονιδίων UGT2B15 και UGT2B17 οδηγώντας στην ελάττωση της σύνδεσης του hydrophilic glucuronide με το ανδρογόνο DHT και τους ελαττωμένους μεταβολίτες Anethol dithiolthione (ADT) και 3α-DIOL. Πιθανότατα στη συγκεκριμένη διαδικασία να παίζουν ρόλο οι παράγοντες AP-1. Το γεγονός ότι η έκφραση των Ugt2b αυξήθηκε στον φυσιολογικό προστάτη σε σχέση με αυτόν από τον οποίο απουσίαζε ο FXR, δείχνει εμπλοκή του ADT ως έναν πιθανό προσδέτη του FXR. Επί πλέον, σε ασθενείς με χολόσταση όπου τα επίπεδα των χολικών οξέων στο πλάσμα ήταν δραματικά αυξημένα η σύνδεση των ανδρογόνων στον προστάτη με το hydrophilic glucuronide ήταν ελαττωμένη. Αυτό δείχνει ότι ο FXR αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστή στο μεταβολισμό των ανδρογόνων (Kaeding J et al. 2008, Verreault M et al. 2010).

3.2.6 Κλινικές μελέτες

Η πρόκληση κυτταρικού θανάτου από το μόριο αποαμίνης μελετήθηκε σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου μελανώματος. Στη σειρά A375 βρέθηκε ότι, δρα μέσω ενός μηχανισμού που εδράζεται στην κυτταρική μεμβράνη και είναι ανεξάρτητος της ενεργοποίησης του μορίου κασπάση-3, ενώ στη σειρά UACC 3093 δρα ανεξάρτητα και από το μηχανισμό σύνδεσης του N-Ras με το μόριο φαρνεσίλη (παράγωγο της φαρνεσόλης), ένα μηχανισμό που έχει περιγραφεί γενικά ως τρόπος δράσης της αποαμίνης σε άλλους τύπους καρκίνου (Flach et al. 2000). Η αποαμίνη θεωρείται προσδέτης του FXR, αλλά η έκφραση του FXR στα κύτταρα A375 είναι πολλή χαμηλή για να υποθεθεί ότι της αποαμίνης δρα μέσω αυτού. Σε δοκιμή φάσης II, όπου χορηγήθηκε αποαμίνη σε ασθενείς με μελάνωμα που δεν είχαν ανταποκριθεί σε θεραπεία (refractory), η νόσος σταθεροποιήθηκε σε 2 ασθενείς (5%). Σε 6 ασθενείς (14%) παρατηρήθηκε διάστημα 16 εβδομάδων ελεύθερο εξέλιξης νόσου και ο μέσος όρος επιβίωσης ήταν 6,1 μήνες. Το κοιλιακό άλγος ήταν η πιο συχνή ανεπιθύμητη παρενέργεια στο 26% των ασθενών. Το γεγονός ότι με την χορήγηση του aromine επετεύχθη ρυθμός επιβίωσης χωρίς πρόοδο της νόσου για το διάστημα των 16 εβδομάδων σε ποσοστό μικρότερο του 30% (όριο για να χαρακτηριστεί ένας παράγον επωφελής), αποτρέπει την περαιτέρω χρήση του ως φάρμακο στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Ωστόσο, οι ερευνητές της συγκεκριμένης μελέτης δεν αποκλείουν την μέσω του FXR αντινεοπλασματική δράση του aromine (Tavassoli FA, Devilee P 2003).

Σε φαρμακοκινητική δοκιμή φάσης I σε συνδυασμό με *in vitro* μελέτη κινητικής φάσης II, χρησιμοποιήθηκαν 35 δείγματα φρέσκου ιστού με καρκίνο των ωοθηκών. Κατόπιν κατάλληλης επεξεργασίας, κύτταρα από τους όγκους αυτούς επωάστηκαν σε μέσο με αποαμίνη. Η πλειονότητα τους εμφάνισε ευαισθησία στην ουσία δηλ. τα κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν σε ποσοστό <30% σε σχέση με κύτταρα μάρτυρες που δεν είχαν επωαστεί. Τα αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα με αυτά της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων cispatin, carboplatin, και topotecan και καλύτερα από του φαρμάκου paclitaxel σε κλινικά αποδεκτές συγκεντρώσεις.

Σε μελέτες η φαρνεσόλη και τα αντίστοιχα ισοπρενοειδή μεταξύ των οποίων η γερανιόλη και η υπεραλλυλική αλκοόλη, παρεμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγουν την απόπτωση σε πλήθος κακοηθειών όπως το αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος και των πνευμόνων, το ηπάτωμα, το μελάνωμα, η

λευχαιμία το καρκίνωμα του παχέος εντέρου και το πλακώδες καρκίνωμα της στοματικής κοιλότητας. Όμως το γεγονός ότι η φαρνεσόλη είναι ασθενής προσδέτης του FXR και ότι η αποπτωτική δράση του εμφανίζεται και σε κύτταρα που δεν εκφράζεται ο FXR, φανερώνει ότι ο από τον FXR διαμεσολαβούμενος μηχανισμός δεν είναι ο κύριος τρόπος εμπλοκής του farnesol στη διαδικασία της απόπτωσης (Joo JH, Jetten AM 2010).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν περιστατικά διηθητικού καρκινώματος μαστού από 115 ασθενείς ηλικίας 32 έως 87 ετών (μέσος όρος 57,6 ετών). Καμία από τις ασθενείς δεν είχε λάβει ακτινοβολία ή χημειοθεραπεία προ-εγχειρητικά. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις αρχές της Επιτροπής Δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής του Παν/μίου Αθηνών και με συγκατάθεση των ασθενών προκειμένου να χρησιμοποιηθούν τα δείγματα και οι κλινικές πληροφορίες για ερευνητικούς σκοπούς (Mylona E et al. 2013).

Αρχικά έγινε παρατήρηση των ιστολογικών τομών χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης και τα περιστατικά ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Tavassoli FA, Devilee P 2003) και χαρακτηρίστηκαν ως διηθητικά πορογενή ή λοβιακά καρκινώματα βάση του συστήματος TNM (Hermanek P, Sabin H 1992). Ο ιστολογικός βαθμός (1,2 ή 3) των διηθητικών πορογενών και λοβιακών καρκινωμάτων προσδιορίστηκε βάση του τροποποιημένου συστήματος Scarff-Bloom- Richardson με οδηγίες Παθολογοανατόμων του Nottingham City Hospital (137). Οι ασθενείς παρακολουθήθηκαν από 8 έως 210 μήνες με μέσο χρόνο επιβίωσης $84,6 \pm 45,0$ μήνες. Η ολική επιβίωση ορίστηκε ως το διάστημα μεταξύ της ημερομηνίας αφαίρεσης του όγκου και της ημερομηνίας και θανάτου οφειλόμενου στον καρκίνο ή την ημερομηνία της τελευταίας εξέτασης της μελέτης. Η επιβίωση ελεύθερης νόσου ορίστηκε ως το διάστημα από την ημερομηνία της επέμβασης μέχρι την ημερομηνία εξέτασης στην οποία διαπιστώθηκε η υποτροπή ή την ημερομηνία της τελευταίας εξέτασης χωρίς διαπίστωση της υποτροπής. Την τελευταία φορά εξέτασης, 21 ασθενείς (18,3%) είχαν πεθάνει από τη νόσο, 11 (9,6%) ήταν εν ζωή με νόσο και 79 (68,7%) ήταν εν ζωή και χωρίς νόσο. Όλες οι ασθενείς έλαβαν μετεγχειρητική θεραπεία ανάλογα με την έκταση της νόσου, συμπεριλαμβανομένων της επικουρικής χημειοθεραπείας, των ακτινοβολιών και της θεραπείας με αντι-οιστρογόνα (Mylona E et al. 2013).

4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 Ανοσοϊστοχημεία

Για την ανοσοϊστοχημεία με το αντίσωμα FXR (H-130, sc13063, Santa Cruz Biochemicals, Santa Cruz, CA, USA) χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης πάχους 4 μm από ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη. Η τεχνική από το στάδιο της αποπαραφίνωσης έως και το στάδιο της αντιχρώσης, έγινε σε αυτόματο μηχάνημα ανοσοϊστοχημείας (Bond, Leica Biosystems) με το σύστημα ανίχνευσης Bond Polymer Refine Detection System. Ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο χρώσης: Αποκάλυψη αντιγονικών θέσεων με διάλυμα ER1 (διάλυμα κίτρικού οξέος pH 6.0) για

20 λεπτά, επώαση με το αντίσωμα FXR (αραίωση 1:75) για 30 λεπτά, επώαση με postprimary reagent για 15 λεπτά και επώαση με το polymer reagent 15 λεπτά. Η μη ειδική χρώση ελέγχθηκε με τη χρήση τομών στις οποίες εφαρμόσθηκε η παραπάνω διαδικασία, αλλά αντί αντισώματος προστέθηκε αντιορός. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τομές ιστού από πάγκρεας, το οποίο εμφανίζει αυξημένη έκφραση FXR. Ως δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα Ki67 (MIB-1, Dakopatts, Glostrup, Denmark)(Giaginis C et al. 2015). Η αξιολόγηση της της ανοσοϊστοχημικής χρώσης ER, PR και HER-2 έγιναν σύμφωνα με τρόπο που περιγράφεται σε προηγούμενες εργασίες (Mylona E et al. 2013).

4.2.2 Εκτίμηση της ανοσοϊστοχημείας

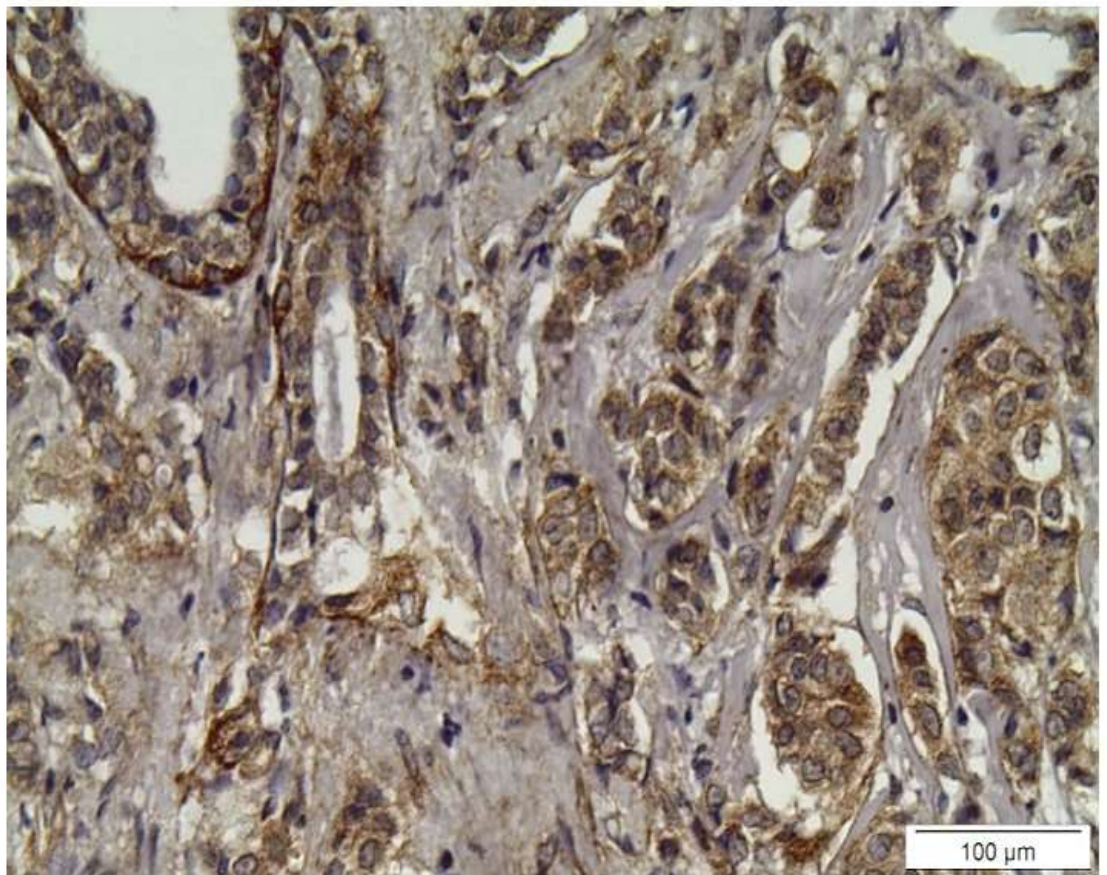
Η εκτίμηση της ανοσοϊστοχημείας έγινε από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές χωρίς να έχουν υπόψη τα κλινικά δεδομένα. Μετρήθηκαν 1000 καρκινικά κύτταρα σε κάθε περιστατικό. Θετικά για τη χρώση FXR θεωρήθηκαν τα περιστατικά στα οποία πάνω από 5% των νεοπλασματικών κυττάρων παρουσίαζαν θετική χρώση για τον δείκτη FXR. Η βαθμολόγηση της χρώσης έγινε ως εξής: 0= χωρίς χρώση- 0-4% των κυττάρων θετικά, 1= 5-24% των κυττάρων θετικά, 2= 25-49% των κυττάρων θετικά, 3=50-100% των κυττάρων θετικά. Με βάση την ένταση της χρώσης 0= αρνητική χρώση, 1= ασθενής χρώση, 2= μετρίως έντονη χρώση, 3= έντονη χρώση. Η χρώση χαρακτηρίσθηκε ως ασθενής όταν το άθροισμα από τους δύο παραπάνω τρόπους βαθμονόμησης ήταν 0 έως 2 και υψηλή, όταν το άθροισμα ήταν ≥ 3 . Κατά αυτό τον τρόπο εξασφαλίσθηκε η ομοιομορφία των περιστατικών μέσα σε κάθε ομάδα κατάταξης, ώστε να είναι συγκρίσιμες οι ομάδες μεταξύ τους (Giaginis C et al. 2015).

Η αξιολόγηση των χρώσης των ER και PR έγινε με βάση τις οδηγίες CAP/ASCO, όπου, ως θετική χαρακτηρίζεται η χρώση όταν τουλάχιστον 1% των κυττάρων εμφάνιζαν θετική χρώση χρησιμοποιώντας εσωτερικό και εξωτερικό μάρτυρα (Hammond ME et al. 2010). Επίσης η χρώση HER-2 βαθμονομήθηκε από 0 έως 3με βάση τις οδηγίες CAP/ASCO (Wolff AC et al. 2013). Η χρώση Ki-67 αξιολογήθηκε ως θετική με βάση το ποσοστό χρώσης (Giaginis C et al. 2015).

4.2.3 Στατιστική ανάλυση

Για τη συσχέτιση της έκφρασης του FXR με τη χρώση των κλινικοπαθολογικών μεταβλητών ER, PR, HER-2 και Ki-67 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χ^2 . Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier συσχετίσθηκαν με τη μέθοδο log rank. Cox χρησιμοποιήθηκε για τη συσχέτιση του πιθανού προγνωστικού δείκτη και της συνολικής επιβίωσης, at multivariate level (πολυπαραγοντικό επίπεδο). Το επίπεδο σημαντικότητας, η τιμή p ήταν μικρότερη από 0.05. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS (SPSS Inc., 2003, Chicago, USA).

Ανοσοϊστοχημική έκφραση του FXR
στον καρκίνο του μαστού



Μεγένθυση X200

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Θετική ανοσοχρώση για τον δείκτη FXR παρουσίασαν τα 91 (79,1%) από τα 115 περιστατικά (βαθμός > 0). 51 (44,3%) από τα 115 είχαν έντονη έκφραση FXR (βαθμός ≥ 3). Σε 35 (38,5%) από αυτά τα θετικά για τον δείκτη FXR η χρώση ήταν κυτταροπλασματική, σε 9 (9,9%) πυρηνική και σε 47 (51,7%) ήταν και πυρηνική και κυτταροπλασματική. Στα 47 (52,8%) από τα 91 περιστατικά η ένταση της χρώσης ήταν ασθενής, ενώ σε 35 (38,5%) και σε 8 (8,8%) ήταν μέτρια έντονη και πολύ έντονη αντίστοιχα. Οι γειτονικές με τον όγκο περιοχές είτε ήταν αρνητικές για τον FXR, είτε είχαν ήπια πυρηνική θετική χρώση. 56 (58,7%) από τα 115 περιστατικά ήταν θετικά για το δείκτη ER, 56 (58,7%) για το δείκτη PR, 12 (10,4%) για το δείκτη HER-2. Από τα 115 περιστατικά, τα 53 (46,1%) χαρακτηρίστηκαν ως αυλικού τύπου A, τα 16 (13,9%) ως αυλικού τύπου B, τα 34 (29,6%) ως τριπλά αρνητικά και τα 12 (10,4%) τύπου HER-2.

Αυξημένη έκφραση του FXR παρατηρήθηκε σε περιστατικά με μικρό μέγεθος όγκου (πίνακας 1, $p=0,0318$). Επίσης, αυξημένη έκφραση του FXR συσχετίστηκε με αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού (πίνακας 1, $p=0,0375$). Χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική, παρατηρήθηκε τάση θετικής συσχέτισης της αυξημένης έκφρασης του FXR με χαμηλό ιστολογικό και πυρηνικό βαθμό (πίνακας 1, $p=0,3141$ και $p=0,4350$ αντίστοιχα) καθώς και της έντονης έκφραση του FXR σε περιστατικά με πρώιμα στάδια της νόσου ($p=0,5657$). Δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση της έκφρασης του FXR με την έκφραση των υπόλοιπων κλινικοπαθολογικών δεικτών (πίν.1), ενώ η έκφραση του FXR δεν διέφερε μεταξύ των διαφορετικών ομάδων μοριακών υποτύπων (πίν.1).

Σύμφωνα με τις καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier, η συνολική επιβίωση και η επιβίωση ελεύθερης νόσου ήταν μεγαλύτερη σε περιστατικά με έντονη έκφραση του FXR (log-rank test, $p=0,0052$ και $p=0,0058$ αντίστοιχα). Στην ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών, ο πυρηνικός βαθμός, το ιστοπαθολογικό στάδιο, η έκφραση του δείκτη Ki-67 και FXR χαρακτηρίστηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες της συνολικής επιβίωσης των ασθενών (πίν. 2 Cox-regression ανάλυση $p=0,0498$, $p=0,0053$, $p=0,0093$, και $p=0,0023$ αντίστοιχα). Επίσης, το ιστοπαθολογικό στάδιο, η έκφραση του δείκτη Ki-67 και FXR χαρακτηρίστηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες της ελεύθερης νόσου επιβίωσης των ασθενών (πίν. 2 Cox-regression ανάλυση $p=0,0018$, $p=0,0437$ και $p=0,0029$ αντίστοιχα).

Πίνακας 1

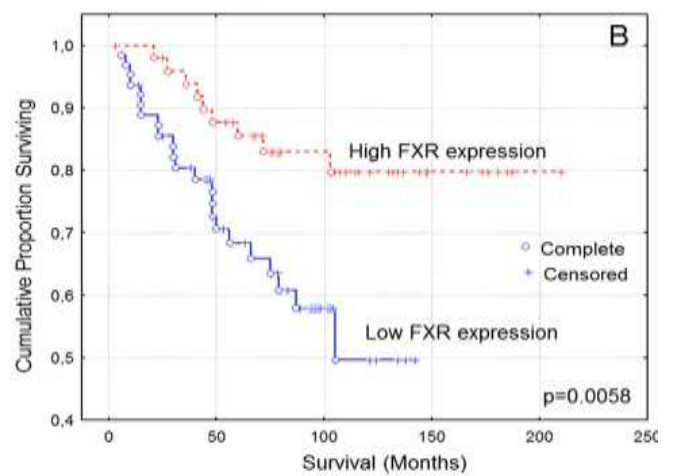
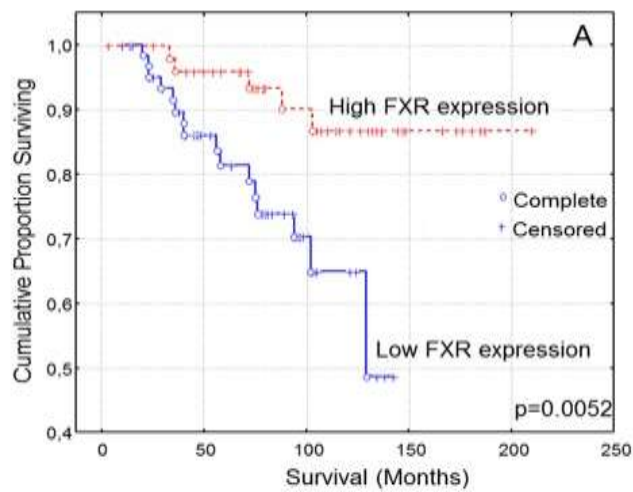
Συσχέτιση της έκφρασης FXR με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους σε 115 ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα μαστού

Κλινικοπαθολογικοί παράμετροι	Έκφραση FXR		
	Χαμηλή (%)	Υψηλή (%)	p
N=115	64(55,7)	51(44,3)	
Ηλικία (Μ.Ο.±SD;έτη			0,9843
≤57,6±12,6 έτη	30(26,1)	24(20,9)	
>57,6±12,6 έτη	34(29,6)	27(23,5)	
Κατάσταση εμμηνόπαυσης			0,8453
Προεμμηνόπαυση	19(16,5)	16(13,9)	
Μετεμμηνόπαυση	45(39,1)	35(30,4)	
Ιστοπαθολογικός τύπος			0,9150
Πορογενές	47(40,9)	37(32,2)	
Λοβιακό	17(14,8)	14(12,2)	
Ιστολογικός βαθμός			0,3141
1	5(4,4)	5(4,4)	
2	30(26,1)	30(26,1)	
3	29(22,2)	16(13,9)	
Πυρηνικός βαθμός κακοήθειας			0,4350
1	26(22,6)	26(22,6)	
2	18(15,7)	14(12,2)	
3	20(17,4)	11(9,6)	
Μοριακός υπότυπος			0,8580
Αυλικού τύπου A	28(24,3)	25(21,7)	
Αυλικού τύπου B	9(7,8)	7(6,1)	
HER-2	8(7,0)	4(3,5)	
Τριπλά αρνητικό	19(16,5)	15(13,0)	
Μέγεθος όγκου			0,0318
pT1	15(13,0)	16(13,9)	
pT2	39(33,9)	34(29,6)	
pT3	10(8,7)	1(0,9)	
Λεμφαδένες			
Μη διηθημένοι	27(23,5)	20(17,4)	
Διηθημένοι	37(32,2)	31(27,0)	
Ιστοπαθολογικό στάδιο			0,7474
I	11(9,6)	12(10,4)	
II	42(36,5)	33(28,7)	
III	11(9,6)	6(5,2)	
Έκφραση ER			0,9505
Θετική	33(28,7)	26(22,6)	
Αρνητική	31(27,0)	25(21,7)	
Έκφραση PR			0,4161
Αρνητική	35(30,4)	24(20,9)	
Θετική	29(25,2)	27(23,5)	

Έκφραση HER-2			0,4170
Θετική	56(48,7)	47(40,9)	
Αρνητική	8(7,0)	4(3,5)	
Δείκτης Ki67			0,0375
Κάτω από τη μέση τιμή	37(32.2)	20(17.4)	
Πάνω από τη μέση τιμή	27(23.5)	31(27)	

Πίνακας 2

Καμπύλη Kaplan-Meier: η συνολική επιβίωση και η επιβίωση ελεύθερης νόσου ήταν μεγαλύτερη σε περιστατικά με έντονη έκφραση του FXR



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα επικεντρώνεται στην εμπλοκή του FXR σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως χολόσταση, μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος, φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, αθηροσκλήρωση, ανάπτυξη βακτηριακού φορτίου στο έντερο και αναγέννηση του ήπατος (Koutsounas I et al. 2015). Επιπλέον, ολοένα και περισσότερες πειραματικές μελέτες καταδεικνύουν το ρόλο του FXR στον καρκινικό μετασχηματισμό των κυττάρων. Ωστόσο η κλινική σημασία της αξιολόγησης της χρώσης του FXR στις κακοήθειες παραμένει περιορισμένη, εξ αιτίας απουσίας συσχέτισης της έκφρασής του με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους (De Gottardi A et al. 2004) και μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν κλινικές μελέτες που να αποδεικνύουν την αξία του FXR ως προγνωστικού δείκτη στον καρκίνο του μαστού.

Σε αυτό το πλαίσιο, η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στην διερεύνηση της σχέσης της έκφρασης του FXR στο διηθητικό καρκίνωμα του μαστού με βασικούς κλινικοπαθολογικούς παράγοντες και την επιβίωση των ασθενών. Βάση των αποτελεσμάτων μας, σχεδόν τα μισά από τα μελετηθέντα περιστατικά παρουσίαζαν αυξημένη έκφραση του FXR και όλα τα περιστατικά εμφάνιζαν αρνητική ή ήπια χρώση του FXR σε μη νεοπλασματικές περιοχές. Η υποκυτταρική κατανομή της χρώσης του FXR στα περισσότερα περιστατικά (89,6%) ήταν κυρίως κυτταροπλασματική. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι στη νεοπλασματική νόσο ο FXR είτε ότι δεν μεταναστεύει στον πυρήνα και παραμένει στο κυτταρόπλασμα, είτε ότι η περίσσειά του συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα στην περίπτωση νεοπλασίας.

Επίσης στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι η αυξημένη έκφραση του FXR παρατηρείται σε όγκους μικρού μεγέθους ενώ η συσχέτιση με το δείκτη πολλαπλασιασμού ήταν θετική. Με μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση η αυξημένη έκφραση του FXR συσχετίστηκε, με μεγαλύτερο διάστημα συνολικής επιβίωσης και μεγαλύτερο διάστημα επιβίωσης ελεύθερης νόσου. Ως εκ τούτου, ο FXR μπορεί να αποτελέσει έναν ισχυρό και ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη της συνολικής και της επιβίωσης ελεύθερης νόσου (Koutsounas I et al. 2015).

Η έκφραση του FXR μελετήθηκε αρχικά σε μία εργασία με 10 περιστατικά καρκίνου του μαστού, όπου παρατηρήθηκε έκφρασή του επιθηλιακά κύτταρα των πόρων φυσιολογικού μαστού, αλλά και στα κύτταρα του διηθητικού πορογενούς αδενοκαρκινώματος. Ενισχυμένη έκφραση του FXR παρατηρήθηκε επίσης σε σειρές καρκινικών κυττάρων MCF-7 (ER θετικά κύτταρα) και MDA-MB-231 (ER αρνητικά κύτταρα) (Swales KE et al. 2006). Μια πιο πρόσφατη μελέτη, με 204 περιστατικά, κατέγραψε σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του FXR με το δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 και τον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων. Στην ίδια μελέτη συσχετίζεται θετικά η έκφραση του FXR με την έκφραση του ER και PR και με τον καρκίνο αυλικού τύπου (Journe F et al. 2009). Αντίθετα, στη δική μας μελέτη

δεν παρατηρήθηκε τέτοια συσχέτιση. Πιθανότα αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι στην παραπάνω μελέτη ελήφθη ως θετική η πυρηνική χρώση μόνο, ενώ στην παρούσα εργασία ελήφθη υπόψη στην ημιποσοτική εκτίμηση τόσο η πυρηνική όσο και η κυτταροπλασματική χρώση. Επιπλέον στην παρούσα μελέτη η πλειονότητα των περιστατικών εμφάνιζε κυτταροπλασματική ή ταυτόχρονα πυρηνική και κυτταροπλασματική χρώση. Φυσικά, αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλεται ακόμα στη χρησιμοποίηση διαφορετικού πρωτογενούς αντισώματος στην ανοσοϊστοχημική μελέτη. Σε μια άλλη ανοσοϊστοχημική μελέτη σε 65 περιστατικά, από την ίδια ερευνητική ομάδα, έδειξε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του FXR και της έκφρασης του ER, Ki67 και της Topo II α (Journe F et al. 2008).

Σε ότι αφορά την έκφραση του FXR σε άλλες νεοπλασίες, έχει παρατηρηθεί αρνητική συσχέτιση της παρουσίας του FXR με την έναρξη και εξέλιξη της νεοπλασίας καθώς επίσης και με την φλεγμονή στην ελκώδη κολίτιδα. Σε ασθενείς με πρωτογενή σκληρυντική χολαγγειίτιδα-ελκώδη κολίτιδα η έκφραση του FXR ήταν ελαττωμένη σε σχέση με ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα (Torres J et al. 2013). Στο ΗΚΚ, η έκφραση του FXR ελαττώνεται και αυτή η ελάττωση σχετίζεται με άλλα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά (Su H et al. 2012). Στον καρκίνο του οισοφάγου επίσης, η υπερέκφραση του FXR σχετίζεται με χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης, μεγαλύτερο μέγεθος όγκου και λεμφαδενική διήθηση (Guan B et al. 2013). Σε μελέτη με αδενοκαρκίνωμα οισοφάγου Barrett, ο FXR ανιχνεύθηκε σε μη δυσπλαστικό ιστό, ενώ η έκφρασή του ελαττωνόταν προοδευτικά από ιστούς με δυσπλασία έως ιστούς με αδενοκαρκίνωμα (Van de Winkel A et al. 2011). Σε επίπεδο mRNA, η παρουσία του ήταν αυξημένη στο φυσιολογικό βλεννογόνο του παχέος εντέρου σε σχέση με την παρουσία του στον βλεννογόνο αδενωμάτων και καρκινωμάτων παχέος εντέρου (De Gottardi A et al. 2004). Σε μια άλλη μελέτη η έκφραση του FXR ήταν ελαττωμένη στον όγκο παχέος εντέρου σε σχέση με την περιοχή γύρω από τον όγκο (Lax S et al. 2012). Η απώλεια της έκφρασης του σχετίζεται με υψηλό βαθμό κακοήθειας στο δεξιό κόλο. Σε μία πρόσφατη ομάδα μελέτης από 55 ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος, ενισχυμένη έκφραση του FXR εμφανιζόταν σε πρωιμότερα στάδια του καρκίνου και διαπιστώθηκε και πάλι η αξία του FXR ως ισχυρού και ανεξάρτητου προγνωστικού δείκτη (Giaginis et al. 2015). Πιθανότατα, οι διαφορές στην έκφραση του FXR σε διάφορα νεοπλάσματα οφείλεται σε διαφορετική δράση-συμμετοχή του υποδοχέα στους συγκεκριμένους ιστούς.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Ο FXR συμμετέχει σε σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου και συχνά σχετίζεται με την παθογένεια αρκετών νόσων όπως χολόσταση, μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος, φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου καρκίνος. Τα γονίδια-στόχοι του FXR μεσολαβούν στη δράση του στη ρύθμιση της σύνθεσης και ομοίωσης των χολικών οξέων, του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπιδίων, στη δημιουργία αθηροσκλήρωσης, στην ανάπτυξη χλωρίδας του εντέρου, στην αναγέννηση του ήπατος.

Στο έντερο, οι ισχυρές ενδείξεις ότι η ελάττωση του FXR μπορεί να συμβάλλει στην καρκινογένση με ταυτόχρονη αύξηση της έκφρασης γονιδίων που επάγουν τον κυτταρικό κύκλο και την φλεγμονή, όπως η Cyclin D1 και IL-6, η ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt, η διήθηση ουδετερόφιλων και η παραγωγή TNFα καθιστούν τον FXR έναν πολλά υποσχόμενο παράγοντα στην αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου (Modica S et al. 2008).

Ηπατοκαρκίνωμα παρατηρήθηκε σε ποντίκια με ελαττωμένα επίπεδα FXR. Τα παρατηρούμενα αυξημένα επίπεδα χολικών οξέων προκάλεσαν αύξηση του IL-1β, έναν διαμεσολαβητή του πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και απόπτωσης, το οποίο προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του β-catenin και c-myc και τελικά οδήγησε στην ογκογένεση (Yang Fet al. 2007). Επιπλέον, ενεργοποίηση του FXR από αγωνιστές του, εμπόδισε την έκφραση παραγόντων φλεγμονής οι οποίοι εμφανίζονται σε απόκριση ενεργοποίησης του NF-κΒ, υποστηρίζοντας τον ογκοκατασταλτικό ρόλο και εν γένει προστατευτικό ρόλο του FXR στο ήπαρ (Wang et al. 2008b).

Αντίθετα, στον οισοφάγο Barrett ο FXR υπερεκφράζεται και χορήγηση του ανταγωνιστή του FXR, guggulsterone, επάγει την απόπτωση σε κυτταρικές σειρές οισοφάγου Barrett, προκαλώντας αύξηση των αντιαποπτωτικών παραγόντων Bcl-x, Bcl-2 και ελάττωση των προαποπτωτικών παραγόντων όπως ο Bax. Επομένως στη συγκεκριμένη νόσο, παρεμπόδιση της δράσης του FXR μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών (Van den Winkel et al.2011).

Η παρούσα εργασία αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι ο FXR μπορεί να αποτελέσει ισχυρό και ανεξάρτητο δείκτη, ευνοϊκό για τη συνολική επιβίωση και την επιβίωση ελεύθερης νόσου στο διηθητικό καρκίνωμα μαστού. Ακόμα η παρούσα εργασία προτείνει ότι η μετατόπιση του FXR από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα ίσως είναι ένα φαινόμενο που αφορά τη μετάβαση από τη φυσιολογική κατάσταση στη νεοπλασία. Σε σειρές καρκινικών κυττάρων από μαστό, αγωνιστές του FXR ελάττωσαν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων της αρωματάσης καθώς επίσης γονιδίων που αφορούν πρωτεΐνες-μεταφορές MDR3, MRP-1, SLC7A5 και παρεμπόδισαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η έκφραση όμως άλλων γονιδίων που επίσης αποτελούν στόχο του FXR όπως το SHP, IBABP και MRP2 αυξήθηκε και ίσως συμπεριληφθούν στο μέλλον στην αντικαρκινική θεραπεία. Σε όγκους θετικούς σε ER, μέσω αυτού ο FXR, προπαντός απουσία οιστρογόνων πυροδοτεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο ενεργοποιητής του FXR, φαρνεσόλη, άσκησε μιτωτική επίδραση στην κυτταρική σειρά MCF-7, ενώ η κυτταρική σειρά MDA-MB-231, η οποία είναι

αρνητική σε ER, έμεινε ανεπηρέαστη, δεδομένα που επίσης ενισχύουν την άποψη, ότι στον καρκίνο του μαστού η μιτωτική ιδιότητα της φαρνεσόλης πραγματοποιείται σε συνεργασία με τον ER (Swales KE et al.2006). Σε όγκους κυττάρων Leydig, ο FXR ανταγωνιζόμενος το ER παρεμποδίζει την αύξηση του όγκου και συμμετέχει επίσης στη ρύθμιση ομοίστασης των ανδρογόνων.

Ιδιαίτερα στο γαστρεντερικό σωλήνα τα χολικά οξέα, θεωρούνται ένας από τους αιτιολογικούς παράγοντες του καρκίνου. Η συνδεόμενη με τα χολικά οξέα καρκινογένεση περιλαμβάνει τη διέγερση των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (NOS), με επακόλουθο την καταστροφή του DNA και πρόκληση μεταλλάξεων που οδηγούν σε απόπτωση. Στο μηχανισμό πιθανότατα να συμμετέχει και ο παράγων AP-1 ένα πρωτοογονίδιο που ενεργοποιείται μέσω του PKC και του ERK. Ο AP-1 ενεργοποιεί το γονίδιο COX-2 που μπορεί να έχει αντιαποπτωτική δράση, προάγει την κινητικότητα και επομένως και την διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Ακόμα ο FXR ελέγχοντας το βακτηριδιακό φορτίο του εντέρου μέσω ενεργοποίησης πληθώρας γονιδίων όπως FoxM1b, που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αναγέννηση του ήπατος. Άρα, ο FXR μπορεί να συμβάλλει στην προστασία εναντίον της καρκινογενετικής δράσης των λιπαρών οξέων.

Ο ρόλος του FXR στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τον καρκίνο είναι υπό μελέτη, αφού τα συμπεράσματα στη βιβλιογραφία τεκμηριώνουν είτε θετική είτε αρνητική συσχέτιση με τον καρκίνο. Ο μηχανισμός συμβολής του στην καρκινογένεση δεν είναι πλήρως κατανοητός. Η αποαμίνη, η οποία αναφέρεται ως αγωνιστής του FXR ασκεί την αποπτωτική δράση με ένα μηχανισμό στον οποίο δεν εμπλέκεται ο FXR. Επίσης, η ενεργοποίησή του από τη φαρνεσόλη που οδηγεί στη απόπτωση μέσω του μονοπατιού της μεβαλονάτης, δεν είναι γενικά αποδεκτό

Επομένως περαιτέρω μελέτη και διερεύνηση απαιτείται προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι κυτταροτοξικές ιδιότητες του FXR προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στην αντικαρκινική θεραπεία (Koutsounas I et al. 2012). Με βάση τα δεδομένα αυτά, θα πρέπει να γίνουν περισσότερες μελέτες με μεγαλύτερες ομάδες ασθενών, προκειμένου να διαπιστωθεί η αξία του FXR ως διαγνωστικού και προγνωστικού δείκτη, καθώς επίσης και η πιθανότητα να συμπεριληφθεί στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί πολύπλοκη και ετερογενή νόσο σε τέτοιο βαθμό ώστε να θεωρείται ότι δεν αποτελεί μία οντότητα, αλλά διαφορετικές, που η κάθε μία παρουσιάζει διαφορετική κλινική εικόνα, ιστοπαθολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά, ανταπόκριση στη θεραπεία, βαθμό κινδύνου υποτροπής και εν γένει διαφορετική βιολογική συμπεριφορά. Παρόλη την ετερογένεια, τα περιστατικά καρκίνου του μαστού εντάσσονται σε ομάδες με βάση ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος του όγκου, το βαθμό διαφοροποίησης, τη μετάσταση στους λεμφαδένες και τη λεμφαγγειακή διήθηση.

Τα τελευταία χρόνια η άποψη σχετικά με την περιπλοκότητα και την ετερογένεια της νόσου και η ανάγκη για εξατομικευμένη θεραπεία ενισχύεται με την εφαρμογή τεχνικών μοριακής βιολογίας υψηλής ανάλυσης, όπου καταγράφεται η παρουσία, η έλλειψη, η αύξηση, η ελάττωση έκφρασης μεγάλου αριθμού γονιδίων σε δείγματα όγκων από καρκίνο του μαστού. Στην καθημέρα πράξη, η αξιολόγηση της ανοσϊστοχημικής έκφρασης των ER, PR, c-erbB-2, Ki67 χρησιμοποιείται για την πρόγνωση, σχεδιασμό θεραπείας και πρόβλεψης της πορείας της νόσου. Ωστόσο, η ανακάλυψη νέων δεικτών, όπως ο FXR, συμβάλλει τόσο στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού της καρκινογένεσης στο μαστό, όσο και στην αξιοποίηση προσδετών του στην εφαρμογή ακριβέστερης και καταλληλότερης για την/τον κάθε ασθενή θεραπεία.

Στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης του FXR σε 150 περιστατικά με διηθητικό καρκίνωμα του μαστού. Η σχέση της έκφρασης του FXR με διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους αποτελεί ισχυρή ένδειξη της δυνατότητας χρήσης του ως ένα ισχυρό και ανεξάρτητο δείκτη, ευνοϊκό για τη συνολική επιβίωση και την επιβίωση ελεύθερης νόσου στο διηθητικό καρκίνωμα του μαστού.

ABSTRACT

Breast cancer constitutes a complicated and heterogenic disease in such a degree so as to be considered as a group of different entities, where each of them characterized by different clinical, histopathological, genetics features as well different therapy response, recurrence risk and biological behavior. Despite the heterogenicity, breast cancer incidences are classified according tumor size, differentiation degree, lymph node metastases and blood and lymphvessels infiltration.

Recent years, the point of view about the complication and the heterogeneity of the disease, and the requirement for personalized therapy is uprated by the application of molecular biology techniques which detect a large number of gene presence, absence, induced or/and reduced expression in breast cancer tumors. Routinely, immunohistochemical expression of ER, PR, c-erbB-2, Ki67 is used for the prediction of the disease and therapy planning. However, the reveal of new molecules like FXR contributes to the deeper unerstanding of carcinogenesis mechanism in breast but also to use FXR ligands in new therapy strategies.

In the present study, the immunohistochemical expression of the FXR in 150 tumors with invasive breast cancer was analysed. The relationship between FXR expression and different histopathological parameters is a strong indication that FXR as predictive marker, favourable for the overall survival of the patient could be used in the future.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ananthanarayanan M, Li S, Balasubramaniyan N, Suchy FJ, Walsh MJ. J Biol Chem. 2004 Dec 24;279(52):54348-57. Ligand-dependent activation of the farnesoid X-receptor directs arginine methylation of histone H3 by CARM1.

Bailey AM, Zhan L, Maru D, Shureiqi I, Pickering CR, Kiriakova G, Izzo J, He N, Wei C, Baladandayuthapani V, Liang H, Kopetz S, Powis G, Guo GL. FXR silencing in human colon cancer by DNA methylation and KRAS signaling. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2014 Jan 1;306(1):G48-58

Bays HE, Goldberg R.B., Truit K.E., Jones M.R.. Colesevelam hydrochloride therapy in patients with type 2 diabetes mellitus treated with metformin: glucose and lipid effects. Arch. Intern. Med. 168 (2008) 1975-1983

Bianchini F, Caderni G, Dolara P, Fantetti L, Kriebel D. Effect of dietary fat, starch and cellulose on fecal bile acids in mice. J Nutr. 1989 Nov;119(11):1617-24

Bruix J, Boix L, Sala M, Llovet JM. Focus on hepatocellular carcinoma, Cancer Cell 5 (2004) 215-219.

Burke YD, Ayoubi AS, Werner SR, McFarland BC, Heilman DK, Ruggeri BA, Crowell. Effects of the isoprenoids perillyl alcohol and farnesol on apoptosis biomarkers in pancreatic cancer chemoprevention. PLAnticancer Res. 2002 Nov-Dec;22(6A):3127-34

Calkin AC, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR Nat Rev Mol Cell Biol. 2012 Mar 14;13(4):213-24.

Capello A, Moons LM, Van de Winkel A, Siersema PD, van Dekken H, Kuipers EJ and Kustres JG. Bile acid-stimulated expression of the farnesoid X receptor enhances the immune response in Barrett esophagus. Am. J. Gastroenterol. 2008 103, 1510-1516.

Cariou B, van Duran-Sandoval H.K., van Dijk T.H., Grefhorts A., Abdelkarim A., Caron S., Torpier G., Fruchart J.C., Gonzales F.J., Kuipers F., Staels B.. The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. J. Biol. Chem. 281 2006 11039-11049

Catalano S, Malivindi R, Giordano C, Gu G, Panza S, Bonofiglio D, Lanzino M, Sisci D, Panno ML, Andò S. Farnesoid X receptor, through the binding with steroidogenic factor 1-responsive element, inhibits aromatase expression in tumor Leydig cells. J Biol Chem. 2010 Feb 19;285(8):5581-93

Chawla A, Repa JJ, Evans R, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: Opening the X-Files. Science 2001, Vol. 294, 1866-1870

Chignard N, Mergey M, Barbu V, Finzi L, Tiret E, Paul A, Housset C. FXR expression is regulated by FXR agonists in the human gallbladder epithelium *Hepatology*. 2005 Sep;42(3):549-57

Chignard N, Poupon R. Targeting farnesoid x receptor in hepatic and biliary inflammatory diseases *Gastroenterology*. 2009 Aug;137(2):734-5

Costarelli V, Sanders TA. Plasma deoxycholic acid concentration is elevated in postmenopausal women with newly diagnosed breast cancer. *Eur J Clin Nutr*. 2002 Sep;56(9):925-7

D'Aldebert E, Biyeyeme Bi Mve MJ, Mergey M, Wendum D, Firrinciel D, Coilly A, Fouassier L, Corpechot C, Poupon R, Housset C, Chignard N. Bile Salts Control the Antimicrobial Peptide Cathelicidin Through Nuclear Receptors in the Human Biliary Epithelium *Gastroenterology* Volume 136, Issue 4, April 2009, Pages 1435–1443

Dawson PA, Hubbert M, Haywood J, Craddock AL, Zerangue N, Christian WV and Ballatori N. The Heteromeric Organic Solute Transporter α - β , Ost α -Ost β , Is an Ileal Basolateral Bile Acid Transporter, *J. Biol. Chem.* 280(2005) 6960-6968

De Gottardi A, Dumonceau JM, Bruttin F, Vonlaufen A, Morard I, Spahr L, Rubbia-Brandt L, Frossard JL, Dinjens WN, Rabinovitch PS and Hadengue A. Expression of the bile acid receptor FXR in Barrett's esophagus and enhancement of apoptosis by guggulesterone in vitro. *MOL. Cancer* 5, 48

De Gottardi A, Tour Fi, Maurer CA, Perez A, Maurhofer O, Ventre M, Bentzen CL, Bentzen EJ, Dufour JF. The Bile Acid Nuclear Receptor FXR and the Bile Acid Binding Protein IBABP Are Differently Expressed in Colon Cancer Digestive Diseases and Sciences June 2004, Volume 49, Issue 6, pp 982-989

De Vree ML, Jacquemin E, Sturm E, Crestei DI, Bosma PJ, Aten J, Deleuze JF, Desrochers Burdelski M, Bernard O, Oude Elferink R, and Hadchouel M. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 6; 95(1): 282–287.

Debruyne PR, Bruyneel EA. The role of bile acids in carcinogenesis. *Mutat. Res.* (2001) 480-481 359-369

Debruyne PR, Bruyneel EA, Karaguni IM, Li X, Flatau G, Müller O, Zimmer A, Gespach C, Mareel MM. Bile acids stimulate invasion and haptotaxis in human colorectal cancer cells through activation of multiple oncogenic signaling pathways. *Oncogene*. 2002 Oct 3;21(44):6740-50.

Degiolamo C, Modica S, Vacca M, Di Tullio G, Morgano A, D'Orazio A, Kannisto K, Parini P, Moschetta A. Prevention of spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice by intestinal-specific farnesoid X receptor reactivation. *Hepatology*. 2015 Jan;61(1):161-70

Deuschle U, Schüler J, Schulz A, Schlüter T, Kinzel O, Abel U, Kremoser C. FXR controls the tumor suppressor NDRG2 and FXR agonists reduce liver tumor growth and metastasis in an orthotopic mouse xenograft model. *PLoS One*. 2012;7(10):e43044

Dieci MV, Orvieto E, Dominici M, Conte P, Guarneri V. Rare breast cancer subtypes: histological, molecular, and clinical peculiarities. *Oncologist*. 2014 19(8), 805-13.

Eheman CR, Shaw KM, Ryerson AB, Miller JW, Ajani UA, White MC. The Changing Incidence of In situ and Invasive Ductal and Lobular Breast Carcinomas: United States, 1999-2004. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 18(6), 1763-9.

Falany CN, Johnson MR, Barnes S, Diasio RB Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *J Biol Chem*. 1994 Jul 29;269(30):19375-19379

Fang C, Dean J, Smith JW. A novel variant of ileal bile acid binding protein is up-regulated through nuclear factor-kappaB activation in colorectal adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2007 Oct 1;67(19):9039-46

Fickert P, Fuchsbichler A, Moustafa T, Wagner M, Zollner G, Halilbasic E, Stoger U, Arrese M, Pizarro M, Solís N, Carrasco G, Caligiuri A, Sombetzki M, Reisinger E, Tsybrovskyy O, Zatloukal K, Denk H, Jaeschke H, Pinzani M, and Trauner M. Farnesoid X Receptor Critically Determines the Fibrotic Response in Mice but Is Expressed to a Low Extent in Human Hepatic Stellate Cells and Periductal Myofibroblasts. *Am. J. Pathol*. 175 (2009) 2392-2405

Fiorucci S, Mencarelli A, Palladino G, Cipriani S. Bile-acid-activated receptors: targeting TGR5 and farnesoid-X-receptor in lipid and glucose disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2009 Nov;30(11):570-580.

Flach J, Antoni I, Villemin P, Bentzen CL, Niesor EJ. The mevalonate/isoprenoid pathway inhibitor apomine (SR-45023A) is antiproliferative and induces apoptosis similar to farnesol. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Apr 2;270(1):240-6

Fonseca VA, Rosenstock J, Wang AC, Truitt KE, Jones MR. Colesvelam HCl improves glycemic control and reduces LDL cholesterol in patients with inadequately controlled type 2 diabetes on sulfonylurea-based therapy. *Diabetes Care* 31 (2008) 1479-1484

Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, Evans RM, Weinberger C. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell*. 1995 Jun 2;81(5):687-693

Fujino T, Une M, Imanaka T, Inoue K, Nishimaki-Mogami T. D. Structure-activity relationship of bile acids and bile acid analogs in regard to FXR activation. *J Lipid Res*. 2004 Jan;45(1):132-8.

Gadaleta RM, Cariello M2, Sabbà C3, Moschetta A Tissue-specific actions of FXR in metabolism and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jan;1851(1)

Gadaleta RM, van Erpecum KJ, Oldenburg B, Willemsen EC, Renooij W, Murzilli S, Klomp LW, Siersema PD, Schipper ME, Danese S, Penna G, Laverny G, Adorini L, Moschetta A, van Mil SW. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Gut* 2011;60:4 463-472

Garg A, Grundy SM. Cholestyramine therapy for dyslipidemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A short term, double-blind, crossover trial. *Ann. Intern. Med.* 121 (1994) 416-422

Ge H., Baribault H., Vonderfecht S., Lemon B., Weismann J., Gardner J., Lee K.J., Gupte j., Mookherjee P., Wang M., Sheng J., Wu X., Li Y.. Characterization of a FGF19 variant with altered receptor specificity revealed a central role for FGFR1c in the regulation of glucose metabolism. *Plos One* 7 (2012) e33603

Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver *J Biol Chem.* 1998 Apr 17;273(16):10046-50

Giaginis C, Koutsounas I, Alexandrou P, Zizi-Serbetzoglou A, Patsouris E, Kouraklis G, Theocharis S: Elevated farnesoid X receptor (FXR) and retinoid X receptors (RXRs) expression is associated with less tumor aggressiveness and favourable prognosis in patients with pancreatic adenocarcinoma. *2015 Neoplasma* 62(2):332-341

Giordano C, Barone I, Vircillo V, Panza S, Malivindi R, Gelsomino L, Pellegrino M, Rago V, Mauro L, Lanzino M, Panno ML, Bonofiglio D, Catalano S, and Andò S. Activated FXR Inhibits Leptin Signaling and Counteracts Tumor-promoting Activities of Cancer-Associated Fibroblasts in Breast Malignancy *Sci Rep.* 2016; 6: 21782

Gnerre C, Blättler S, Kaufmann MR, Looser R, Meyer UA. Regulation of CYP3A4 by the bile acid receptor FXR: evidence for functional binding sites in the CYP3A4 gene. *Pharmacogenetics.* 2004 Oct;14(10):635-45

Goldberg RB, Fonseca VA, Truitt KE, Jones MR. Efficacy and safety of colesevelam in patients with type 2 diabetes mellitus and inadequate glycemic control receiving insulin-based therapy *Arch. Intern. Med.* 168 (2008)1531-1540

Gong YZ, Everett ET, Schwartz DA, Norris JS, Wilson F. Molecular cloning, tissue distribution, and expression of a 14-kDa bile acid-binding protein from rat ileal cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 May 24;91(11):4741-5

Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell.* 2000 Sep;6(3):517-526

Guan B, Li H, Yang Z, Hoque A, Xu X. Inhibition of farnesoid X receptor controls esophageal cancer cell growth in vitro and in nude mouse xenografts. *Cancer* 2013; 119:1321-1329

- Guyton A. Φυσιολογία του Ανθρώπου. (1990)3^η έκδοση, Εκδόσεις Λίτσας
- Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M. et al. American Society of ClinicalOncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2010 28;2786-2795
- Hermanek P, Sabin H eds. TNM Classification of international union against cancer. In TNM atlas, 3rd rev, 4th edn. Berlin: Springer-Verlag, 1992; 15-25
- Hill MJ, Melville DM, Lennard-Jones JE, Neale K, Ritchie JK. Faecal bile acids, dysplasia, and carcinoma in ulcerative colitis. *Lancet.* 1987 Jul 25;2(8552):185-6
- Howard WR, Pospisil JA, Njolito E, Noonan DJ. Catabolites of cholesterol synthesis pathways and forskolin as activators of the farnesoid X-activated nuclear receptor. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000 Mar 1;163(2):195-202
- Huang L, Zhao A, Lew JL, Zhang T, Hrywna Y, Thompson JR, de Pedro N, Royo I, Blevins RA, Peláez F, Wright SD, Cui JFarnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3 *J Biol Chem.* 2003 Dec 19;278(51):51085-90. Epub 2003 Oct 2
- Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, Luo G, Jones SA, Goodwin B, Richardson JA, Gerard RD, Repa JJ, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis *Cell Metab.* 2005 Oct;2(4):217-25
- Jacques Grober, Isabelle Zaghini, Hiroshi Fujii, Stacey A. Jones Steven A. Kliewer , Timothy M. Willson, Teruo Ono and Philippe Besnard , *J.Biol. Chem.* 274 (1999) 29749-29754.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61(2):69-90
- Jiang Y, Iakova P, Jin J, Sullivan E, Sharin V, Hong IH, Anakk S, Mayor A, Darlington G, Finegold M, Moore D, Timchenko NA. Farnesoid X receptor inhibits gankyrin in mouse livers and prevents development of liver cancer. *Hepatology.* 2013 Mar;57(3):1098-106
- Joo JH, Jetten AM. Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 2010 Jan 28;287(2):123-35
- Journe F, Chaboteaux C, Nonclercq D ,Durbecq V, Larsimont D., Body J.J. Farnesol , a mevalonate pathway intermediate, stimulates MCF-7 breast cancer cellgrowth through farnesoid-X-receptor mediated estrogen receptor activation. 2008 *Breast Cancer Res. Treat.* 107, 49-61
- Journe F, Durbecq V, Chaboteaux C, Rouas G, Laurent G, Nonclercq D, Sotiriou C, Body JJ, Larsimont D. Association between farnesoid X receptor expression and cell proliferation in estrogen receptor-positive luminal-like breast cancer from postmenopausal patients. 2009 *Breast Cancer Res. Treat.* 115, 523-535

Kaeding J, Bouchaert E, Bélanger J, Caron P, Chouinard S, Verreault M, Larouche O, Pelletier G, Staels B, Bélanger A, Barbier O. Activators of the farnesoid X receptor negatively regulate androgen glucuronidation in human prostate cancer LNCAP cells. *Biochem J.* 2008 Mar 1;410(2):245-53

Karsa LV, Lignini TA, Patnick J, Lambert R, Sauvaget C. The dimensions of the CRC problem. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010 Aug;24(4):381-96

Kim I, Ahn SH, Inagaki T, Choi M, Ito S, Guo GL, Kliewer SA, Gonzalez FJ. Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine *J Lipid Res.* 2007 Dec;48(12):2664-72

Kim I, Morimura K, Shah Y, Yang Q, Ward JM, Gonzalles FJ. Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis* 28(2007)940-946

Kim Y-J, Yoon SY, Jong-Tae Kim J-T, Song EY, Lee HG, Son HJ, Kim SY, Cho D, Choi I, Kim JH and Kim JW. NDRG2 expression decreases with tumor stages and regulates TCF/b-catenin signaling in human colon carcinoma. *Carcinogenesis* vol.30 (2009) no.4 pp.598–605

Kjøller L and Hall A. Rac Mediates Cytoskeletal Rearrangements and Increased Cell Motility Induced by Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Binding to Vitronectin *J Cell Biol.* 2001 Mar 19; 152(6): 1145–1158

Kounalakis N, Lau S, Darling D, Smith d, Palomares M and Lai L. The nuclear receptor FXR links metabolism with breast cancer. *Cancer Res.* 2009 69 (24 Suppl), Abstract nr 5153

Koutsounas I, Giaginis C, Theocharis S. Farnesoid X Receptor (FXR) from normal to malignant state. *Histol Histopathol.* 2012 Jul;27(7):835-53.

Koutsounas I, Theocharis S, Delladetsima I, Patsouris E, Giaginis C.: Farnesoid X receptor in human metabolism and disease: the interplay between gene polymorphisms, clinical phenotypes and disease susceptibility. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2015 Apr;11(4):523-532

Krishnamurthy K, Wang G, Rokhfeld D, Bieberich E. Deoxycholate promotes survival of breast cancer cells by reducing the level of pro-apoptotic ceramide. *Breast Cancer Res.* 2008;10(6):R106

Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, Dickson AS, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Rosenblatt KP, Kliewer SA, Kuro-o M. Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J. Biol. Chem.* 282 2007, 26687-26695.

Landrier JF, Eloranta JJ, Vavricka SR, Kullak-Ublick GA. The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter- α and - β genes *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 10 February 2006 Vol. 290 no. 3, G476-G485

Lax S, Schauer G, Prein K, Kapitan M, Silbert D et al. Expression of the nuclear bile acid receptor/farnesoid X receptor is reduced in human colon carcinoma compared to nonneoplastic mucosa independent from site and may be associated with adverse prognosis. *Int. J. Cancer* 2012 130:2232:2239

Leal C, Henrique R, Monteiro P, Lopes C, Bento MJ, De Sousa CP, Lopes P, Olson S, Silva MD, Page DL. Apocrine ductal carcinoma in situ of the breast: histologic classification and expression of biologic markers. *Hum Pathol.* 2001 32(5), 487-93.

Lee JY, Lee KT, Lee JK, Lee KH, Jang KT, Heo JS, Choi SH, Kim Y, Rhee JC. Farnesoid X receptor, overexpressed in pancreatic cancer with lymph node metastasis promotes cell migration and invasion. *Br J Cancer.* 2011 Mar 15;104(6):1027-37

Lee FY, Lee H, Hubbert ML, Edwards PA, Yangiao Z. FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem. Sci* 2006; 31:572:580

Lee YK, Moore DD Liver receptor homolog-1, an emerging metabolic modulator. *Front Biosci.* 2008 May 1;13:5950-5958

Lewis KD, Thompson JA, Weber JS, Robinson WA, O'Day S, Lutzky J, Legha SS, Floret S, Ruvuna F, Gonzalez R. A phase II open-label trial of apomine (SR-45023A) in patients with refractory melanoma. *Invest New Drugs.* 2006 Jan;24(1):89-94

Li T, Owsley E, Matozel M, Hsu P, Novak CM, Chiang JY. Transgenic expression of cholesterol 7 α -hydroxylase in the liver prevents high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Hepatology.* 2010 Aug;52(2):678-90

Lorentzen A, Vogel LK, Lewinsky RH, Saebø M, Skjelbred CF, Godiksen S, Hoff G, Tveit KM, Lothe IM, Ikdahl T, Kure EH, Mitchelmore C. Expression of NDRG2 is down-regulated in high-risk adenomas and colorectal carcinoma. *BMC Cancer.* 2007 Oct 12;7:192.

Love MW, Dawson PA New insights into bile acid transport *Curr Opin Lipidol.* 1998 Jun;9(3):225-9

Lowe LC, Senaratne SG, Colston KW. Induction of apoptosis in breast cancer cells by apomine is mediated by caspase and p38 mitogen activated protein kinase activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Apr 8;329(2):772-9

Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, David J, Mangelsdorf DJ. Molecular Basis for Feedback Regulation of Bile Acid Synthesis by Nuclear Receptor. *Molecular Cell* Volume 6, Issue 3, September 2000, Pages 507–515

Ma K, Saha P.K, Chan L, Moore DD. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 116 2006, 1102-1109

Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science.* 1999 May 21;284(5418):1362-1365

Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol*. 2015 21(8), 23-81.

Maloney PR, Parks DJ, Haffner CD, Fivush AM, Chandra G, Plunket KD, Creech KL, Moore LB, Wilson JG, Lewis MC, Jones SA, Willson TM. Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J Med Chem*. 2000 Aug 10;43(16):2971-2974

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83 (1995) 835-839

Maran RR, Thomas A, Roth M, Sheng Z, Esterly N, Pinson D, Gao X, Zhang Y, Ganapathy V, Gonzalez FJ, Guo GL. Farnesoid X receptor deficiency in mice leads to increased intestinal epithelial cell proliferation and tumor development. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 Feb;328(2):469-77

Mariette C, Perrais M, Leteurte E, Jonckheere N, Hermon B, Pigny P, Batra S, Aubert JP and Van Seuning I. Transcriptional regulation of human mucin MUC4 by bile acids in oesophageal cancer cells is promoter-dependent and involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. 2004 *Biochem. J*. 377: 701-708

Modica S, Murzilli S, Salvatore L, Schmidt DR, Moschetta A. Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis. *Cancer Res*. 2008 Dec 1;68(23):9589-94

Modica S, Petruzzelli M, Bellafante E, Murzilli S, Salvatore L, Celli N, Di TG, Palasciano G, Moustafa T, Halibasic E, Trauner M, Moschetta A. Selective activation of nuclear bile acid receptor FXR in the intestine protects mice against cholestasis. *Gastroenterology* 142 (2012) 355-365

Moschetta A, Van Berge GP, Portincasa P, Palasciano G, van Erpecum KJ. Cholesterol crystallization in model bile: effects of bile salt and phospholipid species composition. *J Lipid Res*. 2001 Aug;42(8):1273-1278

Mudaliar S, Henry RR, Sanyal AJ, Morrow L, Marschall HU, Kipnes M, Adorini L, Sciacca CI, Clopton P, Castelloe E, Dillon P, Pruzanski M, Shapiro D. Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2013 Sep;145(3):574-582

Mylona E, Vamvakaris I, Giannopoulou I et al. An immunohistochemical evaluation of the proteins Wnt1 and glycogen synthase kinase (GSK)-3 β in invasive breast carcinomas. (2013) *Histopathology*; 62:8 990-907

Niesor EJ, Flach J, Lopes-Antoni I, Perez A, Bentzen CL. The nuclear receptors FXR and LXR α : potential targets for the development of drugs affecting lipid metabolism and neoplastic diseases. *Curr Pharm Des*. 2001 Mar;7(4):231-59

Pang JM, Gorringer KL, Fox SB. Ductal carcinoma in situ - update on risk assessment and management. *Histopathology* 2016 68(1), 69-109.

Park YY, Choi HS, Lee JS Systems-level analysis of gene expression data revealed NROB2/SHP as potential tumor suppressor in human liver cancer .Mol Cells. 2010 Nov;30(5):485-91.

Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. Science. 1999 May 21;284(5418):1365-8

Peng Z, Raufman JP, Xie G. Src-mediated cross-talk between farnesoid X and epidermal growth factor receptors inhibits human intestinal cell proliferation and tumorigenesis. PLoS One. 2012;7(10):e48461

Peterlik M. Role of bile acid secretion in human colorectal cancer. Wien Med Wochenschr. 2008;158(19-20):539-41

Piepoli A, Cotugno R, Merla G, Gentile A, Augello B, Quitadamo M, Merla A, Panza A, Carella M, Maglietta R, D'Addabbo A, Ancona N, Fusilli S, Perri F. and Andriulli A. Promoter methylation correlates with reduced NDRG2 expression in advanced colon tumour. BMC Medical Genomics 2 2009, 2:11

Pircher PC, Kitto JL, Petrowski ML, Tangirala RK, Bischoff ED, Schulman IG, Westin SK. Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. J Biol Chem. 2003 Jul 25;278(30):27703-11.

Potthoff MJ, Boney-Montoya J, Choi M, He T, Sunny NE, Satapati S, Suino-Powell K, Xu HE, Gerard RD, Finck BN, Burgess SC, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. FGF15/19 regulates hepatic glucose metabolism by inhibiting the CREB-PGC-1 alpha pathway. Cell Metab. 13 (2011), 729-738

Rabbani SA, Xing RH. Role of urokinase (uPA) and its receptor (uPAR) in invasion and metastasis of hormone-dependent malignancies. Int J Oncol. 1998 Apr;12(4):911-20

Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2009 Dec;6(12):699-708

Rao A , Haywood J, Craddock AL , Belinsky MG , Kruh GD, and Dawson PA. The organic solute transporter α - β , Ost α -Ost β , is essential for intestinal bile acid transport and homeostasis, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.105(2008) 3891-3895

Reddy BS, Hedges AR, Laakso K, Wynder EL. Metabolic epidemiology of large bowel cancer: fecal bulk and constituents of high-risk North American and low-risk Finnish population. Cancer. 1978 Dec;42(6):2832-8.

Robins P., Pinder S., de Klerk N.: Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement (1995) Hum. Pathol. 6; 873-879

Rosenson RS, Abby SL, Jones MR. Colesvelam HCl effects on atherogenic lipoprotein subclasses in subjects with type 2 diabetes. Atherosclerosis 204 (2009) 342-344

Rosenstock J., Fonseca VA, Gaevey WT, Goldberg RB, Handelsman Y, Abby SL, Lai YL, Jin X, Misir M, Nagendran S, Jones MR. Initial combination therapy with metformin and colesevelam for achievement of glycemic and lipid goals in early type 2 diabetes. *Endocr. Pract.* 16 (2010) 629-640

Schwartz SL, Lai YL, Xu J, Misir M, Jones MR, Nagendran S. The effect of colesevelam hydrochloride on insulin sensitivity and secretion in patients with type 2 diabetes: a pilot study. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 8 (2010) 179-188

Seol W, Choi HS, Moore DD. Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors *Mol Endocrinol.* 1995 Jan;9(1):72-85

Shang Q., Saumoy m., Holst J.J., Salen G., Xu G.. Colesevelam improves insulin resistance in a diet-induced obesity (F-DIO) rat model by increasing the release GLP-1, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298(2010) G419-G424

Shi H, Li N, Li S, Chem C, Wang W, Xu C, Zhang J, Jin H, Zhang H, Zhao H, Song W., Feng Q., Feng X., Shen X., Yao L., Zhao Q. Expression of NDRG2 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 101(2010) 1292-1299

Silva J1, Dasgupta S, Wang G, Krishnamurthy K, Ritter E, Bieberich E. Lipids isolated from bone induce the migration of human breast cancer cells. *J Lipid Res.* 2006 Apr;47(4):724-33. Epub 2006 Jan 26

Sinn H.P. and Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *2013 Breast Care*, 8(2), 149-154.

Slattery ML, Diet, lifestyle and colon cancer. *Semin. Gastrointest. Dis.* 11(2000)142-146

Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt NM, van Roon MA, et al. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease *Cell.* 1993 Nov 5;75(3):451-62

Smith DL, Keshavan P, Avissar U, Ahmed K, Zucker SD. Sodium taurocholate inhibits intestinal adenoma formation in APCMin/+ mice, potentially through activation of the farnesoid X receptor. *Carcinogenesis.* 2010 Jun;31(6):1100-9

Solaas K, Ulvestad A, Söreide O, Kase BF Subcellular organization of bile acid amidation in human liver: a key issue in regulating the biosynthesis of bile salts. *J Lipid Res.* 2000 Jul;41(7):1154-1162

Song CS, Echchgadda I, Baek BS, Ahn SC, Oh T, Roy AK, Chatterjee B. Dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene induction by bile acid activated farnesoid X receptor *J Biol Chem.* 2001 Nov 9;276(45):42549-56. Epub 2001 Aug 30

Song SP, Zhang SB, Liu R, Yao L, Hao YQ, Liao MM, Zhang YD, Li ZH. NDRG2 down-regulation and CD24 up-regulation promote tumor aggravation and poor survival in patients with gallbladder carcinoma *Medical Oncology* September 2012, Volume 29, Issue 3, pp 1879–1885

Staels B, Kuipers F. Bile acid sequestrants and the treatment of type diabetes mellitus. *Drugs* 67 (2007) 1383-1392

Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Németh A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM, Thompson RJA gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet.* 1998 Nov;20(3):233-8

Su H, Ma C, Liu J, Li N, Gao M et al. Downregulation of nuclear receptor FXR is associated with multiple malignant clinicopathological characteristics in human hepatocellular carcinoma. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 2012; 303: G1245-1253

Suzanne D. Conzen Tatyana A. Grushko Olufunmilayo I. Olopade. (2008). *Cancer of the Breast*. Στο DeVita, Hellman, & Rosenberg, *Cancer: Principles & Practice of Oncology* (Τόμ. 2, σσ. 1595-1604). Philadelphia, PA, USA: Lippincott W. & Wilkins.

Swales KE, Korbonits M, Carpenter R, Walsh DT, Warner TD, Bishop-Bailey D. The farnesoid X receptor is expressed in breast cancer and regulates apoptosis and aromatase expression. (2006) *Cancer Res.* 66, 10120-10126

Tavassoli FA, Devilee P eds. : *Pathology and genetics: tumors of the breast and female genital organs*. IARC WHO Classification of Tumors, no. 4. Lyon: WHO Press, 2003; 25-27

Tepel M, Roerig P, Wolter M, Gutmann DH, Perry A, Reifenberger G, Riemenschneider MJ. Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of the NDRG2 gene at 14q11.2 in primary glioblastoma. *Int J Cancer.* 2008 Nov 1;123(9):2080-6

Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Aug;7(8):678-693.

Timothy T. Lu, Joyce J. Repa, and David J. Mangelsdorf. Orphan Nuclear Receptors as eLiXIRs and FiXeRs of Sterol Metabolism *J. Biol. Chem.* 276(2001)37735-37738

Tineke Kok, Christian V. Hulzebos, Henk Wolters, Rick Havinga, Luis B. Agellon, Frans Stellaard, Bei Shan, Margrit Schwarz, and Folkert Kuipers Enterohepatic. Circulation of Bile Salts in Farnesoid X Receptor-deficient Mice: efficient intestinal bile salt absorption in the absence of ileal bile acid-binding protein, *J. Biol. Chem.* 278(2003) 41930-41937

Tochtrop GP, DeKoster GT, Covey DF, Cistola DPA single hydroxyl group governs ligand site selectivity in human ileal bile acid binding protein *J Am Chem Soc.* 2004 Sep 8;126(35):11024-9

Toke O, Monsey JD, DeKoster GT, Tochtrop GP, Tang C, Cistola DP. Determinants of cooperativity and site selectivity in human ileal bile acid binding protein. *Biochemistry*. 2006 Jan 24;45(3):727-37

Torres J, Bao X, Iuga AC, Chen A, Harpaz N. et al. : Farnesoid X receptor expression is decreased in colonic mucosa of patients with primary sclerosing cholangitis and colitis-associated neoplasia. *2013 Inflamm Bowel Dis*. 19:275-282

Ullman TA, Itzkowitz SH. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1807-16

Van de Winkel A, Van Zoest KP, Van Dekken H, Moons LM, Kuipers EJ et al: Differential expression of the nuclear receptors farnesoid X receptor (FXR) and pregnane (PXR) for grading dysplasia in patients with Barrett's oesophagus. 2011; 58: 246-253

Verreault M, Kaeding J, Caron P, Trottier J, Grosse L, Houssin E, Pâquet S, Perreault M, Barbier O. Regulation of endobiotics glucuronidation by ligand-activated transcription factors: physiological function and therapeutic potential. *Drug Metab Rev*. 2010 Feb;42(1):110-22

Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. *Mol Cell*. 1999 May;3(5):543-53
Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. Wang H1, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. *Mol Cell*. 1999 May;3(5):543-53

Wang R, Salem M, Yousef IM, Tuchweber B, Lam P, Childs SJ, Helgason CD, Ackerley C, Phillips MJ, Ling V. Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 13;98(4):2011-6.

Watanabe M, Horai Y, Houten SM, Morimoto K, Sugizaki T, Arita E, Mataka C, Sato H, Tanigawara Y, Schoonjans K, Itoh H, Auwerx J. Lowering bile acid pool size with farnesoid X receptor (FXR) agonist induces obesity and diabetes through reduced energy expenditure. *J Biol Chem*. 286(2011) 26913-26920

Wiseman DA, Werner SR, Crowell PL. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21(Cip1) and p27(Kip1) in human pancreatic adenocarcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Mar;320(3):1163-70. Epub 2006 Nov 30

Wolfe A, Thomas A, Edwards G, Jaseja R, Guo GL, Apte U. Increased activation of the Wnt/beta-catenin pathway in spontaneous hepatocellular carcinoma observed in farnesoid X receptor knock out mice. *J Pharmacol. Exp. Ther*. 338(2011) 12-21

Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin. Oncol*. 2013; 31:3997-4013

Wong MH, Oelkers P, Dawson PA. Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *J Biol Chem.* 1995 Nov 10;270(45):27228-34

Xu Y, Watanabe T, Tanigawa T, Machida H, Okazaki H, Yamagami H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, and Arakawa T. Bile Acids Induce Cdx2 Expression Through the Farnesoid X Receptor in Gastric Epithelial Cells. *Clin Biochem Nutr.* 2010 Jan; 46(1): 81–86

Yang F, Huang X, Yi T, Yen Y, Moore DD, Huang W. Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res.* 67 (2007)863-867

Yoon JH, Higuchi H, Werneburg NW, Kaufmann SH, Gores GJ. Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line. *Gastroenterology* April 2002 Volume 122, Issue 4, Pages 985–993

Zhang M and Chiang JYL. Transcriptional Regulation of the Human Sterol 12 α -Hydroxylase Gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4 α in mediating bile acid repression. *J. Biol.Chem.*276(2001) 41690-41699

Zhang L, Huang X, Meng B, Dong B, Shiah S, Moore DD, Huang W.. Significance and mechanism of CYPa1 gene regulation during the acute phase of liver regeneration, *Mol. Endocrinol.* 23(2009) 137-145

Zhang Y, Kast-Woelbern HR and Edwards PA. Natural Structural Variants of the Nuclear Receptor Farnesoid X Receptor Affect Transcriptional Activation. *J. Biol. Chem.* 278(2003) 104-110

Zhang Y, Xu P, Park K, Choi Y, Moore DD, Wang L. Orphan receptor small heterodimer partner suppresses tumorigenesis by modulating cyclin D1 expression and cellular proliferation *Hepatology.* 2008 Jul;48(1):289-98

Zhang Y., Lee F.Y., Baretta G., Lee H., Vales C., Gonzales F.J., Wilson P.A., Edwards PA. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.* 103 2006 1006-1011

Zieve FJ, Kalin MF, Schwartz SL, Jones ML, Bailey WL. Results of the glucose-lowering effects of colestevlam hydrochloride on glycemic control in subjects with type 2 diabetes. *Clin. Ther.* 29(2007) 74-83

Zimber A, Chedeville A, Abita JP, Barbu V, Gespach C. Functional interactions between bile acids, all-trans retinoic acid, and 1,25-dihydroxy-vitamin D3 on monocytic differentiation and myeloblastin gene down-regulation in HL60 and THP-1 human leukemia cells. *Cancer Res.* 2000 Feb 1;60(3):672-8.

Zimber A, Chedeville A, Gespach C, Abita JP. Inhibition of proliferation and induction of monocytic differentiation on HL60 human promyelocytic leukemia cells treated with bile acids in vitro. *Int J Cancer.* 1994 Oct 1;59(1):71-7

Zimber A, Gespach C. Bile acids and derivatives, their nuclear receptors FXR, PXR and ligands: role in health and disease and their therapeutic potential. *Anticancer Agents Med Chem.* 2008 Jun;8(5):540-63