



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



*“Μελέτη της βιολογικής συμπεριφοράς
των κασπασών σε κύτταρα
ηπατοκυτταρικού καρκινώματος”*

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΝΙΚΟΛΑΟΥ Ι. ΤΣΑΓΚΑΡΑΚΗ

ΙΑΤΡΟΥ

ΕΙΔΙΚΟΥ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ηλίας Α. Κουρούμαλης
Καθηγητής Παθολογίας-Γαστρεντερολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
Επιβλέπων Καθηγητής

Γεώργιος Κολιός
Αναπλ. Καθηγητής Φαρμακολογίας Πανεπιστημίου Θράκης

Κωνσταντίνος Παπαδάκης
Αναπλ. Καθηγητής Γαστρεντερολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ηλίας Α. Κουρούμαλης
Καθηγητής Παθολογίας-Γαστρεντερολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Κολιός
Αναπλ. Καθηγητής Φαρμακολογίας Πανεπιστημίου Θράκης

Κωνσταντίνος Παπαδάκης
Αναπλ. Καθηγητής Γαστρεντερολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Κυριακή Θερμού
Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Ελένη Παπαδάκη
Καθηγήτρια Αιματολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Ιωάννης Μουζάς
Αναπλ. Καθηγητής Γαστρεντερολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Ιωάννης Κουτρομπάκης
Επίκουρος Καθηγητής Γαστρεντερολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

*Στην κόρη μου,
Χριστίνα Τσαγκαράκη*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εστιάζεται στη βιολογική συμπεριφορά των κασπασών, σε HepG2 κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της βιολογικής συμπεριφοράς των κασπασών στα συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα, ύστερα από επίδραση οκτρεοτίδης και ουρσοδεσοξυχολικού οξέος, δύο φαρμακευτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ποικιλίας γαστρεντερολογικών, και όχι μόνο, παθήσεων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η οκτρεοτίδη επάγει απόπτωση στα HepG2 κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος μέσω ενός κασπασο-μεσολαβούμενου αποπτωτικού μονοπατιού, αλλά και ότι η ενεργοποίηση των κασπασών και η επαγωγή απόπτωσης, μετά από επίδραση UDCA σε HepG2 κύτταρα, είναι δόσο-εξαρτώμενη.

Τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχουν δημοσιευθεί ως πρωτότυπες εργασίες στον διεθνή ιατρικό τύπο, ως ακολούθως:

1. Tsagarakis NJ, Drygiannakis I, Batistakis AG, Kolios G, Kouroumalis EA. A concentration-dependent effect of ursodeoxycholate on apoptosis and caspases activities of HepG2 hepatocellular carcinoma cells. **Eur J Pharmacol**. 2010 Aug 25;640(1-3):1-7.
2. Tsagarakis NJ, Drygiannakis I, Batistakis AG, Kolios G, Kouroumalis EA. Octreotide induces caspase activation and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. **World J Gastroenterol**. 2010 (in press)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα πρωταρχικά να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή της παρούσας μελέτης, κύριο Ηλία Κουρούμαλη, Καθηγητή Γαστρεντερολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, για την ανεκτίμητη βοήθειά του σε όλα τα στάδια της, καθώς και για την στήριξή του καθόλη τη διάρκεια της έως και σήμερα επιστημονικής μου πορείας. Ο Καθηγητής κύριος Κουρούμαλης αποτελεί πρότυπο επιστήμονα, με εξαιρετική καριέρα και παγκόσμια καταξίωση, καθώς και με ανεκτίμητη προσφορά στην κοινωνία της Κρήτης. Αποτελεί για μένα παράδειγμα προς μίμηση και αισθάνομαι υπερήφανος που συγκαταλέγομαι ανάμεσα στους μαθητές του.

Ευχαριστώ, επίσης, τον νυν Αναπληρωτή Καθηγητή Κλινικής Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θράκης και πρώην Επίκουρο Καθηγητή Γαστρεντερολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, κύριο Γεώργιο Κολιό, για την υπομονετική εκπαίδευση που μου παρείχε στον χώρο του εργαστηρίου, για την ανεκτίμητη διδασκαλία του όσον αφορά την αξία της τάξης, της οργάνωσης και της ιεράρχησης προτεραιοτήτων στην επιστημονική εργασία, καθώς και για την αμέριστη συμπαράσταση και καθοδήγησή του έως και την ολοκλήρωση της μελέτης.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους και συνεργάτες μου, Αντώνιο Μπατιστάκη και Ιωάννη Δρυγιαννάκη, για την πολύτιμη θεωρητική, αλλά και πρακτική, βοήθειά τους, ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα μελέτη, καθώς και τους γονείς μου, για την ψυχολογική στήριξη που μου παρείχαν ώστε να φέρω εις πέρας την παρούσα μελέτη.

Πίνακας περιεχομένων

1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
1.1 Απόπτωση	9
1.2 Κυτταρικός κύκλος και απόπτωση	14
1.3 Οι φάσεις της απόπτωσης	16
1.4 Μονοπάτια απόπτωσης	19
1.5 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην απόπτωση	20
1.6 Απόπτωση πυροδοτούμενη από ενδοκυττάρια σήματα	22
1.7 Ο ρόλος του BCL-2	27
1.8 Απόπτωση πυροδοτούμενη από εξωκυττάρια σήματα	32
1.9 Ρύθμιση της απόπτωσης μέσω μεταγραφικών παρεμβάσεων	38
1.10 Απόπτωση και καρκίνος	39
1.11 Απόπτωση και κασπάσες	40
1.12 Δομή κασπασών	42
1.13 Φυλογενετικές σχέσεις κασπασών	44
1.14 Μηχανισμοί ενεργοποίησης των κασπασών	48
1.15 Ανασταλτική ρύθμιση των κασπασών	58
1.16 Κασπάσες και καρκίνος	59
1.17 Οι κασπάσες ως στόχοι φαρμακευτικής θεραπείας	59
1.18 Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και απόπτωση	62
1.19 Ηπατική φλεγμονή και αντοχή στην απόπτωση	68
1.20 TNF-alpha και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ)	69
1.21 ΗΚΚ και φαρμακευτική προσέγγιση, σχετιζόμενη με την απόπτωση	70
1.22 Σωματοστατίνη (somatostatin ή SST).....	71
1.23 ΗΚΚ και σωματοστατίνη	75
1.24 Κλινικά μαθήματα από τη χρήση αναλόγων σωματοστατίνης στο ΗΚΚ	76
1.25 Πιθανοί μηχανισμοί δράσης των αναλόγων σωματοστατίνης στο ΗΚΚ	78
1.26 Έμμεση αντιπολλαπλασιαστική δράση	80
1.27 Άμεση αντιπολλαπλασιαστική δράση	84
1.28 Σωματοστατίνη και απόπτωση	87
1.29 Υποδοχείς σωματοστατίνης στο ΗΚΚ	90
1.30 Ουρσοδεσοξυχολικό οξύ (Ursodeoxycholic acid ή UDCA).....	94
1.31 UDCA και θεραπεία PBC	96
1.32 Μηχανισμοί δράσης UDCA	99
1.33 UDCA και απόπτωση	101
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	114
2.1 Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	115
2.2 Υλικά	117
2.3 Μεθοδολογία	119
2.3.1 Κυτταροκαλλιέργειες	119
2.3.2 Μελέτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού	120
2.3.3 Ανίχνευση απόπτωσης	121
2.3.3.1 DNA κατάτμηση (fragmentation)	121

2.3.3.2 Κυτταρομετρία ροής (διπλή χρώση Annexin-V/PI)	123
2.3.4 Δραστικότητα κασπασών.....	126
2.4 Στατιστική ανάλυση	127
2.5 Αποτελέσματα	128
2.5.1 Μελέτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού.....	128
2.5.1.1 Η επίδραση της οκτρεοτίδης στον πολλαπλασιασμό των HepG2 κυττάρων.	128
2.5.1.2 Η επίδραση του UDCA στον πολλαπλασιασμό των HepG2 κυττάρων	130
2.5.2 Μελέτη της απόπτωσης των HepG2 κυττάρων	131
2.5.2.1 Ο ρόλος της οκτρεοτίδης στην απόπτωση των HepG2 κυττάρων	131
2.5.2.2 Ο ρόλος του UDCA στην απόπτωση των HepG2 κυττάρων	139
2.5.3 Δραστικότητα κασπασών.....	147
2.5.3.1 Οκτρεοτίδη	147
2.5.3.2 UDCA	153
2.6 Συζήτηση.....	165
2.6.1 Οκτρεοτίδη.....	167
2.6.2 UDCA.....	175
3. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	181
Περίληψη	182
Summary.....	185
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	187

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Απόπτωση

Το φαινόμενο της κυτταρικής απόπτωσης πρωτοπεριγράφηκε από τους Kerr, Wyllie και Currie το 1972 (Kerr et al., 1972), οι οποίοι παρατήρησαν πρωτόγνωρα μορφολογικά χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου σε κύτταρα του ήπατος. Συγκεκριμένα, παρατήρησαν ότι τα αποπτωτικά κύτταρα εμφάνιζαν διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως η παρουσία μεμβρανικών σωματιδίων, η πυρηνική πύκνωση (nuclear pyknosis or chromatin condensation) και η καρρυορηξία (karyorhexis or nuclear fragmentation). Επιπρόσθετα, επειδή τα κύτταρα που πέθαιναν με αποπτωτικό μηχανισμό, περιβάλλονταν στη συνέχεια πλήρως από γειτονικά φαγοκύτταρα, καμία διαρροή τοξικών κυτταρικών προϊόντων και κανένα σημείο φλεγμονής γύρω από τα νεκρά κύτταρα, δεν παρατηρήθηκε. Η εικόνα των κυττάρων αυτών θύμιζε στους ερευνητές την εικόνα των φύλλων που διασκορπίζονται γύρω από τα δέντρα, κατά την περίοδο του φθινοπώρου. Έκτοτε, η ελληνική λέξη "αποπτωση", δεν περιγράφει μόνο την πτώση των φύλλων κατά το φθινόπωρο, αλλά και την διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

Για κάθε κύτταρο υπάρχει το χρονικό διάστημα που ζει και η χρονική στιγμή που πεθαίνει. Ο φυσιολογικός κυτταρικός θάνατος επισυμβαίνει όταν ένα κύτταρο πεθαίνει εντός ενός οργανισμού, με ένα μηχανισμό που ενορχηστρώνεται από πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του ξενιστή. Ο σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι η απομάκρυνση των "ανεπιθύμητων" κυττάρων και συμβάλλει σε διαδικασίες όπως: η φυσιολογική ανάπτυξη και ομοιόσταση, η άμυνα ενός οργανισμού και η φυσιολογική γήρανση. Δεν υφίσταται προγραμματισμός υποχρεωτικού κυτταρικού θανάτου σε μονοκύτταρους οργανισμούς, καθώς αυτό θα οδηγούσε στην εξάλειψή τους. Επίσης δε φαίνεται να οδηγούνται σε γήρανση όπως τα ζώα και τα φυτά, αν και έχει παρατηρηθεί ο θάνατος σε ασύμμετρα διαιρούμενους μύκητες, μετά τη δημιουργία συγκεκριμένου αριθμού απογόνων (Kennedy et al., 1995). Αναφορές, ακόμα, υπάρχουν ότι το ίδιο παρατηρείται, προαιρετικά, σε καταστάσεις απειλητικές για την επιβίωσή τους (Shub, 1994).

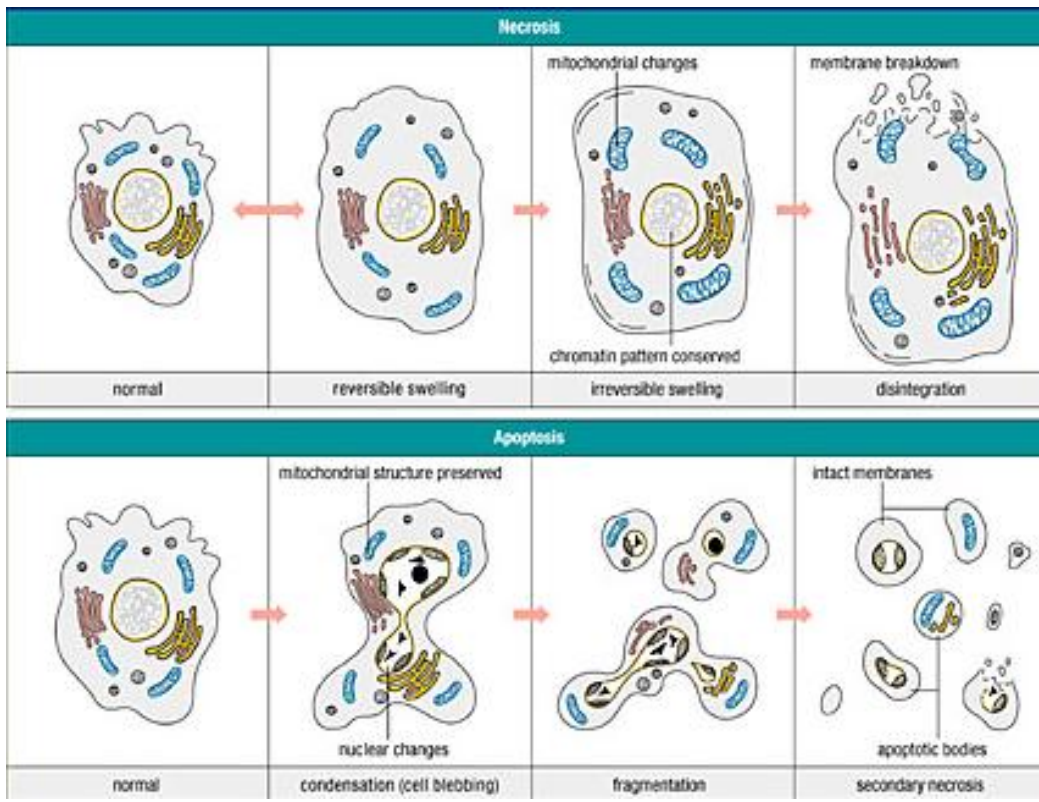
Συγκεκριμένα βακτήρια θανατώνονται όταν ανιχνεύσουν βακτηριοφάγο, εμποδίζοντας την εξάπλωση της λοίμωξης σε ολόκληρη την αποικία (Shub, 1994). Η υιοθέτηση παρόμοιων μηχανισμών από πολυκύτταρους οργανισμούς για την ανάπτυξη, ομοιόσταση και άμυνά τους, συμβαδίζει με την παρατήρηση ότι στα μετόζωα ο φυσιολογικός κυτταρικός θάνατος παρουσιάζει χαρακτηριστική μορφολογία,

αποκαλούμενη "απόπτωση" (Clarke and Clarke, 1995; Kerr et al., 1972). Κύτταρα που πεθαίνουν αυτόνομα λόγω έλλειψης παραγόντων ανάπτυξης (Duke and Cohen, 1986) ή που θανατώνονται από κυτταροτοξικά T κύτταρα, εμφανίζουν την ίδια μορφολογία (Russell et al., 1980).

Υπάρχουν δύο τρόποι με τους οποίους ένα κύτταρο μπορεί να οδηγηθεί στο θάνατο: είτε θανατώνεται από βλαπτικούς παράγοντες είτε ωθείται άμεσα ή έμμεσα προς την "αυτοκτονία". Μορφολογικά, επίσης, δύο τύποι κυτταρικού θανάτου μπορούν να διακριθούν, παρά το ότι είναι πιθανόν ότι αποτελούν δύο τερματισμούς ενός φάσματος με πιθανές ενδιάμεσες μορφές. Η μία μορφή κυτταρικού θανάτου καλείται νέκρωση (necrosis or "accidental cell death") και η άλλη απόπτωση (ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος). Κύτταρα που προσβάλλονται από βλαπτικό παράγοντα, όπως μηχανική βλάβη ή έκθεση σε τοξικά χημικά προϊόντα, περιέρχονται σε μία χαρακτηριστική σειρά αλλαγών που χαρακτηρίζουν τη νέκρωση: διογκώνονται (και τα οργανίδια τους, όπως τα μιτοχόνδρια), επειδή η ικανότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης να ελέγχει τη διόδο ιόντων και ύδατος, αποδιοργανώνεται, ενώ τα περιεχόμενα του κυττάρου διαρρέουν εκτός αυτού. Η διαρροή αυτή οδηγεί στην εμφάνιση μαζικών φλεγμονωδών αντιδράσεων στους περιβάλλοντες ιστούς (Dumitriu et al., 2005; Lotze and Tracey, 2005; Scaffidi et al., 2002; Vanden Berghe et al., 2006). Παράλληλα, έχει αναφερθεί ότι ο κυτταρικός θάνατος του τύπου της νέκρωσης, αυξάνει την πιθανότητα μεταλλάξεων πρωτοογκογονιδίων, ενώ φαίνεται να εμπλέκεται και σε σειρά παθολογικών καταστάσεων, όπως το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, η ισχαιμία και νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Jiang and Pisetsky, 2007; Stefani and Dobson, 2003). Επίσης, η νέκρωση συχνά θεωρείται αιτιολογικός παράγοντας της ανάπτυξης ενός όγκου, καθώς οι εκτεταμένου εύρους και εκτενείς χρονικά φλεγμονώδεις απαντήσεις, συσχετίζονται στενά με την ανάπτυξη του όγκου, την αγγειογένεση και την επέκτασή του (Allavena et al., 2008; Tan and Coussens, 2007).

Τα κύτταρα που ωθούνται σε απόπτωση, συρρικνώνονται, έχουν τα μιτοχόνδριά τους κατεστραμμένα με την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, αναπτύσσουν φυσαλιδώδεις κύστες στην επιφάνειά τους, έχουν τη χρωματίνη (DNA και πρωτεΐνη) στον πυρήνα τους εκφυλισμένη, σπάνε σε μικρά κομμάτια, περιβαλλόμενα από μεμβράνη (αποπτωτικά σωματίδια) (Σχήμα 1), ενώ η φωσφολιπιδική φωσφατιδυλοσερίνη, που είναι φυσιολογικά κρυμμένη μέσα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, εκτίθεται στην επιφάνεια. Αυτή συνδέεται σε υποδοχείς φαγοκυττάρων, όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα,

που στη συνέχεια εγκολλώνουν τα κυτταρικά “κομμάτια”. Τα φαγοκύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη φλεγμονής.



Σχήμα 1. Ο κυτταρικός θάνατος του τύπου της νέκρωσης οδηγεί στην τελική αποδόμηση του κυττάρου, λόγω της άμεσης διαταραχής στη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, ενώ ο κυτταρικός θάνατος του τύπου της απόπτωσης, οδηγεί στο σχηματισμό των αποπτοτικών σωματίων. (Roche Daagnostics)

Η όλη διαδικασία περιλαμβάνει τη συμμετοχή ειδικών πρωτεολυτικών ενζύμων, των κασπασών, που περιέχουν κυστεΐνη στα ενεργά τμήματά τους και διασπώνται σε ασπαρτικό (Adams, 2003). Έτσι, με τη διάσπαση συγκεκριμένων πρωτεΐνων, επισυμβαίνει ενεργοποίηση όσο και απενεργοποίηση συγκεκριμένων στόχων, με αποτέλεσμα τη διάλυση του κυττάρου και την απενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης.

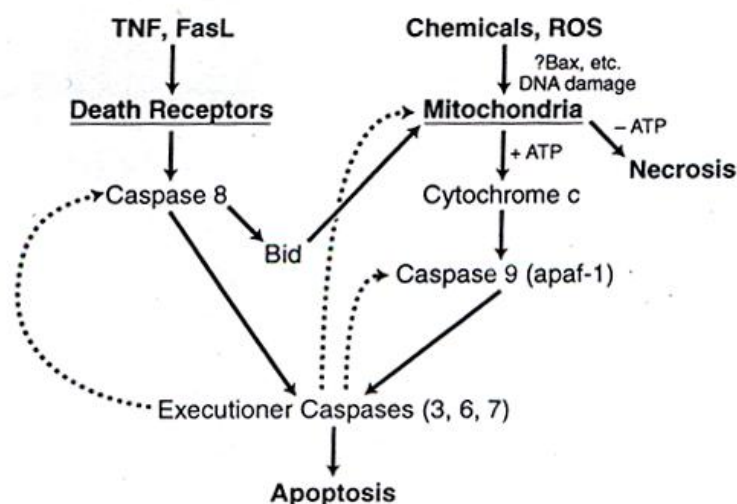
Το μοτίβο των γεγονότων στον κυτταρικό θάνατο με “αυτοκτονία” είναι τόσο τακτικά προγραμματισμένο, ώστε η διαδικασία συχνά αποκαλείται προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (programmed cell death or PCD). Ο κυτταρικός μηχανισμός του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου φαίνεται να είναι τόσο ουσιαστικός για το κύτταρο, όσο για παράδειγμα η μίτωση. Παραδείγματα που αποδεικνύουν ότι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση) είναι απαραίτητος στην κανονική

ανάπτυξη όσο είναι η μίτωση, αποτελούν, ο σχηματισμός των δακτύλων των χεριών και των ποδιών του εμβρύου, που απαιτεί την απομάκρυνση, μέσω της απόπτωσης, του ιστού που βρίσκεται μεταξύ τους, η απόρριψη ενδομητρίου κατά την αρχή του εμμηνορρυσιακού κύκλου (συμβαίνει με την απόπτωση), καθώς και ο σχηματισμός των κατάλληλων συνδέσεων (συνάψεων) μεταξύ των νευρώνων στον εγκέφαλο, που απαιτεί την εξάλειψη των πλεοναζόντων κυττάρων μέσω της απόπτωσης

Παράλληλα, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι απαραίτητος για την καταστροφή κυττάρων που αντιπροσωπεύουν απειλή για την ακεραιότητα του οργανισμού. Μία από τις μεθόδους με τις οποίες τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (cytotoxic T lymphocytes, CTLs) σκοτώνουν τα μολυσμένα με ιό κύτταρα είναι μέσω της απόπτωσης. Καθώς η κυτταρο-μεσολαβούμενη ανοσολογική απόκριση ελαττώνεται, τα επιδρώντα κύτταρα (effector cells) πρέπει να απομακρυνθούν για την αποφυγή της επίθεσης αυτών έναντι συστατικών του σώματος. Τα CTLs επάγουν την απόπτωση το ένα στο άλλο, ακόμα και στον ίδιο τον εαυτό τους. Ελαττώματα στον αποπτωτικό μηχανισμό σχετίζονται με αυτοάνοσες ασθένειες, όπως ο ερυθματώδης λύκος και η ρευματοειδής αρθρίτιδα.

Μία μεγάλη σειρά μελετών έχουν αποδείξει ότι η απορρύθμιση της διαδικασίας του αποπτωτικού θανάτου συμβάλλει στην εμφάνιση ποικιλίας ασθενειών, όπως ο καρκίνος (απενεργοποίηση απόπτωσης) ή το σηπτικό σοκ (εκτεταμένη απόπτωση), (Danial and Korsmeyer, 2004; Han et al., 2008). Βλάβη στο γενετικό υλικό ενός κυττάρου μπορεί να το οδηγήσει είτε στο να αποδιοργανώσει την κατάλληλη εμβρυική ανάπτυξη, οδηγώντας σε συγγενείς ανωμαλίες, είτε στο να γίνει καρκινικό. Τα κύτταρα ανταποκρίνονται στη βλάβη του DNA αυξάνοντας την παραγωγή τους σε p53, που αποτελεί δυναμικό επαγωγέα της απόπτωσης. Η σημασία του p53 ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, αναδεικνύεται από το γεγονός ότι σχεδόν το 50% των ανθρώπινων κακοηθειών εμφανίζουν μετάλλαξη του p53 γονιδίου (Hollstein et al., 1994). Οι μεταλλάξεις αυτές, έχουν ως αποτέλεσμα ελαττωματική πρωτεΐνη και αποτελούν θανατηφόρο απειλή για τον οργανισμό. Άμεσα ή έμμεσα οδηγούν είτε σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου είτε σε απόπτωση. Εκτός από τις διάφορες μορφές καρκίνου, η απορρύθμιση της διαδικασίας της απόπτωσης (είτε μείωση είτε αύξηση) έχει θεωρηθεί παθογενετικό αίτιο νευροεκφυλιστικών νόσων, ισχαιμικής βλάβης και αυτοάνοσων διαταραχών (Elmore, 2007). Τέλος, η ακτινοβολία και τα χημικά που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου επάγουν την απόπτωση σε μερικούς τύπους καρκινικών κυττάρων.

Το αν ένα κύτταρο θα οδηγηθεί σε απόπτωση καθορίζεται από την ισορροπία μεταξύ της άρσης θετικών σημάτων, που απαιτούνται για τη συνεχιζόμενη επιβίωσή του και της λήψης αρνητικών σημάτων. Η συνεχιζόμενη επιβίωση των περισσότερων κυττάρων απαιτεί τη λήψη συνεχών ερεθισμάτων από άλλα κύτταρα, ενώ απαραίτητη είναι πολλές φορές η συνεχής προσκόλλησή τους στην επιφάνεια όπου αναπτύσσονται. Παραδείγματα θετικής σηματοδότησης είναι οι αυξητικοί παράγοντες για τους νευρώνες και η ιντερλευκίνη-2 (IL-2), ένας βασικός παράγοντας για τη μίτωση των λεμφοκυττάρων. Παραδείγματα λήψης αρνητικών σημάτων είναι παράγοντες που επιδρούν ενδοκυττάρια, όπως τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικών παραγόντων μέσα στο κύτταρο και η βλάβη στο DNA από τους παράγοντες αυτούς ή άλλους (υπεριώδης ακτινοβολία, ακτίνες-χ, χημειοθεραπευτικά φάρμακα), καθώς και μόρια που, συνδεδεμένα σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου, δίνουν το σήμα στο κύτταρο να αρχίσει το πρόγραμμα της απόπτωσης.



Σχήμα 2. Ο μηχανισμός της απόπτωσης πυροδοτείται είτε από εξωκυττάριους ενεργοποιητές του κυτταρικού θανάτου, που προσδέονται σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (TNF, FasL), είτε από ενδοκυττάριους παράγοντες, όπως χημικούς παράγοντες και οξειδωτικές ρίζες οξυγόνου (ROS). Μέσω διαφορετικών ενδοκυττάριων μονοπατιών και με τη μεσολάβηση των κασπασών, το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση. (Kaplowitz, 2000a)

Σε αυτούς τους ενεργοποιητές θανάτου (death activators) περιλαμβάνονται: ο tumor necrosis factor - alpha (TNF- α), που συνδέεται στον TNF υποδοχέα (TNF receptor), η λεμφοτοξίνη (lymphotoxin, επίσης γνωστή ως TNF- β), που επίσης συνδέεται στον TNF receptor και ο Fas συνδέτης (Fas ligand, FasL), ένα μόριο που συνδέεται σε έναν υποδοχέα της επιφάνειας του κυττάρου ονομαζόμενο Fas (αποκαλούμενο επίσης CD95) (Σχήμα 2).

Επίσης, το αν ένα κύτταρο θα οδηγηθεί σε θάνατο τύπου νέκρωσης ή απόπτωσης, εξαρτάται από τις συνθήκες, όπως: διαθεσιμότητα ATP, ριζών οξυγόνου, μονοξειδίου του αζώτου και άλλων παραγόντων, που καθορίζουν τη μεμβρανική διαπερατότητα των μιτοχονδρίων και πιθανώς από τη δραστικότητα των εκτελεστικών κασπασών.

Ενδοκυττάριοι παράγοντες που αναμειγνύονται στον καθορισμό του τύπου κυτταρικού θανάτου φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Παράγοντες που προωθούν ή αναστέλλουν την απόπτωση (Kaplowitz, 2000a)

Προωθούν την απόπτωση	Αναστέλλουν την απόπτωση
Growth factor withdrawal	NFκB
DNA damage	Nitric oxide
Regeneration	Heat shock protein (HSP) 70
Death Receptors (e.g., TNFR1, Fas, etc.)	cFLIP
Oxidative stress	Oxidative stress
Drugs and toxins	IAPs
p53	Silencer of death domains (SODD)
Bid, Bax, Bak, Bad	Bcl ₂ , Bcl-X _L
Ceramide	
Granzyme/porin	

1.2 Κυτταρικός κύκλος και απόπτωση

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση αποτελούν στενά συνδεδεμένες διαδικασίες και οι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου μπορούν να επηρεάσουν τόσο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και την εμφάνιση και το είδος του κυτταρικού θανάτου. Ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου περιλαμβάνει μία σειρά γονιδίων (p53, p21, *c-myc*) και αντίστοιχων ρυθμιστικών πρωτεϊνών, που καθορίζουν άμεσα την κυτταρική εξέλιξη, μέσω ρύθμισης των σταδίων του κυτταρικού κύκλου (King and Cidlowski, 1998). Ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου αποτελεί στοιχείο "κλειδί" για την κατάλληλη ανάπτυξη ενός οργανισμού, τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών του και την ικανότητά του να ανταποκρίνεται σε ποικιλία ορμονικών και άλλων ερεθισμάτων. Πιο συγκεκριμένα, μία αποτυχία στις φάσεις G1/S ή G2/M του κυτταρικού κύκλου, μπορεί να ευθύνεται για τη συσσώρευση επιβλαβών μεταλλαγών, που θα έχουν ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό

μετασχηματισμό. Παράλληλα, όμως, μπορεί να επισυμβεί μία κυτταρική δέσμευση στη φάση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (Paulovich et al., 1997; Schafer, 1998). Η ισορροπία μεταξύ της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης ρυθμίζεται από ένα σύνολο παραγόντων, με μεγάλη ετερογένεια έκφρασης σε κυτταροκαλλιέργειες. Οι διαταραχές του κυτταρικού κύκλου από την επίδραση ιικών γονιδιακών προϊόντων συσχετίζονται με συγκεκριμένους στόχους ενεργοποιητών ή αναστολέων του κυτταρικού κύκλου, που μπορεί να είναι ειδικοί για κάθε τύπο κυττάρου (Arima et al., 2001), ώστε η έκφραση ή το επίπεδο έκφρασής τους να διαφοροποιείται μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών.

Οι p53 και p21 άμεσα συσχετιζόμενες πρωτεΐνες μπορούν και ρυθμίζονται από σειρά ιικών προϊόντων (Schafer, 1998), επηρεάζοντας τόσο την απόπτωση όσο και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Πολλές είναι οι μελέτες που αποδεικνύουν τον ρόλο της *c-myc* ογκοπρωτεΐνης, ως κεντρικού ρυθμιστή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μέσω της εισόδου "εφησυχασμένων" κυττάρων στη φάση S του κυτταρικού κύκλου (Boxer and Dang, 2001; King and Cidlowski, 1998). Επίσης, το *c-myc* ογκογονίδιο έχει αναφερθεί να μετασχηματίζει πρωτογενή κύτταρα σε συνεργασία με το ογκογονίδιο *ras* και όταν υπερεκφράζεται μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση (Bouchard et al., 1998; Desaintes et al., 1999; Thompson, 1998). Καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παίζει και η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (retinoblastoma protein, Rb), η οποία ρυθμίζει τη δραστηριότητα μίας οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων, γνωστών ως E2Fs. Οι E2F πρωτεΐνες έχουν πρόσφατα αναγνωριστεί ως ρυθμιστές της έκφρασης μίας μεγάλης σειράς γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που κωδικοποιούν την αντιγραφή του DNA και άλλες μιτωτικές δραστηριότητες. Το Rb/E2F κυτταρικό μονοπάτι αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην ισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταρικής απόπτωσης, είτε ως πρώιμος ενεργοποιητής σημάτων κυτταρικού πολλαπλασιασμού, είτε ως ρυθμιστής των p53-εξαρτώμενων αποπτωτικών μηχανισμών (Hallstrom and Nevins, 2009).

Οι ιοί αναπτύσσουν στρατηγικές ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, επηρεάζοντας διαφορετικά σημεία ελέγχου (checkpoints), ανάλογα με τις απαιτήσεις τους για αντιγραφή ή για παραμονή σε λανθάνουσα κατάσταση. Μεταξύ των RNA ιών, ο HTLV-1 διεγείρει *in vitro* τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από την G0/G1 φάση στην G2/M φάση, σε μία T- κυτταρική σειρά (Neuveut et al., 1998). Η HIV

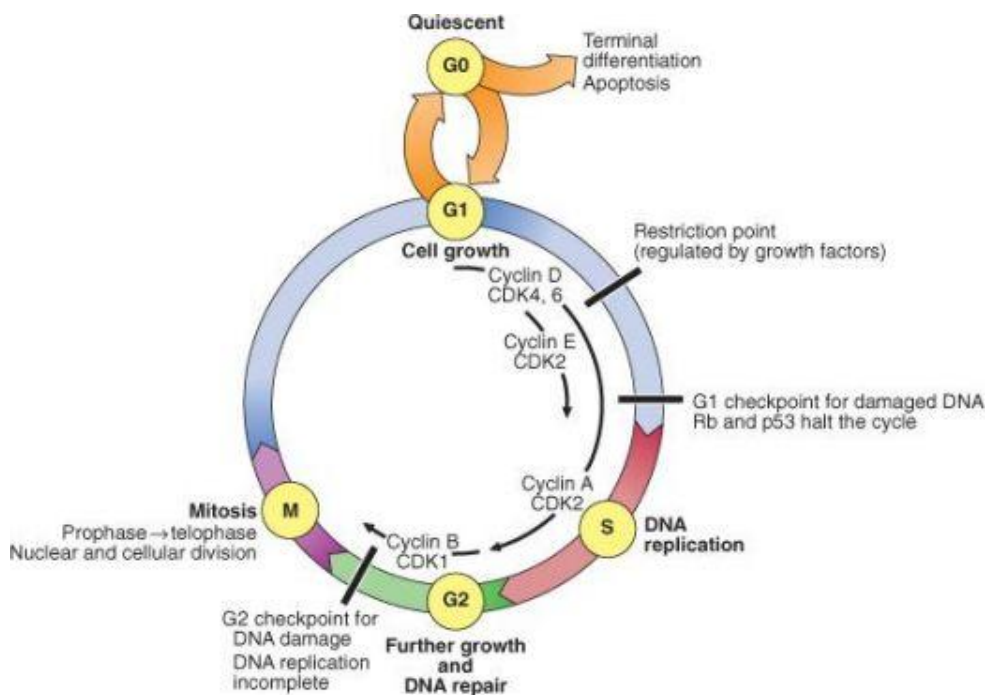
vpr πρωτεΐνη έχει αναφερθεί να επιδρά στον κυτταρικό κύκλο, κατά την G2 φάση (Swanton and Jones, 2001). Η εμμένουσα λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) αποτελεί κυρίαρχο αίτιο ηπατικής νόσου και συσχετίζεται στενά με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Saito et al., 1990). Τα HepG2 κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, που προσομοιάζουν βιοσυνθετικά και βιοχημικά με τα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα, αποτελούν κατάλληλο μοντέλο μελέτης των αλληλεπιδράσεων κυττάρου και ηπατοτρόπων ιών, όπως ο HCV. Εξετάζοντας την επίδραση της πυρηνικής πρωτεΐνης του ιού HCV (core protein) στον κυτταρικό κύκλο ασύγχρονων καλλιιεργειών HepG2 κυττάρων, προσομοιάζοντας περισσότερο συνθήκες *in vivo*, φάνηκε να αυξάνεται η S φάση του κυτταρικού κύκλου, μέσω σταθεροποίησης της ενδογενούς *c-myc* πρωτεΐνης, εύρημα που ίσως να εξηγεί το μηχανισμό της ηπατοκαρκινογένεσης από τον HCV (Ruggieri et al., 2004).

Η αλληλεπίδραση των p53, Bax και bcl-2, η επαγωγή απόπτωσης από την υπερέκφραση του E2F1 και η ενεργοποίηση της απόπτωσης με τη σύνδεση της p21 πρωτεΐνης με την κασπάση-3, της οποίας αποτελεί υπόστρωμα, αποτελούν μερικά παραδείγματα στενής συσχέτισης της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της εμφάνισης απόπτωσης (Σχήμα 3).

1.3 Οι φάσεις της απόπτωσης

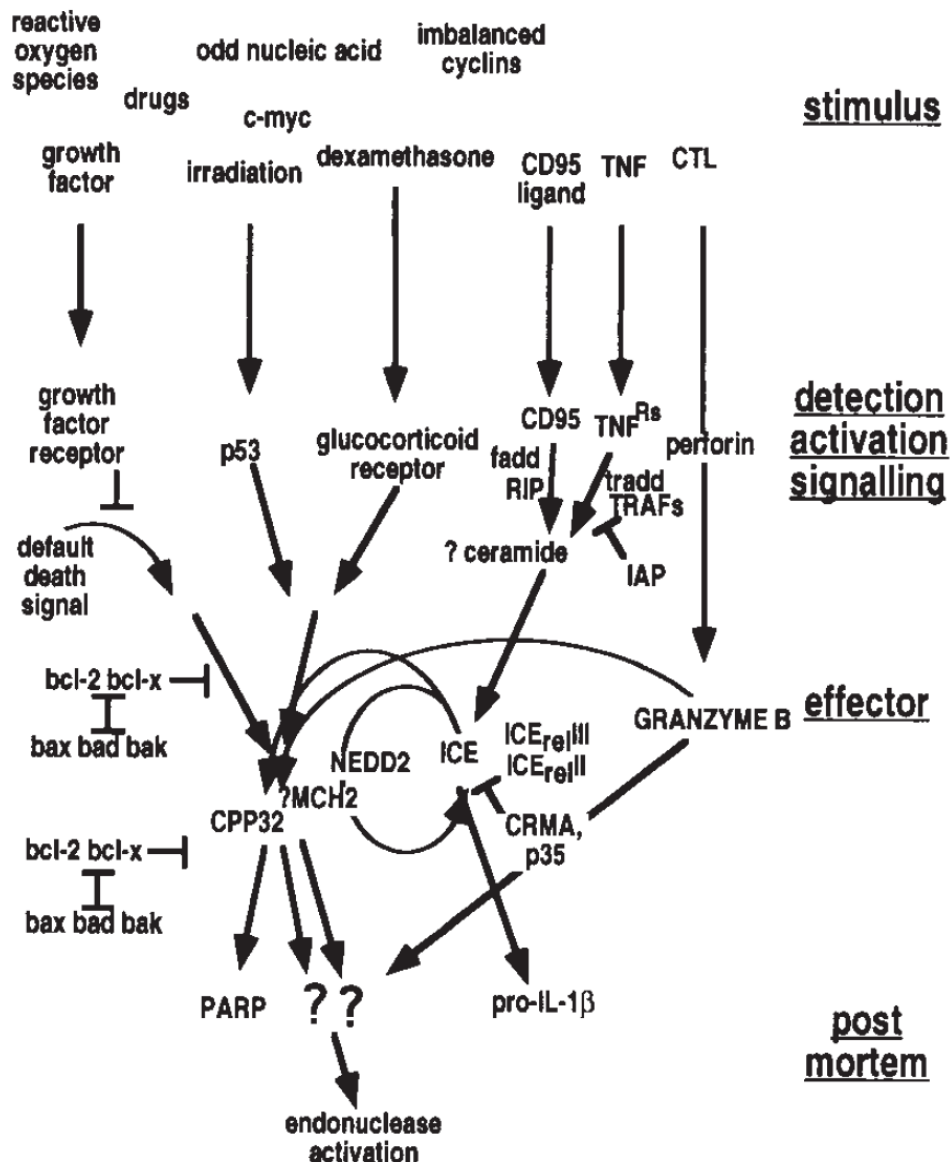
Η διαδικασία του αποπτωτικού θανάτου μπορεί να μελετηθεί καλύτερα σε τέσσερις φάσεις (Σχήμα 4). Στην πρώτη φάση περιλαμβάνεται το ερέθισμα που προκαλεί την έναρξη του αποπτωτικού μηχανισμού. Αυτό μπορεί να είναι εξωτερικό, επαγόμενο από ενεργοποιητές θανάτου (death activators), που συνδέονται σε υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου, όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF- α), η λεμφοτοξίνη (lymphotoxin) και ο Fas προσδέτης (Fas ligand, FasL), ή εσωτερικό, επαγόμενο από σήματα που εμφανίζονται μέσα στο κύτταρο, όπως η δράση ενός φαρμάκου, μίας τοξίνης ή ακτινοβολίας. Η δεύτερη φάση περιλαμβάνει την ανίχνευση αυτού του σήματος ή της μεταβολικής κατάστασης, από ενδοκυττάρους παράγοντες, οδηγώντας στη μεταβίβαση του σήματος στον εκτελεστικό μηχανισμό του κυτταρικού θανάτου. Η τρίτη φάση είναι η εκτελεστική, στην οποία συμμετέχουν πρωτεάσες που ενεργοποιούνται κατά τη διαδικασία της απόπτωσης (κασπάσες), καθώς επίσης θετικοί και αρνητικοί ρυθμιστές αυτής. Στην τέταρτη και τελευταία φάση έχουμε τη συμπύκνωση της χρωματίνης και την εκφύλιση του

DNA. Ο νηματώδης *Caenorhabditis elegans* έχει αποτελέσει ένα άριστο μοντέλο παρατήρησης και μελέτης του φυσιολογικού κυτταρικού θανάτου και μέσω μεταλλαγμένων μορφών, όπου ο κυτταρικός θάνατος είναι ανώμαλος, μπορούν να



Σχήμα 3. Η ισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταρικής απόπτωσης καθορίζεται από τη δράση μίας σειράς παραγόντων, που καθορίζουν τόσο την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου όσο και την παραμονή σε λανθάνουσα κατάσταση και την επαγωγή απόπτωσης.

μελετηθούν τα υπεύθυνα γονίδια που εμπλέκονται (Ellis et al., 1991). Στον *C. Elegans* η κυστεΐνη-πρωτεάση Ced-3 είναι απαραίτητη για την εμφάνιση προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Ellis and Horvitz, 1986; Yuan et al., 1993). Η ικανότητα της Ced-3 να προκαλεί απόπτωση μπορεί να μπλοκαριστεί από την Ced-9 ή τον παράγοντα bcl-2 (Hengartner et al., 1992; Hengartner and Horvitz, 1994; Vaux et al., 1992). Δεν είναι γνωστό εάν η Ced-9 εμποδίζει την ενεργοποίηση της Ced-3 πρωτεάσης ή εμποδίζει το ενεργό ένζυμο να προσεγγίσει τα υποστρώματά του. Τα περισσότερα ced γονίδια (ced -1, -2, -5, -6, -7, -8, -10) είναι απαραίτητα για την αποτελεσματική διάθεση των νεκρωτικών στοιχείων, που αναγνωρίζονται και φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά κύτταρα (Ellis et al., 1991).

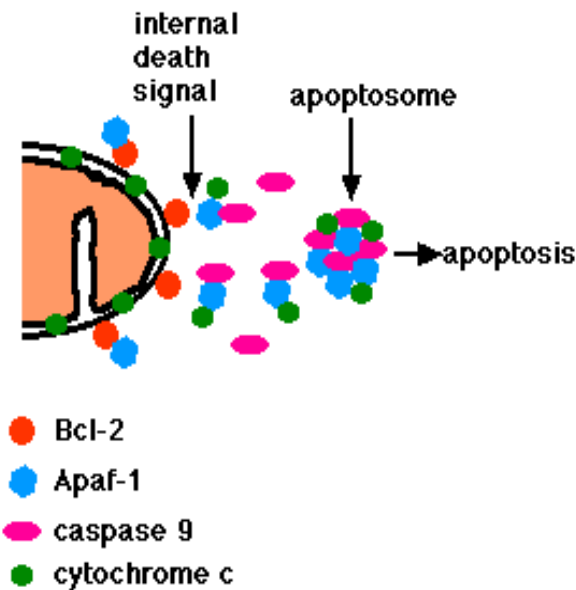


Σχήμα 4. Ένα μοντέλο της απόπτωσης στα θηλαστικά. Η απόπτωση μπορεί να διαιρεθεί σε τέσσερις φάσεις. Πολλαπλά ερεθίσματα και μονοπάτια μεταβίβασης του σήματος, λίγα παραδείγματα εκ των οποίων απεικονίζονται στο σχήμα, μπορούν να οδηγήσουν ανεξάρτητα στην ενεργοποίηση εκτελεστικών κασπασών (CPP32), οι οποίες με τη σειρά τους αυτο-ενεργοποιούνται ή ενεργοποιούν άλλες. Η Bcl-2 και ανάλογες πρωτεΐνες, ανάλογα με το βαθμό έκφρασής τους, μπορούν να αναστείλουν τη δράση των κασπασών, είτε μπλοκάροντας την ενεργοποίησή τους είτε παρεμποδίζοντάς τες από το να φτάσουν στον τελικό τους στόχο. (Vaux and Strasser, 1996)

1.4 Μονοπάτια απόπτωσης

Η απόπτωση (ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, όπως αλλιώς αποκαλείται) είναι ένας μηχανισμός κυτταρικής αυτοκαταστροφής, που εμπλέκεται σε μία μεγάλη γκάμα βιολογικών φαινομένων (Hengartner et al., 1992). Εκτεταμένη ή ανεπαρκής απόπτωση οδηγεί σε ποικιλία ασθενειών που συσχετίζονται με ισχαιμία, νευροεκφύλιση, αυτοανοσία και ιογενείς λοιμώξεις, ενώ, επίσης, εμπλέκεται στην ανάπτυξη και την υποτροπή των όγκων (Hengartner and Horvitz, 1994). Υπάρχουν πολλά κυτταρικά μονοπάτια που ενεργοποιούν το μηχανισμό της απόπτωσης, δύο από τα οποία, το εξωκυττάριο και το ενδοκυττάριο, έχουν χαρακτηριστεί καλύτερα (Thornberry and Lazebnik, 1998). Στο ενδοκυττάριο μονοπάτι, κυριαρχεί ο ρόλος του μιτοχονδρίου, ως κυτταρικό οργανίδιο που ρυθμίζεται από τη δράση προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μελών της Bcl-2 υπερικογένειας, ενώ στο εξωκυττάριο μονοπάτι περιλαμβάνονται: η TNF-σχετιζόμενη υπερικογένεια των μεμβρανικών υποδοχέων (όπως ο TNF υποδοχέας, ο CD95/Fas υποδοχέας και ο TRAIL) και τα ανασταλτικά τους τμήματα με τον κυτταροπλασματικό τους συνδέτη-προσαρμογέα ή τα ανασταλτικά μόρια του κυτταρικού θανάτου (π.χ., FADD ή FLIP).

Η αποπτωτική διαδικασία εκτελείται από μία οικογένεια πρωτεασών κυστεΐνης, που διασπών τα υποστρώματά τους ειδικά, σε κατάλοιπα ασπαρτικού (Yarmolinsky, 1995). Οι πρωτεάσες αυτές, γνωστές ως κασπάσες, ενεργοποιούνται από το εξωκυττάριο και/ή το ενδοκυττάριο μονοπάτι. Το εξωκυττάριο μονοπάτι ενεργοποιείται από ενεργοποιητές θανάτου που προσδένονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ το ενδοκυττάριο μονοπάτι ξεκινάει από το σχηματισμό του κυτταροπλασματικού "αποπτοσώματος", όπως αποκαλείται, το οποίο αποτελείται από το μόριο Araf-1, την προκασπάση-9 και το απελευθερούμενο από τα μιτοχόνδρια, κυτόχρωμα-c (Σχήμα 5). Προτού, όμως, αναφερθούμε διεξοδικά στα διαφορετικά μονοπάτια απόπτωσης, ας δούμε το ρόλο των μιτοχονδρίων στην απόπτωση, τα οποία εμπλέκονται κατά κύριο λόγο ως πρωταγωνιστές του ενδοκυττάρια-ενεργοποιούμενου αποπτωτικού μηχανισμού.



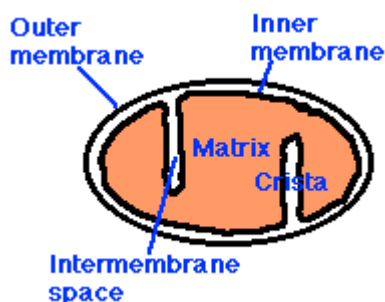
Σχήμα 5. Απεικονίζεται σχηματικά η εντόπιση των παραγόντων που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης μέσω μιτοχονδρίων, με το σχηματισμό του "αποπτοσώματος" και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c.

1.5 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην απόπτωση

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια περικλειόμενα από μεμβράνη και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των περισσοτέρων ευκαρυωτικών κυττάρων. Η βασική τους λειτουργία είναι η μετατροπή της δυναμικής ενέργειας των τροφικών παραγόντων σε μόρια adenosine 5'-triphosphate (ATP) με τη διαδικασία της κυτταρικής αναπνοής. Η κυτταρική αναπνοή είναι η διαδικασία οξείδωσης τροφικών παραγόντων, όπως η γλυκόζη, προς διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Η απελευθερούμενη ενέργεια παγιδεύεται με τη μορφή ATP, για να χρησιμοποιηθεί σε μια σειρά κυτταρικών δραστηριοτήτων που απαιτούν ενέργεια. Η διαδικασία επισυμβαίνει σε δύο φάσεις: τη διαδικασία της γλυκόλυσης, με τη διάσπαση της γλυκόζης προς πυροσταφυλικό οξύ και την πλήρη οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος προς διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η γλυκόλυση γίνεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ οι μετέπειτα βιοχημικές αντιδράσεις επισυμβαίνουν στα μιτοχόνδρια.

Μορφολογικά τα μιτοχόνδρια περιβάλλονται από μια εξωτερική μεμβράνη με ομαλή επιφάνεια και μια εσωτερική μεμβράνη, που δημιουργεί αναδιπλώσεις, αυξάνοντας έτσι τη συνολική της επιφάνεια, κατά πολύ. Αμφότερες οι μεμβράνες των μιτοχονδρίων έχουν την

τυπική δομή της κυτταρικής μεμβράνης. Το μέρος του μιτοχονδρίου που βρίσκεται μεταξύ των δύο μεμβρανών, ονομάζεται ενδομεμβρανικός ή μεσομεμβρανικός χώρος (Σχήμα 6). Στις αναδιπλώσεις της εσωτερικής μεμβράνης, στη διπλοστιβάδα των φωσφορολιπιδίων, υπάρχουν πάρα πολλά σημαντικά ένζυμα, για την κυτταρική αναπνοή. Ο εσωτερικός χώρος του μιτοχονδρίου, η μήτρα, περιέχει μια παχύρρευστη μάζα με μόρια ενζύμων, DNA και ριβοσώματα. Το μιτοχονδριακό DNA περιέχει αριθμό γονιδίων, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ορισμένων ιδιαίτερων πρωτεϊνών, που εντοπίζονται μόνο στα μιτοχόνδρια. Η παραγωγή τους γίνεται στα ριβοσώματα των μιτοχονδρίων. Αυτό εξασφαλίζει μια σχετική γενετική αυτοδυναμία στα μιτοχόνδρια. Λειτουργικά τα μιτοχόνδρια είναι υπεύθυνα για την αερόβια κυτταρική αναπνοή, λειτουργία που εφοδιάζει το κύτταρο με μεγάλα ποσά ATP, που το κύτταρο χρησιμοποιεί συνεχώς για τις λειτουργίες της ζωής.



Σχήμα 6. Το μιτοχόνδριο, με την εξωτερική και την εσωτερική του μεμβράνη και τον ενδομεμβρανικό χώρο, συμμετέχει ποικιλοτρόπως στο μηχανισμό επαγωγής της απόπτωσης.

Η εξωτερική μεμβράνη εμπεριέχει πολλά συμπλέγματα παρεμβαλλόμενων πρωτεϊνών που σχηματίζουν κανάλια, μέσω των οποίων μια ποικιλία από μόρια και ιόντα μετακινούνται εντός και εκτός των μιτοχονδρίων. Η εσωτερική μεμβράνη περιέχει 5 συμπλέγματα παρεμβαλλόμενων πρωτεϊνών: την NADH αφυδρογονάση, την ηλεκτρική αφυδρογονάση, την αναγωγάση του κυτοχρώματος c (γνωστή επίσης ως cytochrome b-c₁ complex), την οξειδάση του κυτοχρώματος c και τη συνθάση του ATP. Στη μήτρα των μιτοχονδρίων περιέχεται ένα πολύπλοκο μείγμα διαλυτών ενζύμων, που καταλύουν την αναπνοή του πυροσταφυλικού οξέος και άλλων μικρών οργανικών μορίων. Τα ενζυματικά βήματα διάσπασης του πυροσταφυλικού οξέος συνθέτουν τον κύκλο του κιτρικού οξέος.

1.6 Απόπτωση πυροδοτούμενη από ενδοκυττάρια σήματα

Τα τελευταία χρόνια, τα μιτοχόνδρια έχουν αναγνωριστεί ως πολύ σημαντικότερα οργανίδια, από ότι μια απλή ενεργειακή κυτταρική πηγή. Κατέχουν καθοριστική θέση στη ρύθμιση των μονοπατιών του κυτταρικού θανάτου, με τη μεσολάβηση της δράσης πρωτεϊνών της Bcl-2 υπερικογένειας (Green and Kroemer, 2004; Green and Reed, 1998). Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, προκαλούμενη από βλάβη στο DNA ή από επίδραση άλλων γονοτοξικών παραγόντων, οδηγεί στο μη αντιστρεπτό γεγονός του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (Green and Reed, 1998). Η κατάτμηση του μιτοχονδρίου κατά την απόπτωση συνδέθηκε με την κατάρρευση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού ($\Delta\Psi_m$), που θεωρήθηκε ως σημείο μη αναστρέψιμο στον καταρράκτη του κυτταρικού θανάτου (Zamzami et al., 1995).

Τα μιτοχόνδρια παίζουν καθοριστικό ρόλο τόσο στον αποπτωτικό όσο και στον κυτταρικό θάνατο του τύπου της νέκρωσης (Kroemer, 1997; Schulze-Osthoff et al., 1992; Schulze-Osthoff et al., 1993; Susin et al., 1998) και φαίνεται να συμμετέχουν στον κυτταρικό θάνατο που επάγεται και από μεμβρανικούς υποδοχείς θανάτου και από εσωτερικές "πυροδοτήσεις", όπως οι τοξίνες και το οξειδωτικό stress (Sun et al., 1999).

Στην πυροδοτούμενη από ενδοκυττάρια σήματα απόπτωση, η ελεγχόμενη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (έλεγχος από το Bcl-2) είναι κρίσιμη στην έναρξη και την ενίσχυση του προγράμματος θανάτου (Green and Reed, 1998; Reed et al., 1998). Σε ένα υγιές κύτταρο, οι εξωτερικές μεμβράνες των μιτοχονδρίων του εκφράζουν την πρωτεΐνη Bcl-2 στην επιφάνειά τους. Η Bcl-2 συνδέεται σε ένα μόριο της πρωτεΐνης **Apaf-1**. Ενδοκυττάρια βλάβη στο κύτταρο οδηγεί την Bcl-2 στο να απελευθερώνει την Apaf-1 και να μην κρατά περαιτέρω το κυτόχρωμα c από το να διαρρεύσει έξω από τα μιτοχόνδρια.

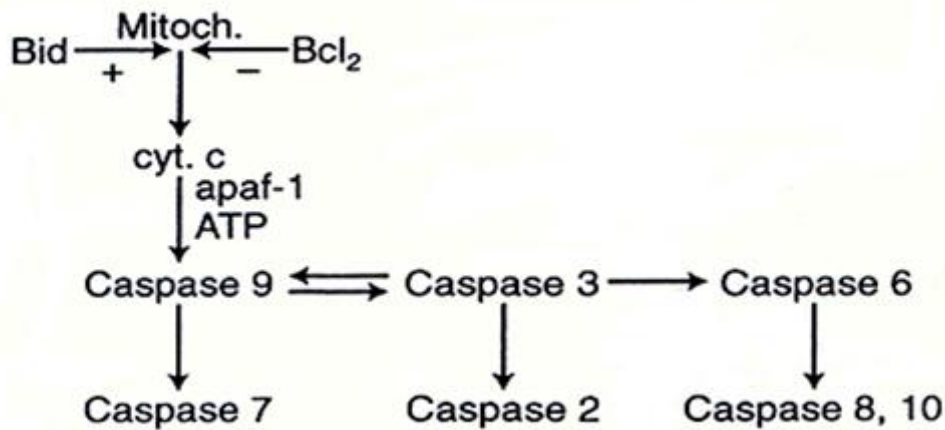
Το απελευθερούμενο κυτόχρωμα c και η Apaf-1 συνδέονται σε μόρια της κασπάσης-9 (**caspase 9**). Το προκύπτον σύμπλεγμα από τα:

- **cytochrome c**
- **Apaf-1**
- **caspase 9**
- (και ATP)

ονομάζεται αποπτώσωμα (**apoptosome**) (Acehan et al., 2002).

Το σύμπλεγμα αυτό είναι κάτι ανάλογο του DISC (που θα περιγραφεί στο εξωκυττάριο αποπτωτικό μονοπάτι), ενώ η Apaf-1 λειτουργεί όπως η FADD και η TRADD

στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (μόρια που, επίσης, θα περιγραφούν στο εξωκυττάριο αποπτωτικό μονοπάτι). Η κασπάση-9, στη συνέχεια, ενεργοποιεί την προκασπάση-3 και την προκασπάση-7, οδηγώντας στην εκτελεστική φάση της απόπτωσης και τη δημιουργία των ολιγονουκλεοσωμάτων (Baliga and Kumar, 2003). Η κασπάση-3 μπορεί, επίσης, να ενεργοποιήσει την κασπάση-8 και να αυτοενισχύσει τις οδούς σηματοδότησης θανάτου ή μπορεί να διασπάσει το Bcl-2, απομακρύνοντας την προστασία αυτού έναντι της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c και της μεταβολής της μεμβρανικής διαπερατότητας (MPT) (Slee et al., 1999).



Σχήμα 7. Η δημιουργία του αποπτοσώματος οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-9, η οποία σηματοδοτεί την έναρξη ενός εξαπλούμενου καταρράκτη ενεργοποίησης κασπασών και άλλων παραγόντων, που θα οδηγήσουν στην τελική μορφή του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. (Kaplowitz, 2000a)

Η διαδοχική ενεργοποίηση της μιας κασπάσης από την άλλη (Σχήμα 7) δημιουργεί έναν εξαπλούμενο καταρράκτη πρωτεολυτικής δραστηριότητας, που οδηγεί σε αποσύνθεση των δομικών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα, αποικοδόμηση του χρωμοσωμικού DNA και τελικά φαγοκύτωση του κυτάρου. Μεταξύ των πρωτεολυτικών στόχων είναι η ανασταλτική πρωτεΐνη της caspase-activated deoxyribonuclease (CAD), η Bcl-2, η poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), πυρηνικές lamins, καθώς και οι: gersolin, focal adhesion kinase (FAK) και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση DNA, στο μάτισμα του mRNA και στην αντιγραφή του DNA.

Κατά την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, προσδένεται στο CED-4 ομόλογο, το Araf-1, το οποίο θα μεσολαβήσει για την ενεργοποίηση της κασπάσης-9. Η κασπάση-9 θα προωθήσει το αποπτωτικό σήμα μέσω της ενεργοποίησης άλλων κασπασών. Σε cell-free εκχυλίσματα, η απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c οδήγησε στην ενεργοποίηση των κασπασών -2, -3, -6, -7, -8, και -10, εκτός της κασπάσης-9, ενώ δεν ενεργοποιήθηκαν οι κασπάσες -1, -4 και -5. In vitro πειράματα επιβεβαίωσαν την επιλεκτική σύνδεση της κασπάσης-9 με τον Araf-1, αλλά με καμία εκ των υπολοίπων, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η κασπάση-9 είναι απαραίτητο στοιχείο για κάθε περαιτέρω επεξεργασία των κασπασών. Ανοσοεξασθένιση των κασπασών -3, -6 και -7 σε κυτταρικά εκχυλίσματα, αποκάλυψε τις διαδοχικές ενεργοποιήσεις του αποπτωτικού καταρράκτη. Στο αποπτωτικό μονοπάτι των μιτοχονδρίων, η κασπάση-3 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση τεσσάρων άλλων κασπασών, των -2, -6, -8 και -10 και συμμετέχει, επίσης, μέσω παλίνδρομου ενισχυτικού μηχανισμού και μέσω της κασπάσης-9, στην πρόοδο του φαινομένου (Slee et al., 1999).

Η μεταβολή της μιτοχονδριακής διαπερατότητας είναι μία κατάσταση του μιτοχονδρίου, κατά την οποία έχει διαταραχθεί η υποκινητική δύναμη των πρωτονίων (Crompton, 1999; van et al., 2003). Αφορά τον πόρο της μεμβρανικής διαπερατότητας των μιτοχονδρίων (permeability transition pore ή PTP), ο οποίος είναι ένα διαμεμβρανικό κανάλι, στα σημεία επαφής της εσωτερικής και της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Τα τμήματα του PTP περιλαμβάνουν το VDAC (voltage-dependent anion channel) στην εξωτερική και το ANT (adenine nucleotide translocator) στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Crompton, 1999). Κατά τη φυσιολογική μιτοχονδριακή λειτουργία, ο ενδομεμβρανικός χώρος χωρίζει την εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη, οπότε το VDAC και το ANT δεν αλληλεπιδρούν. Όταν ενεργοποιείται η μιτοχονδριακή διαπερατότητα, μέσω του σχηματισμού του PTP, η εσωτερική μεμβράνη χάνει την ακεραιότητά της και η οξειδωτική φωσφορυλίωση διαταράσσεται. Η διαταραχή αυτή έχει ως αποτέλεσμα την διαταραχή της παραγωγής ATP και την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species ή ROS) (van et al., 2003). Η διαθεσιμότητα συγκεκριμένων παραγόντων και συνθηκών στον ενδοκυττάριο χώρο, είτε ευνοεί (open) είτε αναστέλλει (closed) τη μεμβρανική μιτοχονδριακή διαπερατότητα (Kaplowitz, 2000a) (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Η διαθεσιμότητα συγκεκριμένων παραγόντων και συνθηκών στον ενδοκυτταρίο χώρο, είτε ευνοεί (open) είτε αναστέλλει (closed) τη μεμβρανική μιτοχονδριακή διαπερατότητα. (Karlowitz, 2000a)

<i>Open</i>	<i>Closed</i>
Decreased membrane potential	ADP, ATP
Protonophores	Thiol compounds
Calcium	Bongkreikic acid
Decreased growth-stimulating hormone reduced glutathione (GSH)	Cyclosporin A
Decreased GSH oxidized glutathione (GSSG)	Bcl ₂ , Bcl-X _L
Lipid peroxides	
Oxidative stress	
Ceramide	
Atractyloside	
Bid/Bax	

Η κυκλοσπορίνη A (cyclosporin A), ένας αναστολέας του πόρου της μιτοχονδριακής μεμβρανικής διαπερατότητας, εμποδίζει τον νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο σε διάφορα μοντέλα κυτταρικής βλάβης, από αίτια όπως οξειδωτικό στρες, Ca²⁺ ionophore τοξικότητα, Reye-σχετιζόμενη κυτταροτοξικότητα και pH-εξαρτώμενη ισχαιμία/reperfusion βλάβη. Με confocal μικροσκόπιο φθορισμού μπορεί εύκολα να φανεί η αύξηση της μιτοχονδριακής διαπερατότητας από τη μετακίνηση calcein από το κυτταρόπλασμα στη μιτοχονδριακή μήτρα. Στην αποπτωτική σηματοδότηση από τον TNF- α φαίνεται ότι η μεταβολή της μιτοχονδριακής διαπερατότητας αποτελεί ενδιάμεσο στάδιο σηματοδότησης, μετά την κασπάση-8 και πριν την κασπάση-3, ενώ η κυκλοσπορίνη εμποδίζει την προ-αποπτωτική απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c από τα μιτοχόνδρια, άρα τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Η εξέλιξη σε αποπτωτικό θάνατο ή κυτταρικό θάνατο τύπου νέκρωσης εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα ATP, που μπλοκάρει τη νέκρωση και προάγει τον αποπτωτικό μηχανισμό κυτταρικού θανάτου. Η ανακάλυψη παραγόντων που θα ρυθμίζουν τη μιτοχονδριακή μεμβρανική διαπερατότητα, αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό στόχο της φαρμακευτικής βιομηχανίας (Lemasters et al., 1999).

Το μιτοχονδριακό κυτόχρωμα-c έχει βρεθεί να κατέχει διπλό ρόλο, τόσο στον κυτταρικό ενεργητικό μεταβολισμό όσο και στην απόπτωση, ως προ-αποπτωτικός παράγοντας. Με την αλληλεπίδραση με παράγοντες ενεργοποίησης αποπτωτικών πρωτεασών (apoptotic protease activating factors ή Apaf), οδηγεί στην αρχική ενεργοποίηση των κασπασών, μετά την απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα. Η

απώλεια ενός κρίκου στην αλυσίδα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης των μιτοχονδρίων, ενεργοποιεί τη δημιουργία υπεροξειδίου. Αν και το κυτόχρωμα-c μπορεί να απελευθερωθεί ανεξάρτητα από τη μεταβολή της μιτοχονδρικής μεμβρανικής διαπερατότητας, οι συνοδές οξειδοαναγωγικές μεταβολές μπορεί να πυροδοτήσουν την τελευταία. Με την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c και της AIF αποπτωτικής πρωτεΐνης, εξασφαλίζεται η αποτελεσματική εκτέλεση του αποπτωτικού μηχανισμού. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της Bcl-2 οικογένειας δρουν ως αναστολείς της απελευθέρωσης τόσο του κυτοχρώματος-c όσο και της AIF πρωτεΐνης. Εκτός της σταθεροποιητικής δράσης τους στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, αναμιγνύονται και στην άμεση πρόσδεση των Araf μορίων, λειτουργώντας ως ρυθμιστές μετά τη μιτοχονδριακή αποπτωτική σηματοδότηση (Cai et al., 1998).

Το κυτόχρωμα-c απελευθερώνεται στην εξωτερική επιφάνεια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης στα πρώιμα στάδια της απόπτωσης και, συνδυαζόμενο με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, ενεργοποιεί τη μετατροπή της προ-κασπάσης-9 στην ενεργό μορφή της. Η απελευθέρωσή του προάγεται από την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax, μια διαδικασία που μπλοκάρεται από τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL (Skulachev, 1998).

Παρά ταύτα, στην CD95 (Fas/APO-1)-μεσολαβούμενη απόπτωση, ενεργοποιείται η κασπάση-8 (FLICE/MACH/Mch5) και οδηγεί σε άμεση ενεργοποίηση άλλων κασπασών. Διερευνώντας την πιθανότητα της δράσης της κασπάσης-8 και μέσω μιτοχονδριακής οδού, χορηγήθηκε ενεργοποιημένη κασπάση-8 σε ένα σύστημα εκχυλίσματος *Xenopus* χωρίς άθικτα κύτταρα αλλά με μιτοχόνδρια. Η κασπάση-8 προώθησε άμεσα τον αποπτωτικό μηχανισμό, οδηγώντας τελικά στην κατάτμηση του DNA και της πυρηνικής μεμβράνης. Σε κυτταρικά εκχυλίσματα στερούμενα μιτοχονδρίων, η κασπάση-8 οδήγησε στην κατάτμηση του DNA, αφήνοντας άθικτες τις πυρηνικές μεμβράνες. Οπότε, τα μιτοχόνδρια θεωρήθηκαν απαραίτητα για την πρόοδο του αποπτωτικού μηχανισμού. Επί απουσίας των μιτοχονδρίων, απαιτούνταν υψηλές συγκεντρώσεις κασπάσης-8 για την ενεργοποίηση των "downstream" κασπασών. Επί παρουσίας των μιτοχονδρίων, το αποτέλεσμα των χαμηλών συγκεντρώσεων κασπάσης-8 ενισχυόταν σημαντικά, μέσω εξαρτώμενης από το κυτόχρωμα-c ενεργοποίησης κασπασών. Η κασπάση-8 προώθησε την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c, διασπώντας τουλάχιστον ένα κυτταροπλασματικό υπόστρωμα. Ο παράγοντας Bcl-2 οδήγησε σε αναστολή της απόπτωσης μόνο στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις κασπάσης-8, εξηγώντας και το γεγονός ότι η CD95-μεσολαβούμενη

απόπτωση μπορεί συχνά και ανθίσταται στην αναστολή από τον Bcl-2 (Kuwana et al., 1998).

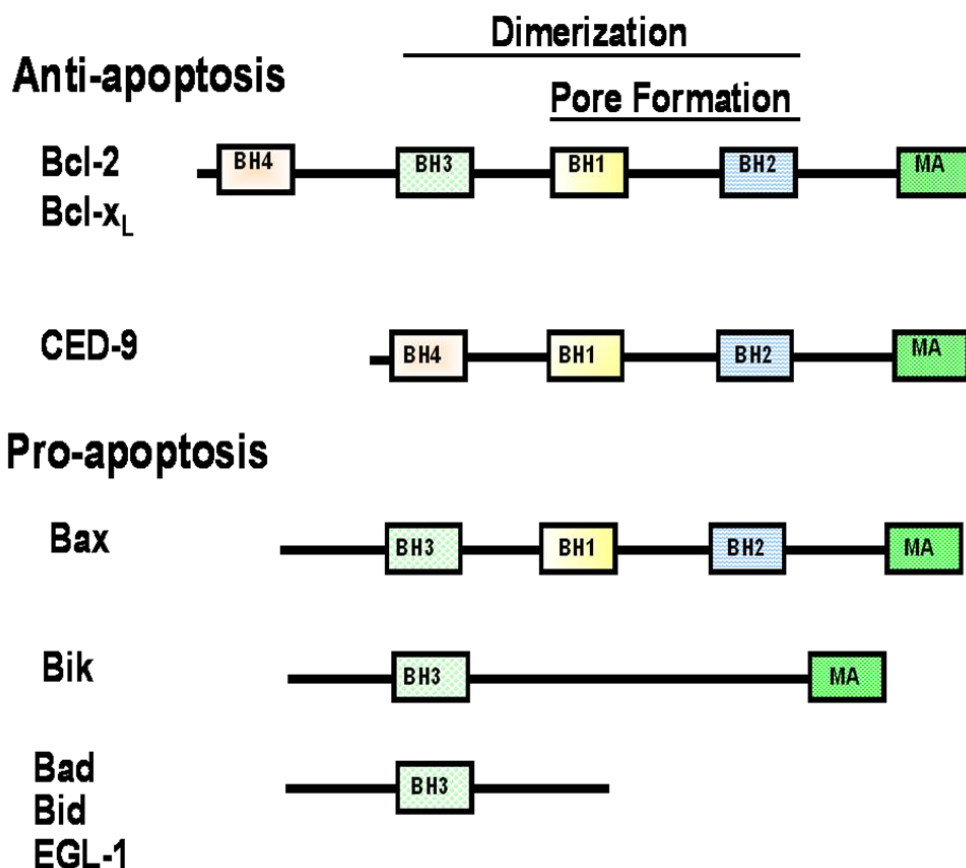
1.7 Ο ρόλος του BCL-2

Τα μέλη της Bcl-2 οικογένειας πρωτεϊνών μπορούν και ρυθμίζουν την ακεραιότητα και τη λειτουργία της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Harris and Thompson, 2000;Kelekar and Thompson, 1998). Η οικογένεια των πρωτεϊνών αυτών μπορεί να διακριθεί σε τρεις ομάδες, με βάση τις Bcl-2 homology (BH) περιοχές και τη λειτουργία τους. Τα αντι-αποπτωτικά μέλη, όπως τα Bcl-2 and Bcl-xL, έχουν τυπικά από BH1 έως και BH4 περιοχές (Σχήμα 8). Τα προ-αποπτωτικά μέλη μπορούν να διαχωριστούν σε δύο ομάδες (Adams and Cory, 2001;Kuwana et al., 2005): αυτά που αποτελούνται από BH1, BH2 και BH3 υπομονάδες, όπως τα Bax και Bak, και αυτά που αποτελούνται μόνο από BH3 περιοχές, όπως τα Bad, Bid και Bim (Σχήμα 8).

Στα πρώιμα στάδια της απόπτωσης, οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax μεταναστεύουν στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και, σχεδόν άμεσα, συγκεντρώνονται σε υπομεμβρανικές διάστικτες εστίες (Nechushtan et al., 2001). Επιπρόσθετα, ο παράγοντας Bak συγκεντρώνεται στις ίδιες εστίες, οπότε μαζί με το Bax προάγει τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, μέσω μεταβολής της μιτοχονδριακής διαπερατότητας, που οδηγεί στην απελευθέρωση μικρών προ-αποπτωτικών μορίων από τον ενδομεμβρανικό χώρο στο κυτταρόπλασμα, ενεργοποιώντας μονοπάτια ενεργοποίησης κασπασών, μέσω κασπασο-εξαρτώμενων και μη μονοπατιών κυτταρικού θανάτου (Donovan and Cotter, 2004). Στα μόρια αυτά συγκαταλέγονται: το κυτόχρωμα-c (Liu et al., 1996), το Smac/Diablo (second mitochondria derived activator of caspase/direct IAP (inhibitor-of apoptosis) binding protein with low pI) (Du et al., 2000), το Omi/HtrA2 (Hegde et al., 2002), ο παράγοντας AIF (apoptosis-inducing factor) (Susin et al., 1999) και η endonuclease G (EndoG) (Li et al., 2001b).

Ο πόρος μεταβολής της μιτοχονδριακής μεμβρανικής διαπερατότητας (membrane permeability transition pore ή PTP) ρυθμίζεται από προ-αποπτωτικές και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως οι Bax, Bak, Bcl-2 και Bcl-xL, μέσω του σχηματισμού του δυναμικο-εξαρτώμενου καναλιού (voltage-dependent anion channel ή VDAC) (Shimizu et al., 1999) και της adenine nucleotide translocator (ANT) (Sugiyama et al., 2002). Οι πρωτεΐνες που

Bcl-2 Family

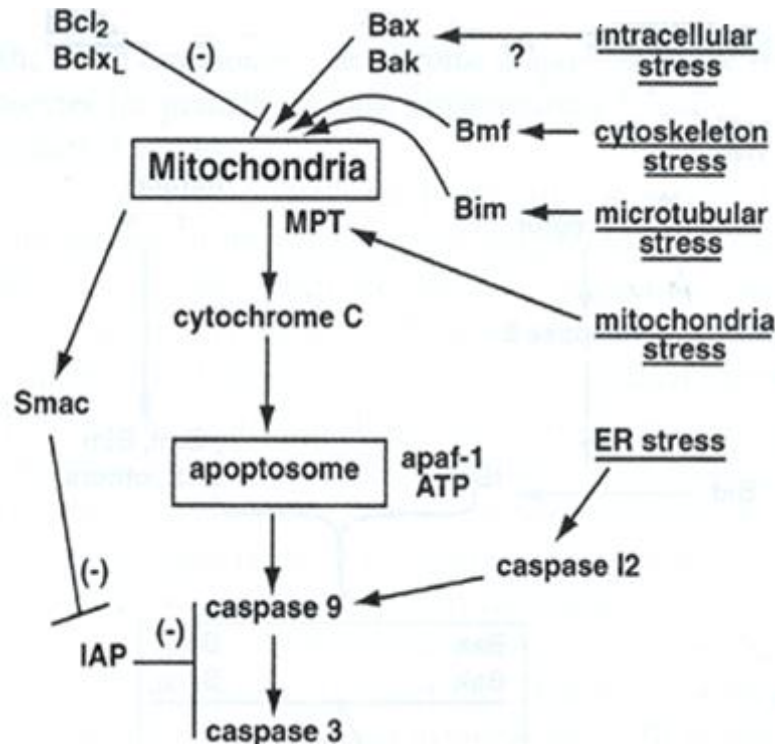


Σχήμα 8. Τα μέλη της Bcl-2 οικογένειας πρωτεϊνών αποτελούνται από όμοιες δομικές υπομονάδες και μπορούν να διαχωριστούν σε προ-αποπτωτικά (που ευνοούν την επαγωγή απόπτωσης) και αντι-αποπτωτικά (που αντιτίθενται στην απόπτωση).

αποτελούνται μόνο από BH3 περιοχές, φαίνεται να επηρεάζουν τα μιτοχόνδρια άμεσα ή μέσω αλληλεπίδρασης με τους παράγοντες Bax (και πιθανώς Bak) (Wei et al., 2001). Φαίνεται ότι ενεργοποιούν τις Bax και Bak έμμεσα, προσδένοντας και εξουδετερώνοντας τα αντι-αποπτωτικά μόρια της Bcl-2 οικογένειας, που διαφορετικά παρεμποδίζουν τις Bax και Bak να διαπεράσουν τη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Τελευταία δεδομένα έδειξαν ότι η αναστολή των Bcl-2 αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών δεν επαρκεί για την έναρξη απόπτωσης, αλλά απαιτεί την ενεργοποίηση των Bax/Bak, με τη μεσολάβηση των Bid ή Bim παραγόντων (Certo et al., 2006) (Σχήμα 9).

Επίσης, ολιγομερή της tBid (τροποποιημένης ή truncated Bid) έχουν αποδειχθεί ικανά να πυροδοτήσουν την απόπτωση, χωρίς το διμερισμό των Bax ή Bak (Grinberg et al.,

2002). Παρά το ότι οι BH3-μόνο περιέχοντες πρωτεΐνες θεωρούνται βασικές για την απόπτωση μέσω μιτοχονδρίων, ο ακριβής μηχανισμός ενεργοποίησης των Bax και Bak χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.



Σχήμα 9. Απεικονίζεται μία σειρά στρεσογόνων παραγόντων ενεργοποίησης του ενδοκυττάριου μονοπατιού επαγωγής της απόπτωσης, μέσω μιτοχονδρίων, καθώς και η θετική και αρνητική ρύθμιση αυτού, ανάλογα με τα μέλη της Bcl-2 υπερικογένειας που συμμετέχουν. (Karlowitz, 2002)

Η σηματοδότηση μέσω ασβεστίου, από το ενδοπλασματικό δίκτυο και/ή το κυτταρόπλασμα προς τα μιτοχόνδρια, είναι μία από τις πιο καθοριστικές κυτταρικές διαδικασίες κατά την προκαλούμενη απόπτωση από μία ποικιλία σημάτων κυτταρικού θανάτου. Το Ca²⁺ είναι παράγοντας κλειδί, τόσο για την κυτταρική επιβίωση όσο και για τον κυτταρικό θάνατο, ως απάντηση σε μια ποικιλία κυτταρικών σημάτων (Giacomello et al., 2007). Η προ-αποπτωτική επίδραση του Ca²⁺ μεσολαβείται από μία ποικιλία ευαίσθητων στο Ca²⁺ παραγόντων, εντοπιζόμενων σε ενδοκυττάρια οργανίδια, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, το κυτταρόπλασμα ή τα μιτοχόνδρια (Nicotera and Orrenius, 1998). Τα ασβεστιο-εξαρτώμενα ερεθίσματα που απαιτούν τους παράγοντες Bax και Bak στο ενδοπλασματικό δίκτυο, επάγουν την απόπτωση μέσω μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, απελευθέρωσης του κυτοχρώματος-c και ενεργοποίησης των κασπασών (Scorrano et al., 2003). Το Bcl-2 έχει αποδειχθεί ότι μεταφέρεται και στο ενδοπλασματικό δίκτυο, έχοντας

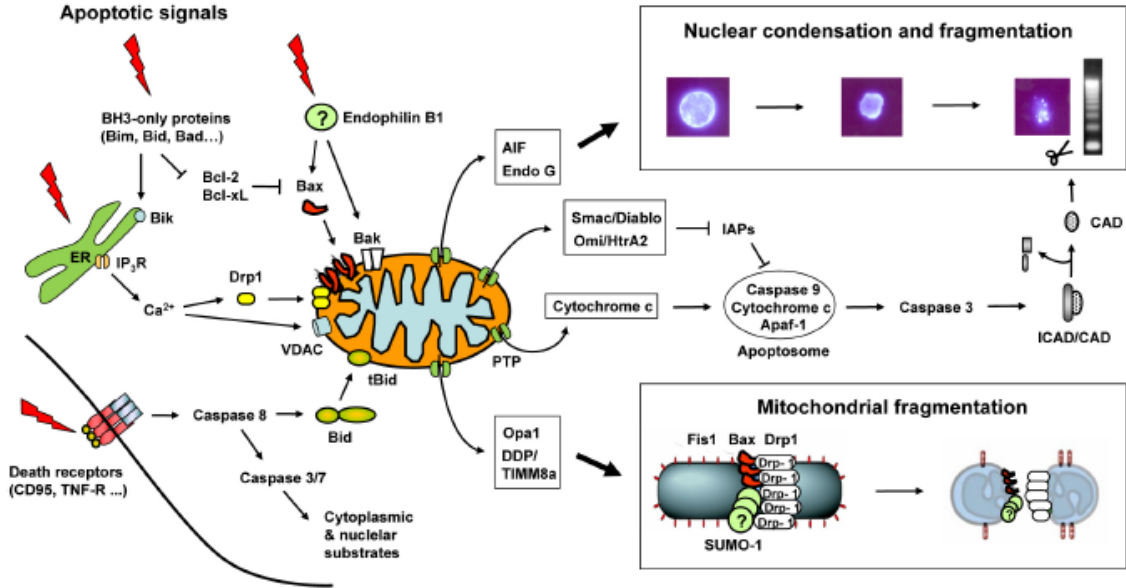
τη δυνατότητα ρύθμισης των επιπέδων του Ca^{2+} , κατά την πορεία του κυτταρικού θανάτου (Pinton et al., 2000). Τα μιτοχόνδρια, επίσης, ρυθμίζουν την ασβεστιο-εξαρτώμενη σηματοδότηση (Berridge et al., 2000), ενώ μέσα στα μιτοχόνδρια το Ca^{2+} ρυθμίζει τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα αφυδρογονάσης, άρα και την παραγωγή ATP. Όταν συγκεντρωθούν μεγάλες ποσότητες Ca^{2+} στη μιτοχονδριακή μήτρα, αυτό επιδρά με την cyclophilin D, ανοίγοντας τον πόρο διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης και οδηγώντας στη μιτοχονδριακή διόγκωση, στη ρήξη της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c (Basso et al., 2005; Zamzami and Kroemer, 2001). Επίσης, η αύξηση του μιτοχονδριακού Ca^{2+} προκαλεί τη δημιουργία άλλων παραγόντων, όπως οι αντιδραστικές ρίζες οξυγόνου και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, που επίσης προωθούν το άνοιγμα του PTP, την απώλεια του ηλεκτρικού δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την περαιτέρω απελευθέρωση Ca^{2+} (Hajnóczky et al., 2006). Ερεθίσματα που οδηγούν στο σχηματισμό inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3), προκαλούν απελευθέρωση Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο και προσλαμβάνεται από τα μιτοχόνδρια (Rizzuto et al., 1993). Η ύπαρξη αμοιβαίων αλληλεπιδράσεων μεταξύ ενδοπλασματικού δικτύου (ER) και μιτοχονδρίων, έχει προταθεί από σειρά πρόσφατων μελετών, πάντα στον κοινό άξονα μελέτης της απόπτωσης (Germain et al., 2005; Heath-Engel et al., 2008; Mathai et al., 2005). Μεταξύ των ευρημάτων αυτών, έχει δειχθεί ότι ο παράγοντας Bik ρυθμίζει την Bax/Bak-εξαρτώμενη απελευθέρωση Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο και την μιτοχονδριακή απόπτωση κατά την πρόκληση κυτταρικού θανάτου από ενδοκυττάριας συνθήκες στρες (Mathai et al., 2005). Σε τελευταία μελέτη έχει δειχθεί, επίσης, ότι η προγραμματισμένη διαδικασία της σύντηξης (fusion) και διάσπασης (fission) των μιτοχονδρίων, ελέγχει τις χωροχρονικές μεταβολές του μιτοχονδριακού Ca^{2+} , και κατά συνέπεια ολόκληρου του κυττάρου (Szabadkai et al., 2004). Οι Ddp1 και hFis1 είναι δύο πρωτεΐνες που αναμειγνύονται στο μηχανισμό διάσπασης των μιτοχονδρίων, δρουν με ασβεστιο-εξαρτώμενους μηχανισμούς και έχουν ανταγωνιστική δράση στο Bcl-2 (Breckenridge et al., 2003; Kong et al., 2005; Szabadkai et al., 2004). Μαζική συγκέντρωση Ca^{2+} στα μιτοχόνδρια, μπορεί να οδηγήσει στο άνοιγμα του PTP και τη συρρίκνωση του οργανιδίου ή στην ανακατασκευή των μιτοχονδριακών ακρολοφιών και τη ρύθμιση της απόπτωσης, δρώντας σε πρωτεΐνες-ρυθμιστές του μιτοχονδριακού σχήματος (Ddp1, Fis1, Opa1, mitofusins 1 and 2).

Τα μιτοχόνδρια είναι δυναμικά οργανίδια που κινούνται διαρκώς, συντήκονται και διαίρουνται (Bereiter-Hahn and Voth, 1994; Cervený et al., 2007; Chan, 2006b), ενώ η

σταθερή τους μορφολογία ελέγχεται με ακρίβεια από συνεχόμενα φαινόμενα σύντηξης (fusion) και διαίρεσης/διάσπασης (Cervený et al., 2007; Karbowski and Youle, 2003). Η δυναμική των μιτοχονδρίων προσελκύει ισχυρά το επιστημονικό ενδιαφέρον, λόγω της σημασίας τους στη διαδικασία της ανάπτυξης και στην παθογένεια πολλών νοσημάτων (Chan, 2006a). Πρόσφατα προτάθηκε ότι η μιτοχονδριακή διάσπαση (fission) έχει σημαντικές φυσιολογικές επιδράσεις σε κυτταρικές λειτουργίες, ιδιαίτερα στην απόπτωση (Cereghetti and Scorrano, 2006; Youle and Karbowski, 2005). Η αύξηση του μηχανισμού της διάσπασης οδηγεί στην μιτοχονδριακή κατάτμηση, που φαίνεται να είναι καθοριστική για τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Cheung et al., 2007). Η κατάτμηση των μιτοχονδρίων επισυμβαίνει στις περισσότερες μορφές αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου και οφείλεται στο μηχανισμό της διάσπασης με/η χωρίς την αναστολή του μηχανισμού της μιτοχονδριακής σύντηξης. Δύο ομάδες πρωτεϊνών έχουν αρχίσει να αναγνωρίζονται ως ρυθμιστές αυτής της διαδικασίας, η Bcl-2 οικογένεια πρωτεϊνών και οι πρωτεΐνες-ρρυθμιστές του μιτοχονδριακού σχήματος (Yoon et al., 2003; Yu et al., 2005; Zhang and Chan, 2007), καθώς και μια ποικιλία άλλων κυτταρικών φαινομένων, όπως η κυτταρική διαίρεση, η μεταβολική ρευστότητα, ο κυτταρικός θάνατος και η διαφοροποίηση (Cervený et al., 2007; Cribbs and Strack, 2007; Wasiak et al., 2007).

Συνοπτικά, φαίνεται ότι στον ενδοκυττάριο μηχανισμό σηματοδότησης της απόπτωσης πρωταγωνιστούν τα μιτοχόνδρια, όπου σειρά ερεθισμάτων (μέσω ενδοπλασματικού δικτύου, ασβεστιο-εξαρτώμενης σηματοδότησης, "BH3-only" πρωτεϊνών και άλλων Bcl-2 πρωτεϊνών), οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c (μέσω του πόρου μεταβολής της διαπερατότητας ή PTP), στο σχηματισμό του αποπτοσώματος και την ενεργοποίηση εκτελεστικών κασπασών (όπως κασπάση-3 και -7). Στον εξωκυττάριο μηχανισμό, ενεργοποιητές των υποδοχέων κυτταρικού θανάτου (CD95, TNF-R κ.ά.) οδηγούν σε άμεση ενεργοποίηση εκτελεστικών κασπασών ή σε ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου μηχανισμού, μέσω μετακίνησης του παράγοντα tBid στα μιτοχόνδρια. Νουκλεάσες απελευθερούμενες από τα μιτοχόνδρια (AIF, endonuclease G) μετακινούνται στον πυρήνα, οι Smac/diablo και Omi/HtrA2 πρωτεΐνες αναστέλλουν τους αποπτωτικούς αναστολείς (IAPs) και DNάσες ενεργοποιούμενες από κασπάσες (caspase-activated DNase/CAD), μετακινούνται στον πυρήνα. Με τη συμβολή και πρωτεϊνικών ρυθμιστών της μιτοχονδριακής διάσπασης, έχουμε τελικά τα χαρακτηριστικά αποπτωτικά γνωρίσματα, την κατάτμηση των μιτοχονδρίων (mitochondrial fragmentation) και το σχηματισμό των

ολιγονουκλεοσωμάτων στον πυρήνα, λόγω συμπύκνωσης της χρωματίνης και εκφύλισης του DNA (nuclear condensation and fragmentation) (Σχήμα 10).



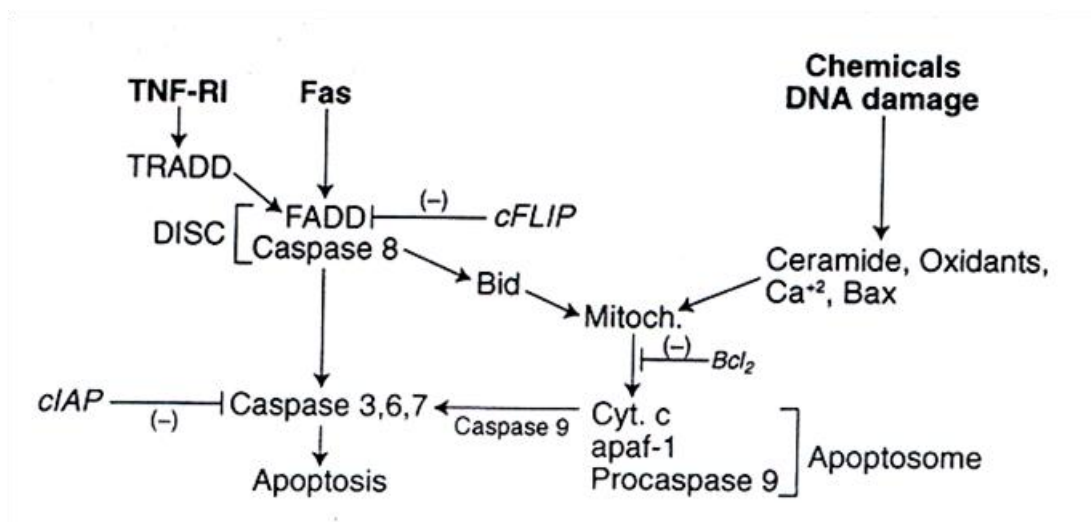
Σχήμα 10. Η απόπτωση είναι αποτέλεσμα ενδοκυττάριου ή εξωκυττάριου μηχανισμού σηματοδότησης. Στον ενδοκυττάριο μηχανισμό πρωταγωνιστούν τα μιτοχόνδρια, όπου σειρά ερεθισμάτων (μέσω ενδοπλασματικού δικτύου, ασβεστιο-εξαρτώμενης σηματοδότησης, "BH3-only" πρωτεϊνών και άλλων Bcl-2 πρωτεϊνών), οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c (μέσω του πόρου μεταβολής της διαπερατότητας ή PTP), στο σχηματισμό του αποπτοσώματος και την ενεργοποίηση εκτελεστικών κασπασών (όπως κασπάση-3 και -7). Στον εξωκυττάριο μηχανισμό, ενεργοποιητές των υποδοχέων κυτταρικού θανάτου (CD95, TNF-R κ.ά.) οδηγούν σε άμεση ενεργοποίηση εκτελεστικών κασπασών ή σε ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου μηχανισμού, μέσω μετακίνησης του παράγοντα tBid στα μιτοχόνδρια. Νουκλεάσες απελευθερούμενες από τα μιτοχόνδρια (AIF, endonuclease G) μετακινούνται στον πυρήνα, οι Smac/diablo και Omi/HtrA2 πρωτεΐνες αναστέλλουν τους αποπτωτικούς αναστολείς (IAPs) και DNάσες ενεργοποιούμενες από κασπάσες (caspase-activated DNase/CAD), μετακινούνται στον πυρήνα. Με τη συμβολή και πρωτεϊνικών ρυθμιστών της μιτοχονδριακής διάσπασης, έχουμε τελικά τα χαρακτηριστικά αποπτωτικά γνωρίσματα, την κατάτμηση των μιτοχονδρίων (mitochondrial fragmentation) και το σχηματισμό των ολιγονουκλεοσωμάτων στον πυρήνα, λόγω συμπύκνωσης της χρωματίνης και εκφύλισης του DNA (nuclear condensation and fragmentation). (Jeong and Seol, 2008)

1.8 Απόπτωση πυροδοτούμενη από εξωκυττάρια σήματα

Οι υποδοχείς θανάτου, TNF receptor-1 (TNFR1), Fas (CD95) και TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), ανήκουν στην tumor necrosis factor receptor (TNFR)

γονιδιακή υπεροικογένεια (Faubion and Gores, 1999) και με τη μεσολάβηση πρωτεϊνών σηματοδότησης, οδηγούν στην ενεργοποίηση των κασπασών (Ashkenazi and Dixit, 1998).

Η κλασική λειτουργία των υποδοχέων κυτταρικού θανάτου αντιπροσωπεύεται από τον Fas (CD95/APO-1) (Nagata and Golstein, 1995), ενώ μετά τη σύνδεση του Fas ligand (Fas L) με τον Fas ή του TNF με τον TNFR1, τροποποιούνται οι υποδοχείς και συνδέονται με την FADD (Fas-associated death domain) ή την TRADD (TNF-receptor associated death domain), αντίστοιχα (Krammer, 1999) (Σχήμα 11). Το άλλο άκρο της FADD περιοχής περιέχει δύο death effector domains (DEDs), που προσλαμβάνουν την κασπάση-8 ή το ενζυματικά αδρανές ομόλογό της, την ανασταλτική του Fas, FLICE inhibitory protein (FLIP).



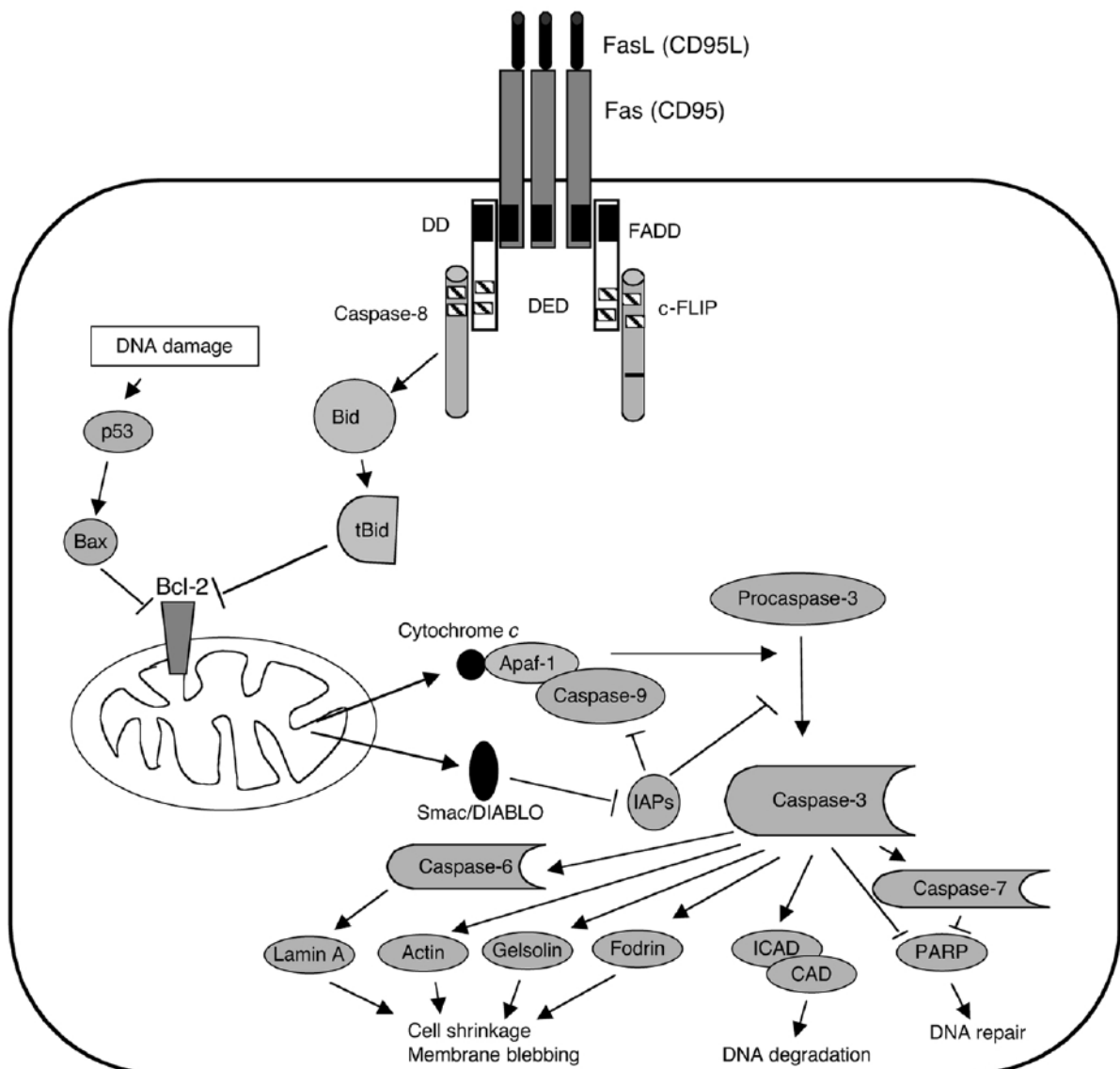
Σχήμα 11. Ο Fas και ο TNF υποδοχέας είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, με τις υπομονάδες-υποδοχείς τους εκτειθέμενες στην επιφάνεια του κυττάρου. Η σύνδεση του συμπληρωματικού ενεργοποιητή θανάτου (death activator), FasL και TNF αντίστοιχα, μεταδίδει ένα σήμα στο κυτταρόπλασμα, που οδηγεί σε ενεργοποίηση της κασπάσης-8, ενώ η κασπάση-8 (όπως η κασπάση-9 στο ενδοκυττάριο μονοπάτι) ξεκινάει έναν καταρράκτη ενεργοποίησης κασπασών, που οδηγεί στην απόπτωση και τελικά φαγοκυττάρωση του κυττάρου. (Karlowitz, 2000a)

Οι FADD-like ICE ανασταλτικές πρωτεΐνες (FLIPs) ομοιάζουν στην προκασπάση-8, πλην μιας καταλυτικής περιοχής, και πιστεύεται ότι λειτουργούν ως αναστολείς ανταγωνιζόμενοι την προκασπάση-8 στη σύνδεση στο FADD. Κατά τη σύνδεση της FADD με την προκασπάση-8, αυτή αυτομετατρέπεται σε ενεργοποιημένη κασπάση-8, μετά πρωτεολυτική κατάτμηση. Το σύμπλεγμα Fas, FADD και προκασπάση-8 αναφέρεται ως

death inducing signal complex (DISC). Η πρόσδεση του TNF στον TNF receptor-1 στρατολογεί την πρωτεΐνη TRADD στον υποδοχέα, με αποτέλεσμα την έναρξη μίας σειράς γεγονότων ενδοκυττάριας σηματοδότησης (Hsu et al., 1996;Hsu et al., 1995). Για την έναρξη της σηματοδότησης του κυτταρικού θανάτου είναι απαραίτητη η στρατολόγηση από τον TRADD παράγοντα, της FADD πρωτεΐνης και της κασπάσης-8, που θα σχηματίσουν το DISC (death-inducing signaling complex) (Hsu et al., 1996;Muzio et al., 1996).

Παρά το ότι ο σχηματισμός του DISC έχει θεωρηθεί ως μία διαδικασία που επισυμβαίνει στην κυτταρική μεμβράνη, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι DISC συμπλέγματα σχηματίζονται μέσα στο κύτταρο, μετά την εσωτερίκευση της εμπριέχουσας τον υποδοχέα, μεμβρανικής περιοχής, μέσω ενδοκύττωσης μεσολαβούμενης από κλαθρίνη (Micheau and Tschopp, 2003;Schneider-Brachert et al., 2004). Ο σχηματισμός, όμως, του αρχικού συμπλέγματος υποδοχέα που περιέχει την TRADD, αλλά όχι την FADD και την κασπάση-8, μπορεί να στρατολογήσει τον παράγοντα TRAF2 και την πρωτεΐνη RIP, ενεργοποιώντας τους αντι-αποπτωτικούς παράγοντες NF-κB και c-Jun, αντίστοιχα (Micheau and Tschopp, 2003). Το μεμβρανικό αυτό σύμπλεγμα μπορεί να σχηματιστεί χωρίς διαδικασία μεμβρανικής εσωτερίκευσης, όπως έχει δειχθεί με τη χρήση TNF-υποδοχέα με αδυναμία εσωτερίκευσης. Το σύμπλεγμα αυτό δεν ευθύνεται για την έναρξη διαδικασίας απόπτωσης (Micheau and Tschopp, 2003;Schneider-Brachert et al., 2004).

Η ενεργοποίηση της προκασπάσης-8 μέσω του σχηματισμού του συμπλέγματος DISC, πυροδοτεί την έναρξη μονοπατιών ενδοκυττάριας σηματοδότησης, εξαρτώμενων και μη από τα μιτοχόνδρια. Στα ανεξάρτητα των μιτοχονδρίων μονοπάτια σηματοδότησης, η κασπάση-8 μπορεί να ενεργοποιήσει άμεσα την προκασπάση-3 στην ενεργό μορφή της (κασπάση-3), γεγονός που θεωρείται επαρκές για την πρόκληση κυτταρικού θανάτου, στα λεγόμενα τύπου I κύτταρα, όπως τα BJAB και SKW6.4 (Scaffidi et al., 1998). Στα αναφερόμενα, όμως, ως τύπου II κύτταρα, όπως τα κύτταρα Jurkat ή τα ηπατοκύτταρα, η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 δε φαίνεται να επαρκεί για την ενεργοποίηση των "downstream" κασπασών, αλλά απαιτείται η μεσολάβηση μιτοχονδριακής βλάβης, για την πλήρη ενεργοποίησή τους (Scaffidi et al., 1998;Yin et al., 1999). Παρά ταύτα, η κασπάση-8, μπορεί και προκαλεί μιτοχονδριακή βλάβη, μέσω της διάσπασης του παράγοντα Bid στη μορφή tBid (truncated Bid), η οποία μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια, όπου και προκαλεί την εκροή πρωτεϊνών που προάγουν τον κυτταρικό θάνατο, όπως το κυτόχρωμα-c (Kim et al., 2000;Luo et al., 1998) (Σχήμα 12).



Σχήμα 12. Η πρόσδεση του FasL συνδέτη στον Fas υποδοχέα, ενεργοποιεί το εξωκυττάριο μονοπάτι σηματοδότησης, όπου η ενεργοποίηση της κασπάσης-8, μέσω του παράγοντα tBid (truncated Bid), θα οδηγήσει στην ενεργοποίηση της ενδοκυττάριας οδού. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c θα οδηγήσει στο σχηματισμό του αποπτοσώματος, στην ενεργοποίηση της κασπάσης-9 (επί παρουσίας dATP) και στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3, ενώ η αναστολή των IAPs από τον Smac/DIABLO θα ενισχύσει το φαινόμενο. Η κασπάση-3, ενεργοποιώντας και άλλες εκτελεστικές κασπάσες (-6, -7) θα οδηγήσει στη διάσπαση μίας σειράς πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού και στην εκφύλιση του DNA (Budd, 2002).

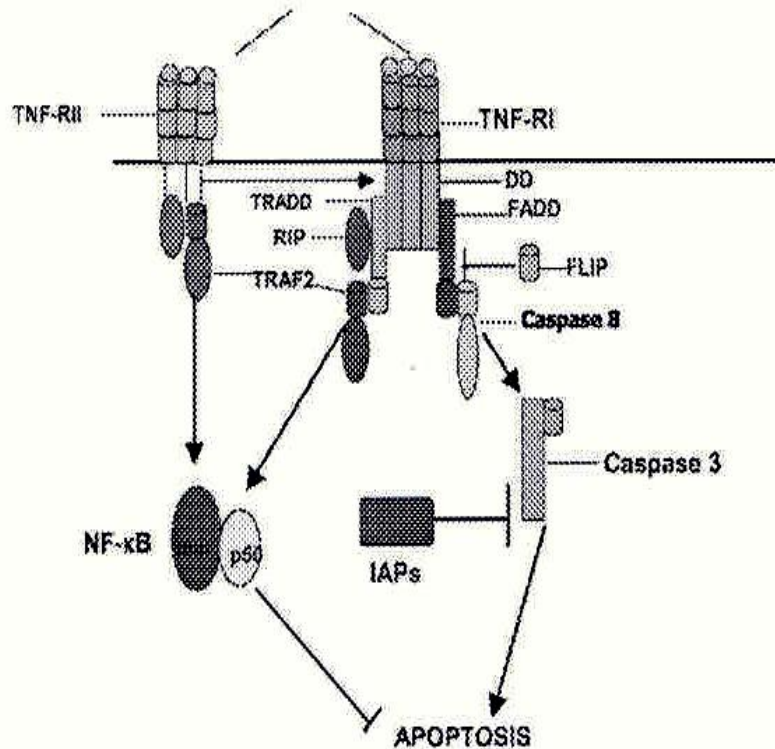
Οι συνδέτες TRAIL και FasL θεωρούνται "επαγγελματίες" συνδέτες υποδοχέων κυτταρικού θανάτου, έχοντας περιορισμένη δυνατότητα ενεργοποίησης του αντι-αποπτωτικού παράγοντα NF-κB, αλλά προκαλώντας απόπτωση προσδενόμενοι στους

συγγενείς υποδοχείς τους, DR4/DR5 και Fas, αντίστοιχα (Itoh et al., 1991; Kim and Seol, 2003; LeBlanc and Ashkenazi, 2003; Nagata and Golstein, 1995; Suda et al., 1993; Wang and El-Deiry, 2003). Όπως φαίνεται στη σηματοδότηση μέσω του TNF-R1, ο Fas μεταβιβάζει επίσης μηνύματα επαγωγής κυτταρικού θανάτου, μέσω σχηματισμού του συμπλέγματος DISC (Chinnaiyan et al., 1995; Marsters et al., 1996; Muzio et al., 1996). Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι ο σχηματισμός του DISC σχετίζεται άμεσα με την εσωτερίκευση του υποδοχέα μέσω κλαθρίνης και σχετικών με αυτή πρωτεϊνών στα τύπου I κύτταρα, αλλά όχι στα τύπου II (Lee et al., 2006). Οι Lee και συνεργάτες έδειξαν ότι στα τύπου I κύτταρα, ο σχηματισμός του DISC επισυμβαίνει μετά από εσωτερίκευση του Fas μέσω ενδοκύττωσης, εξαρτώμενης από κλαθρίνη, όπως επίσης ότι το μεμβρανικό σύμπλεγμα στην επιφάνεια της μεμβράνης δε μπορεί να εσωτερικεύσει τον Fas υποδοχέα, ο οποίος εναλλακτικά ενεργοποιεί αντιαποπτωτικά μονοπάτια (μέσω Erk και NF-κB) (Lee et al., 2006).

Η ceramide αποτελεί παράδειγμα ουσίας που εμπλέκεται στον κυτταρικό θάνατο μέσω των CD95 και TNF, ωστόσο και μόνη της μπορεί να επάγει απόπτωση σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Cifone et al., 1994; Mathias and Kolesnick, 1993). Επίσης, διάφορες άλλες πρωτεΐνες που επιδρούν στις κυτταροπλασματικές υπομονάδες των CD95 και TNF υποδοχέων (p55 TNF-R1 και p75 TNF-R2) έχουν ενδιάμεσο σηματοδοτικό ρόλο. Σε αυτές ανήκουν οι προαναφερθέντες FADD, RIP και TRADD, που φέρουν "περιοχές θανάτου" ("death domains"), ομοιάζουσες με αυτές του CD95 και p55 TNF υποδοχέα, ενώ η υπερέκφραση αυτών είναι δυνατόν να επάγει κυτταρική απόπτωση (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995; Hsu et al., 1995; Stanger et al., 1995) ακόμα και επί απουσίας CD95 συνδέτη ή TNF, αντίστοιχα. Η πρόσδεση του TNF στον TNF-R2 (p75) μπορεί επίσης να επάγει απόπτωση, παρά το ότι δεν εμπεριέχει death domain (Grell et al., 1994; Heller et al., 1992; Zheng et al., 1995) (Σχήμα 13). Η κυτταροπλασματική περιοχή του TNF-R2 συνδέεται με παράγοντες, όπως οι TRAF1 και TRAF2, που απαιτούνται για την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα από τον TNF-R2 (Rothe et al., 1995; Rothe et al., 1994). Η επαγωγή απόπτωσης από τον CD95 συνδέτη ή τον TNF, ή από υπερέκφραση των TRADD πρωτεϊνών, μπλοκάρεται αποτελεσματικά από τον παράγοντα Bcl-2 σε ορισμένα κύτταρα, ενώ σε άλλα όχι (Hsu et al., 1995; Itoh et al., 1993; Strasser et al., 1995; Vanhaesebroeck et al., 1993), αναδεικνύοντας το ότι εναλλακτικά μονοπάτια μπορεί να ενεργοποιούνται από αυτούς τους παράγοντες, ανάλογα με την κυτταρική σειρά.

Μία πρωτεϊνική οικογένεια αντι-αποπτωτικών ρυθμιστικών, γνωστές ως πρωτεΐνες αναστολές της απόπτωσης (inhibitor of apoptosis proteins ή IAPs), μπλοκάρουν τον

κυτταρικό θάνατο, ως απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα (Varfolomeev and Vucic, 2008). Οι IAPs περιλαμβάνουν τις NAIP, cIAP1, cIAP2, X-IAP και την survivin (Beg and Baltimore, 1996; Chu et al., 1997; Wang et al., 1998a). Οι IAPs αναστέλλουν τις εκτελεστικές κασπάσες-3 και -7, αλλά όχι την "εναρκτήρια" κασπάση-8 (Roy et al., 1997). Επίσης, φαίνεται να ρυθμίζουν τα αντι-αποπτωτικά μονοπάτια του NF-κΒ (Varfolomeev and Vucic, 2008).



Σχήμα 13. Το TNF-receptor-I και -II σηματοδοτικό μονοπάτι, μετά από σύνδεση με TNF. DD: death domain, FADD: Fas-associated death domain, RIP: receptor interactive protein, TRADD: TNF-receptor-associated death domain, TRAF-2: TNF-receptor associated factor-2, IAP: inhibitor of apoptosis protein, FLIP: Flice-inhibitory protein.

Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η cIAP2, που έχει δειχθεί ότι αποσταθεροποιεί τον παράγοντα IκΒ, ενεργοποιώντας την αντι-αποπτωτική δράση του NFκΒ (Chu et al., 1997). Οι cIAP1 and c-IAP2 αναστέλλουν, ακόμα, τον TNF-διεγερόμενο κυτταρικό θάνατο, εμποδίζοντας το σχηματισμό του TNF-R1 προαποπτωτικού σηματοδοτικού συμπλέγματος. Το αποτέλεσμα της δράσης των IAPs φαίνεται σε ιούς, οι οποίοι παράγουν αναστολείς κασπασών, ανατρέποντας τον ανοσολογικά προκαλούμενο θάνατο των μολυσμένων με ιό

κυττάρων. Τέλος, ως βασικοί ρυθμιστές της απόπτωσης, έχουν αποτελέσει στόχο θεραπευτικών παρεμβάσεων (Varfolomeev and Vucic, 2008).

1.9 Ρύθμιση της απόπτωσης μέσω μεταγραφικών παρεμβάσεων

Αν και η τελική ενεργοποίηση των κασπασών γίνεται μετα-μεταφραστικά, μερικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην τελική τους ενεργοποίηση ρυθμίζονται από μεταγραφικές τροποποιήσεις. Για παράδειγμα, βλάβη στο DNA προκαλούμενη από ακτινοβολία, οδηγεί σε αύξηση του p53, ενός μεταγραφικού παράγοντα που μπορεί μετά να επάγει τον κυτταρικό θάνατο (Clarke et al., 1993;Lowe et al., 1993;Yonish-Rouach et al., 1991). Η απορρύθμιση, επίσης, ενός ογκογόνου μεταγραφικού παράγοντα, του c-Myc, μπορεί να επάγει την απόπτωση σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές (Askew et al., 1991;Evan et al., 1992). Μερικά σήματα μπορούν να οδηγήσουν στην απόπτωση, επί παρουσίας κυκλοεξιμίδης (cycloheximide), ενός μεταφραστικού αναστολέα, ή ακτινομυκίνης-D, ενός αναστολέα της μεταγραφής, ενώ μόνοι τους οι παράγοντες αυτοί μπορούν να διεγείρουν την απόπτωση πολλών κυτταρικών σειρών (Martin et al., 1990). Από την άλλη μεριά, μερικές περιπτώσεις απόπτωσης, μέσω απομάκρυνσης παραγόντων ανάπτυξης (growth factors), μπορεί να μπλοκαριστούν από την cycloheximide, όπως στην περίπτωση της απομάκρυνσης του νευρικού παράγοντα ανάπτυξης (nerve growth factor) από καλλιέργειες πρωτογενών νευρώνων ή PC-12 κυττάρων (Martin et al., 1988). Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι, σε αυτά τα κύτταρα, η απόσυρση των παραγόντων ανάπτυξης, ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων υπεύθυνων για τη σηματοδότηση του κυτταρικού θανάτου. Σε άλλες κυτταρικές σειρές, όπως στην interleukin-3 εξαρτώμενη FDC-P1 αιμοποιητική κυτταρική σειρά, η cycloheximide δεν μπλοκάρει την απόπτωση λόγω απομάκρυνσης παραγόντων ανάπτυξης, αλλά αντίθετα την ενισχύει (Vaux and Weissman, 1993). Στην περίπτωση αυτή οι παράγοντες ανάπτυξης φαίνεται να διατηρούν σταθερά τα επίπεδα μιας πρωτεΐνης, υπεύθυνης για την παρεμπόδιση της επέλευσης κυτταρικού θανάτου. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι διαφορετικά ερεθίσματα, ενεργοποιούν διαφορετικά διακριτά μονοπάτια, που συνθέτουν έναν κοινό μηχανισμό κυτταρικού θανάτου. Η σηματοδότηση του κυτταρικού θανάτου προκαλείται από ποικιλία μονοπατιών μεταβίβασης του σήματος, με τη μεσολάβηση είτε εξωκυττάρων παραγόντων είτε ενδοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων τυροσινικών κινάσεων, υποδοχέων στεροειδών, της ceramide, των φωσφορικών ενώσεων ινοσιτόλης (inositol phosphates) και των κυτταροκινικών υποδοχέων. Για παράδειγμα, με

την ενεργοποίηση του αντιγονικού υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων, μεταβιβάζονται σήματα ενδοκυττάρια, που οδηγούν στην ενεργοποίηση των κυττάρων και στην έκφραση του *c-myc*. Επακολουθεί θετική ρύθμιση του CD95 και του συνδέτη του, με την έκφρασή τους ενδοκυττάρια. Με παρακρινή και αυτοκρινή τρόπο, το ένα μόριο δρα με το άλλο και επάγει το σηματοδοτικό μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου (Alderson et al., 1995).

1.10 Απόπτωση και καρκίνος

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των ανθρώπινων καρκινωμάτων είναι η εγγενής ή επίκτητη αντοχή στην απόπτωση. Η υπεκφυγή της απόπτωσης μπορεί να συμβάλλει στην καρκινογένεση, την ανάπτυξη ενός όγκου και στην αντοχή του στη θεραπεία, ενώ οι περισσότερες σύγχρονες θεραπείες, συμπεριλαμβανομένης της χημειοθεραπείας, της ακτινοθεραπείας και της ανοσοθεραπείας, αποσκοπούν στην ενεργοποίηση των ενδοκυττάρων μονοπατιών σηματοδότησης θανάτου των καρκινικών κυττάρων, κυρίως με τον μηχανισμό της απόπτωσης. Η καλύτερη κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών αντίστασης των καρκινικών κυττάρων στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, αναμένεται να προσφέρει τη δυνατότητα ανάπτυξης στοχευμένων μοριακών θεραπευτικών παρεμβάσεων (Fulda, 2009). Καθημερινά, ο ανθρώπινος οργανισμός εξολοθρεύει εκατομμύρια "ανεπιθύμητων" κυττάρων, με το μηχανισμό της απόπτωσης. Η απόπτωση αποτελεί ένα σημαντικό φράγμα έναντι της εμφάνισης καρκίνου, αν και συγκεκριμένες μεταλλάξεις καθιστούν τα καρκινικά κύτταρα ικανά στην υπεκφυγή της απόπτωσης, αυξάνοντας το βαθμό κακοήθειάς τους.

Διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούν οι ιοί, με σκοπό την αποφυγή της απόπτωσης των κυττάρων που έχουν προσβάλλει. Ένας εκ των ιών του ανθρώπινου θηλώματος, που ευθύνονται για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, παράγει μία πρωτεΐνη (E6), που απενεργοποιεί τον ενισχυτή απόπτωσης (apoptosis promoter) p53, συνδεδεμένη με αυτόν. Ο ιός Epstein-Barr (EBV), μία από τις αιτίες του λεμφώματος Burkitt (Burkitt's lymphoma) παράγει μία πρωτεΐνη παρόμοια με την Bcl-2, ενώ με μία επιπλέον πρωτεΐνη οδηγεί το κύτταρο στο να αυξήσει τη δική του παραγωγή σε Bcl-2. Και οι δύο αυτές ενέργειες καθιστούν το κύτταρο ανθεκτικό στην απόπτωση.

Μερικές λευχαιμίες B-λεμφοκυττάρου και λεμφώματα εκφράζουν υψηλά επίπεδα της Bcl-2 πρωτεΐνης, οπότε μπλοκάρουν τα σήματα απόπτωσης που μπορεί να λαμβάνουν. Κύτταρα μελανώματος αποφεύγουν την απόπτωση, αναστέλλοντας την έκφραση του

γονιδίου που κωδικοποιεί την Araf-1 πρωτεΐνη. Μερικά καρκινικά κύτταρα, ειδικά πνεύμονα και εντέρου, εκκρίνουν υψηλά επίπεδα ενός διαλυτού μορίου-δολώματος (soluble "decoy" molecule), που συνδέεται στο FasL, δεσμεύοντάς το, ώστε να μη μπορεί να συνδεθεί με τον Fas υποδοχέα, οπότε και τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα δε μπορούν να εξουδετερώσουν τα καρκινικά κύτταρα. Άλλα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα του FasL και μπορούν να εξουδετερώσουν οποιοδήποτε κυτταροτοξικό T-λεμφοκύτταρο (CTL) που προσπαθεί να τα σκοτώσει, επειδή τα CTL εκφράζουν επίσης το Fas (αλλά προστατεύονται από το δικό τους FasL).

Η χρήση συνθετικών αγωνιστών έναντι προ-αποπτωτικών υποδοχέων (pro-apoptotic receptor agonists ή PARAs), όπως ο συνδέτης human protein apoptosis ligand 2/TNF-related apoptosis-inducing ligand (Apo2L/TRAIL), που θα χορηγούνται μόνοι ή σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες, αναμένεται να εξουδετερώνει τους μηχανισμούς αναστολής της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων και να τα οδηγεί σε αυτοκαταστροφή μέσω απόπτωσης (Ashkenazi, 2008).

1.11 Απόπτωση και κασπάσες

Παρά το ότι τα ερεθίσματα που οδηγούν στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο είναι τελείως διαφορετικά, οδηγούν σε ένα κοινό εκτελεστικό μονοπάτι. Τα συστατικά του πυρήνα στην κυτταρική "αυτοκτονία" ανακαλύφθηκαν πρωταρχικά χρησιμοποιώντας το *Caenorhabditis elegans* σαν συστηματικό μοντέλο (Ellis and Horvitz, 1986). Από γενετικές μελέτες αναγνωρίστηκαν δύο γονίδια που είναι απαραίτητα για την προώθηση της απόπτωσης, τα *ced-3* και *ced-4*, καθώς και ένα γονίδιο που είναι απαραίτητο για την αναστολή της, το *ced-9* (Ellis and Horvitz, 1986). Πανομοιότυπα αυτών των γονιδίων έχουν ανακαλυφθεί σε ανώτερους οργανισμούς και συγκροτούν γονιδιακές οικογένειες σημαντικές για τον κυτταρικό θάνατο. Τα Ced-3 ομόλογα σχηματίζουν την οικογένεια των κασπασών, το ομόλογο της Ced-4 αντιπροσωπεύεται από την Araf-1 πρωτεΐνη και ομόλογα του Ced-9 σχηματίζουν την Bcl-2 πρωτεϊνική οικογένεια (Ellis and Horvitz, 1986).

Έως τώρα, 14 ομόλογα θηλαστικών του Ced-3 συγκροτούν μια οικογένεια κυστεϊνο-πρωτεασών ειδικών για ασπαρτικό, η οποία αποτελεί την οικογένεια των κασπασών. Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες που περιέχουν κυστεΐνη και προσκολλώνται σε κατάλοιπα ασπαρτικού. Το όνομα caspase προέρχεται από τις λέξεις cysteine-dependent aspartate-

specific protease (Alnemri et al., 1996), οπότε και η ενζυμική τους δυνατότητα χαρακτηρίζεται από μία ειδικότητα υποστρωμάτων, που περιέχουν Asp, αλλά και από τη χρήση μίας Cys285 πλευρικής αλυσίδας για την κατάλυση της διάσπασης του πεπτιδικού δεσμού.

Οι κασπάσες είναι ζυμογόνα που ενεργοποιούνται με πρωτεολυτική κατάτμηση. Συντίθενται δηλαδή ως ανενεργές πρόδρομες μορφές, που απαιτούν βιοχημική μετατροπή για την ενεργοποίησή τους, έχοντας χαμηλή εγγενή ενζυματική δραστηριότητα (Thornberry and Lazebnik, 1998). Έχουν αυστηρά περιορισμένα υποστρώματα, αντίθετα με άλλες πρωτεάσες, που αποθηκεύονται στα λυσοσώματα ή ενεργοποιούνται στο κυτταρόπλασμα από ασβέστιο και έχουν ευρύ φάσμα μη ειδικών υποστρωμάτων. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει αποδείξει τον καθοριστικό ρόλο των κασπασών στην απόπτωση. Η ενεργοποίηση των κασπασών έχει συσχετιστεί με την έναρξη απόπτωσης, ενώ η αναστολή τους με εξασθένηση του φαινομένου (Bump et al., 1995;Cohen, 1997;Nicholson and Thornberry, 1997;Tewari et al., 1995). Μεταλλαγμένα στελέχη του *C. elegans* που εμφανίζουν έλλειψη της CED-3, εμφανίζουν και παντελή έλλειψη του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που απαιτείται για την ανάπτυξή τους (Ellis and Horvitz, 1986). Τις ίδιες συνέπειες έχει η έλλειψη της κασπάσης -3, -8 ή -9 σε ζώα, που γι'αυτό το λόγο πεθαίνουν περιγεννητικά (Green, 1998;Varfolomeev et al., 1998). Ποντίκια με έλλειψη κασπάσης-2 αναπτύσσονται φυσιολογικά, αλλά ανάλογα με τον εξεταζόμενο ιστό, άλλα κύτταρα εμφανίζουν ελαττωμένη και άλλα αυξημένη απόπτωση (Bergeron et al., 1998). Όσοι, επίσης, έχουν μεταλλαγμένη κασπάση-8 [R175b(248)W], παράλληλα με την εμφάνιση ελαττωματικής απόπτωσης στα λεμφοκύτταρά τους, έχουν και σοβαρό πρόβλημα ενεργοποίησής τους, οπότε και εμφανίζουν ανοσοανεπάρκεια (Chun et al., 2002). Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι η έλλειψη της κασπάσης-8 είναι συμβατή με την ανθρώπινη ανάπτυξη, παρά το ότι είναι προγεννητικά θανατηφόρος στα ποντίκια (Varfolomeev et al., 1998). Οπότε και φαίνεται ότι η κασπάση-8, αλλά και η κασπάση-10, έχουν διακριτές λειτουργίες στους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς, αναδεικνύοντας τελικά την μεγάλη αλληλεπικάλυψη και ποικιλία στη δράση και τη λειτουργία των κασπασών.

Κατά την πρόοδο της απόπτωσης, οι κασπάσες ενεργοποιούνται διαδοχικά και διασπούν διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες, βασικές για την κυτταρική ανάπτυξη. Τα υποστρώματα των κασπασών εντοπίζονται διάσπαρτα τόσο στον πυρήνα, όσο και στο κυτταρόπλασμα και στον κυτταροσκελετό. Η ενεργοποίηση των κασπασών αποτελεί το τελικό αποτέλεσμα τόσο φυσιολογικών όσο και παθολογικών ερεθισμάτων. Στις

παθολογικές διεγέρσεις περιλαμβάνονται η βλάβη των κυτταρικών μεμβρανών, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ή η δυσλειτουργία άλλων ενδοκυττάρων οργανιδίων και του DNA. Διάφοροι διακριτοί παράγοντες είναι γνωστοί ως τμήμα ενδοκυττάρων μονοπατιών, που συνδέουν τη βλάβη ενδοκυττάρων τμημάτων με την απόπτωση, όπως: η ceramide, η διαταραχή του διαμεμβρανικού μιτοχονδριακού δυναμικού και η ενεργοποίηση του p53. Άλλα ερεθίσματα σηματοδοτούν μέσω κυτταροκινικών υποδοχέων (όπως ο Fas/APO-1/CD95 και οι TNFR1 και II) ή μεταγραφικών παραγόντων (όπως p53, IRF-1 και rb). Ο μετασχηματισμός των διεγέρσεων αυτών σε ενεργοποίηση των κασπασών, γίνεται μέσω ρύθμισης από μία μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών (την bcl-2 οικογένεια).

Με βάση τη δομή και τη λειτουργία τους, οι κασπάσες μπορούν να χωριστούν σε τρεις ομάδες (Thornberry and Lazebnik, 1998):

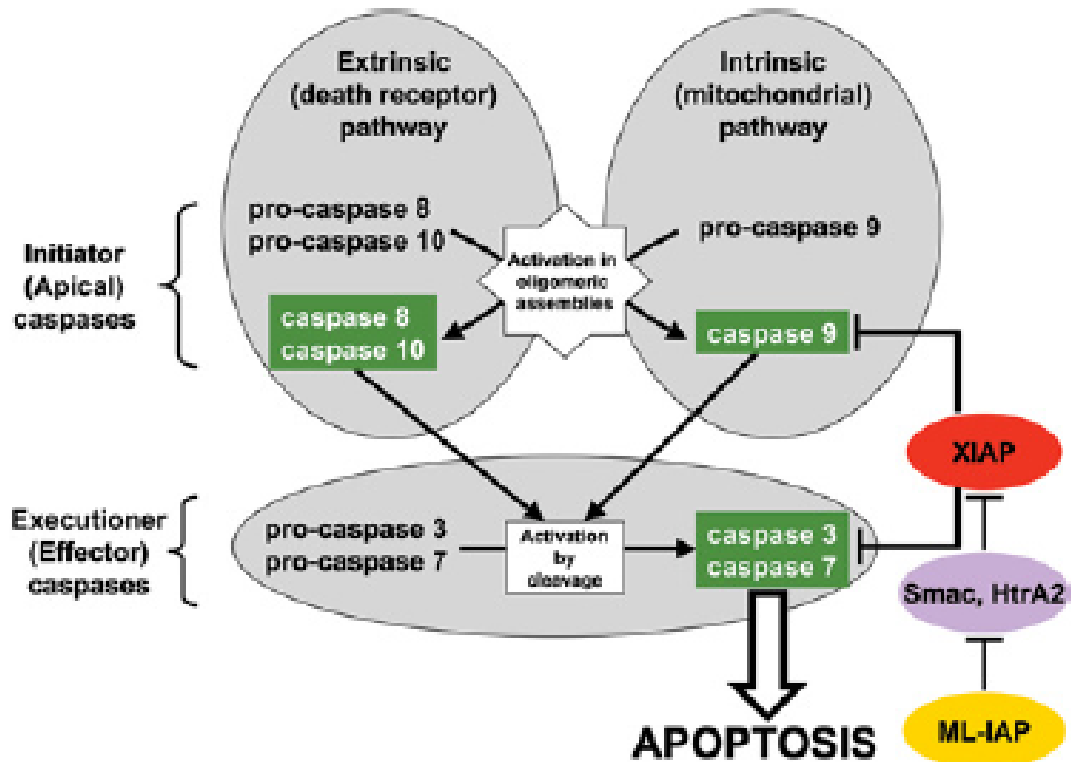
1. Interleukin converting enzyme (ICE)-like κασπάσες, που εμπλέκονται στην παραγωγή κυτταροκινών (π.χ. κασπάσες -1, -4, -5, -13),
2. "Σηματοδότες θανάτου" (death signaling) ή εναρκτήριες κασπάσες (initiator/apical caspases), που δεσμεύονται σε προσαρμοστικές πρωτεΐνες (adaptors proteins) και προωθούν, αλλά δεν προκαλούν άμεσα θάνατο (π.χ. κασπάσες -2, -8, -9, -10). Αντίθετα, ενεργοποιούν τις "εκτελεστικές" κασπάσες (executioner/effector caspases) (Σχήμα 14).
3. "Εκτελεστικές" ή effector κασπάσες (π.χ. κασπάσες -3, -6, -7) (Σχήμα 14).

1.12 Δομή κασπασών

Η πρώτη προσέγγιση της δομής των κασπασών έγινε το 1994 (Walker et al., 1994a; Wilson et al., 1994a), παρουσιάζοντας μία νέα πρωτεϊνική οικογένεια, με χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή και συγκεκριμένο μηχανισμό ενεργοποίησης. Η διασαφήνιση, με την πάροδο των ετών, της δομής των κασπασών, ανασταλτών τους και συμπλεγμάτων αναστολής τους, οδήγησε στην ενίσχυση της θεωρίας της καταλυτικής δραστηριότητας των κασπασών, αλλά ανέτρεψε πολλές θεωρίες ρύθμισης και ενεργοποίησής τους.

Ανάλυση αλληλουχιών και κρυσταλλογραφία με ακτίνες-χ, αποδεικνύουν ότι όλες οι κασπάσες έχουν μία κοινή δομή (Cohen, 1997; Humke et al., 1998; Martinon et al., 2002a; Nicholson and Thornberry, 1997; Reed et al., 2003; Thornberry et al., 1997; Van de Craen et al., 1997; Wang et al., 1998b). X-ray δομές έχουν προσδιοριστεί για τις ώριμες μορφές της κασπάσης -1 (Walker et al., 1994a; Wilson et al., 1994a), της κασπάσης-2

(Schweizer et al., 2003), της κασπάσης-3 (Mittl et al., 1997;Riedl et al., 2001;Rotonda et al., 1996), της κασπάσης-7 (Chai et al., 2001a;Huang et al., 2001;Wei et al., 2000), της κασπάσης-8 (Blanchard et al., 1999) και της κασπάσης-9 (Renatus et al., 2001).



Σχήμα 14. Με τη σύνδεση των κατάλληλων συνδετών και την τροποποίηση των υποδοχέων τους, ενεργοποιούνται οι εναρκτήριες κασπάσες -8 και -10. Αυτές άμεσα διασπούν και ενεργοποιούν τις εκτελεστικές κασπάσες -3 και -7 (και πιθανώς την -6), που θεωρούνται υπεύθυνες για την αποπτωτική μορφολογία του κυττάρου. Γενετικές βλάβες, μέσω απελευθέρωσης του κυτοχρώματος-c, ενεργοποίησης της εναρκτήριας κασπάσης-9 και της APAF-1, οδηγούν στο ίδιο εκτελεστικό μονοπάτι. Η XIAP ανασταλτική πρωτεΐνη της ενεργού κασπάσης-9 και οι IAPs (inhibitory apoptosis proteins ή πρωτεΐνες αναστολές της απόπτωσης), υπό τον έλεγχο των Smac/DIABLO και HtrA2, ρυθμίζουν την εκτελεστική φάση της δράσης των κασπασών. Το συγκεκριμένο μοντέλο απόπτωσης, αν και εμφανίζει παραλλαγές, θεωρείται κοινό στην πλειοψηφία των κυττάρων των θηλαστικών. (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004)

Κάθε ζυμογόνο εμπεριέχει μία αμινοτελική περιοχή (N-terminal pro-domain), μία μεγάλη υπομονάδα (20 kDa, p20) που περιλαμβάνει το ενεργό κέντρο κυστεΐνης, σε ένα διατηρημένο μοτίβο QACXG (Πίνακας 3), καθώς και μία μικρή περιοχή καρβοξυτελική

(10 kDa, p10). Οι ενεργές περιοχές και τα εναλλακτικά ονόματα των κασπασών φαίνονται στον πίνακα 3.

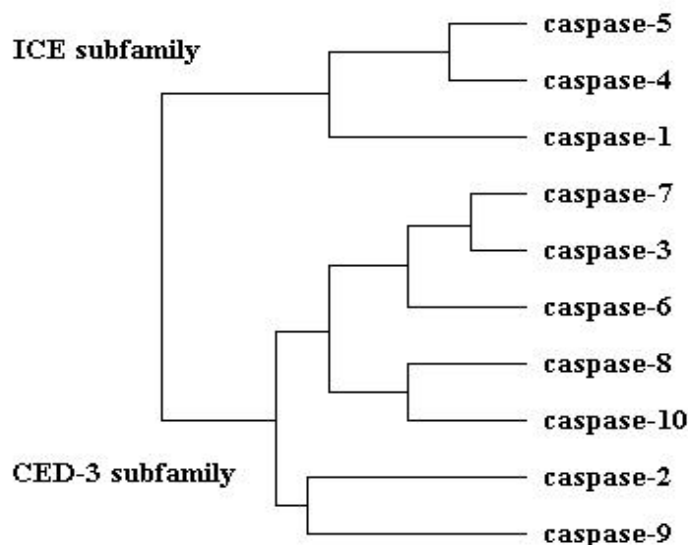
Πίνακας 3. Οι εναλλακτικές ονομασίες και οι ενεργές περιοχές των ανθρώπινων κασπασών.

ΚΑΣΠΑΣΗ	ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΕΝΕΡΓΟΣ ΠΕΡΙΟΧΗ
Κασπάση-1	ICE	QACRG
Κασπάση-2	Nedd2, ICH-1	QACRG
Κασπάση-3	CPP32, Yama, aporain	QACRG
Κασπάση -4	ICE _{rel} II, TX, ICH-2	QACRG
Κασπάση -5	ICE _{rel} III, TY	QACRG
Κασπάση -6	Mch2	QACRG
Κασπάση -7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	QACRG
Κασπάση -8	MACH, FLICE, Mch5	QACQG
Κασπάση -9	ICE-LAP6, Mch6	QACGG
Κασπάση-10	Mch4	QACQG

Οι αλληλουχίες των ανθρώπινων κασπασών χωρίζονται σε δύο υποοικογένειες: την ICE (caspase-1) και την CED-3 (*C. elegans* caspase) υποοικογένεια (subfamily). Οι σχέσεις βασίζονται στο συνολικό μήκος των προενζύμων. Το δενδρόγραμμα δεν επηρεάζεται, αν οι prodomains αφηθούν εκτός των αλληλουχιών (Σχήμα 15) .

1.13 Φυλογενετικές σχέσεις κασπασών

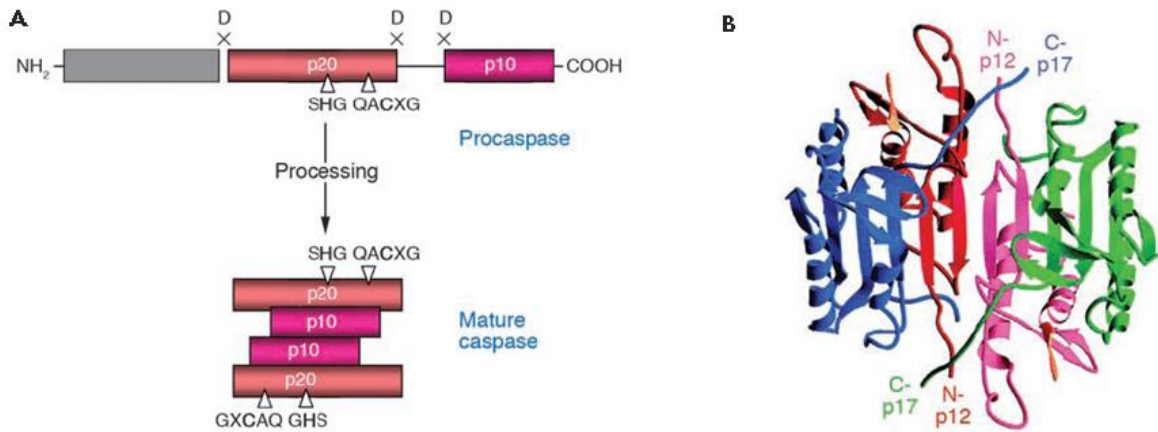
Μία περιοχή διάσπασης με κατάλοιπα ασπαρτικού, διαχωρίζει την pro-domain από την μεγάλη υπομονάδα, ενώ μία ενδιάμεση συνδετική περιοχή με 1 ή 2 περιοχές ασπαρτικού, διαχωρίζει τη μεγάλη από τη μικρή υπομονάδα. Η ενεργοποίηση των κασπασών συνοδεύεται συνήθως από πρωτεόλυση στην ενδιάμεση συνδετική περιοχή και συνήθως έχει ως αποτέλεσμα και την απομάκρυνση της pro-domain.



Σχήμα 15. Οι αλληλουχίες των ανθρώπινων κασπασών χωρίζονται σε δύο υποοικογένειες: την ICE (caspase-1) και την CED-3 (*C. elegans* caspase) υποοικογένεια.

Οι μεγάλες υπομονάδες των μη ενεργοποιημένων κασπασών (προκασπασών) περιέχουν μοτίβα που ανήκουν στην αποκαλούμενη οικογένεια των death domain πρωτεϊνών (Martinon et al., 2001; Weber and Vincenz, 2001). Οι death domains είναι περιοχές 80- έως 100- αμινοξέων, που αναμειγνύονται στη μεταβίβαση του αποπτωτικού σήματος. Στην υπεροικογένεια αυτή ανήκουν η death domain (DD), η death effector domain (DED) και η caspase recruitment domain (CARD) (Fesik, 2000). Κάθε ένα από αυτά τα μοτίβα αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες με πανομοιότυπο τρόπο. Όλα τα μέλη της οικογένειας αυτής χαρακτηρίζονται από παρόμοια δομή, που αποτελείται από 6 ή 7 αντιπαράλληλες amphipathic έλικες. Η δομική ομοιότητά τους είναι ένδειξη μία κοινής πρόλευσής τους (Hofmann, 1999). Παρά ταύτα, η φύση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών αυτών με άλλα μόρια, διαφέρει μεταξύ τους, καθώς οι DD και CARD αλληλεπιδρούν με ηλεκτροστατικούς δεσμούς, ενώ η DED με υδρόφοβους (Eberstadt et al., 1998). Η προκασπάση-8 και -10 έχουν δύο DED περιοχές κατά σειρά, στην prodomain τους (Muzio et al., 1996; Sprick et al., 2002). Η CARD περιοχή ανευρίσκεται στις κασπάσες -1, -2, -4, -5, -9, -11 και -12 (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004; Lamkanfi et al., 2005). Οι DED και CARD περιοχές είναι υπεύθυνες για την αναδιάταξη των εναρκτήριων κασπασών σε συμπλέγματα, που προωθούν κυτταρικό θάνατο ή φλεγμονή, έχοντας ως αποτέλεσμα την αυτο-ενεργοποίηση των κασπασών αυτών, που ξεκινούν τη διαδικασία απόπτωσης ή φλεγμονής.

Το ενεργό ένζυμο κάθε κασπάσης είναι ένα τετραμερές, αποτελούμενο από δύο ετεροδιμερή μεγάλης/μικρής υπομονάδας (Mittl et al., 1997; Rotonda et al., 1996; Walker et al., 1994b; Wilson et al., 1994a). Κάθε ετεροδιμερές εμπεριέχει ένα ενεργό κέντρο, που σχηματίζεται από τη συμβολή μεγάλης και μικρής υπομονάδας (Σχήμα 16).



Σχήμα 16. Η ενεργοποίηση των προκασπασών (procaspase) και ο σχηματισμός των ώριμων μορφών (mature caspase), γίνεται μετά από τη διάσπαση ειδικών δεσμών, της μορφής Asp-X. Οπότε και δημιουργούνται ετεροτετραμερή p20₂-p10₂ (όπου p20 η μεγάλη υπομονάδα και p10 η μικρή υπομονάδα των κασπασών), με απελευθέρωση των prodomain. Β. Στην τριτοταγή δομή τους, κάθε ετεροδιμερές του ετεροτετραμερούς σχηματίζεται με υδρόφοβους δεσμούς, έχοντας ως αποτέλεσμα το σχηματισμό 6 παράλληλων β-sheets, με 6 αντιπαράλληλες β-αλυσίδες. Δύο ετεροδιμερή μαζί, σχηματίζουν ένα β-sheet 12 αλυσίδων, περικλειόμενο από α-έλικες. Διακρίνονται τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα των μικρών και μεγάλων υπομονάδων.

Κάθε ενεργό κέντρο περιέχει μία θετικά φορτισμένη S₁ περιοχή που θα προσδέσει το αρνητικά φορτισμένο P₁ ασπαρτικό του υποστρώματος (Mittl et al., 1997; Rotonda et al., 1996; Walker et al., 1994b; Wilson et al., 1994a). Η περιοχή S₁ είναι υψηλά διατηρημένη, οπότε και όλες οι κασπάσες διασπών μόνο μετά από κατάλοιπα ασπαρτικού. Οι κασπάσες μεμονωμένα έχουν δύο μεγάλες δομικές διαφορές. Οι S₂ έως και S₄ περιοχές πρόσδεσης του υποστρώματος ποικίλουν, αντιστοιχώντας σε ανάλογη ποικιλία στις περιοχές πρόσδεσης P₂ έως και P₄ του υποστρώματος, παρά την απαίτηση ασπαρτικού στην περιοχή P₁ (Cohen, 1997; Hu et al., 1998; Humke et al., 1998; Mittl et al., 1997; Nicholson and Thornberry, 1997; Rotonda et al., 1996; Van de Craen et al., 1997; Walker et al., 1994a; Wilson et al., 1994a). Ο προσδιορισμός της μέγιστης ειδικότητας υποστρώματος για

10 κασπάσες, ανευρίσκοντας το ιδανικό τετραπεπτιδίο-υπόστρωμα από αρχείο συνθετικών πεπτιδίων (Thornberry et al., 1997), οδήγησε σε ένα σχετικό διαχωρισμό των κασπασών σε εναρκτήριες, εκτελεστικές και στις επεξεργάζουσες κυτταροκίνες. Έχοντας υπόψη ότι το τετραπεπτιδίο αναγνώρισης των κασπασών διατάσσεται με τη μορφή S4-S3-S2-S1, η περιοχή που χαρακτηρίζει την ειδικότητα διάσπασης των κασπασών είναι η X-Glu-X-Asp. Οι κασπάσες -1, -4 και -5, προτιμούν το υπόστρωμα DEXD, ενώ οι κασπάσες -6, -8 και -9, την αλληλουχία (L/V)EXD. Να σημειωθεί ότι το σημείο διάσπασης μεταξύ της μεγάλης και μικρής υπομονάδας των εναρκτήριων κασπασών, περιέχει και το ανάλογο μοτίβο αναγνώρισης, ώστε να αυτοενεργοποιηθούν (Boatright et al., 2003). Οι περισσότεροι αναστολείς κασπασών βασίζονται σε αυτό το τετραπεπτιδικό μοτίβο αναγνώρισης. Η εισαγωγή μίας αλδεϋδικής ομάδας στο καρβοξυτελικό άκρο του τετραπεπτιδίου έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αναστρέψιμων αναστολέων (Graybill et al., 1994), ενώ η προσθήκη fluoromethyl ketone (fmk), chloromethyl ketone (cmk) (Estrov et al., 1995) ή diazomethyl ketone (dmk) (Thornberry et al., 1992) στην ίδια θέση, αναστέλλει το ένζυμο μη αναστρέψιμα.

Παρά ταύτα, θα πρέπει να γνωρίζουμε ότι παρά την εμφάνιση ίδιου τετραπεπτιδικού υποστρώματος, η κινητική της υδρολυτικής αντίδρασης μπορεί να διαφέρει αισθητά. Επίσης, οι pro-domains των κασπασών διαφέρουν σε μέγεθος και αμινοξική αλληλουχία. Οι μεγάλες pro-domains λειτουργούν υπέρ της ολοκλήρωσης αποπτωτικών ή προφλεγμονωδών σημάτων και περιέχουν μοτίβα αλληλουχιών που ευνοούν την αλληλεπίδρασή τους με μόρια ενεργοποίησης (Ashkenazi and Dixit, 1998; Hofmann et al., 1997). Οι εναρκτήριες κασπάσες (-2, -8, -9, 10) συνήθως προηγούνται στη δράση τους, των εκτελεστικών (-3, -6, -7), που αποτελούνται από μικρές pro-domains (Ashkenazi and Dixit, 1998; Cohen, 1997; Nicholson and Thornberry, 1997). Αντίθετα, οι κασπάσες -1 και -11 λειτουργούν κυρίως ως επεξεργαστές κυτταροκινών (Green, 1998; Wang et al., 1998b). Επίσης, οι κασπάσες -4, -5, -12, -13 και -14 έχουν μεγαλύτερη ομοιότητα αλληλουχιών με την κασπάση-1 (Cohen, 1997; Hu et al., 1998; Humke et al., 1998; Nicholson and Thornberry, 1997; Van de Craen et al., 1997). Συνοπτικά, φαίνεται ότι η ειδικότητα του υποστρώματος, το μήκος της pro-domain και η αλληλουχία της, καθορίζουν τη λειτουργία κάθε κασπάσης.

1.14 Μηχανισμοί ενεργοποίησης των κασπασών

Η απουσία ρύθμισης της δραστηριότητας των κασπασών θα ήταν θνησιγενής για ένα κύτταρο, γι' αυτό και τα κύτταρα αποθηκεύουν τις κασπάσες ως πρόδρομες μορφές (ζυμογόνα, προκασπάσες), που χρειάζονται ένα γεγονός ενεργοποίησης. Ενώ έχει φανεί ότι ο μηχανισμός ενεργοποίησης εναρκτήριων και εκτελεστικών κασπασών είναι διαφορετικός, ο τρόπος σταθεροποίησής τους στη μορφή ζυμογόνου είναι ίδιος. Συνοπτικά, για την ενεργοποίηση των εναρκτήριων και των φλεγμονωδών κασπασών απαιτείται ο διμερισμός των ανενεργών μονομερών μορφών τους, μέσω δημιουργίας συμπλεγμάτων και συγκεκριμένης "πλατφόρμας ενεργοποίησης". Αντίθετα, οι εκτελεστικές κασπάσες βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα ως ανενεργά διμερή (Boatright et al., 2003; Chai et al., 2001b; Kang et al., 2002; Mittl et al., 1997; Pop et al., 2001; Shiozaki et al., 2003; Talanian et al., 1996).

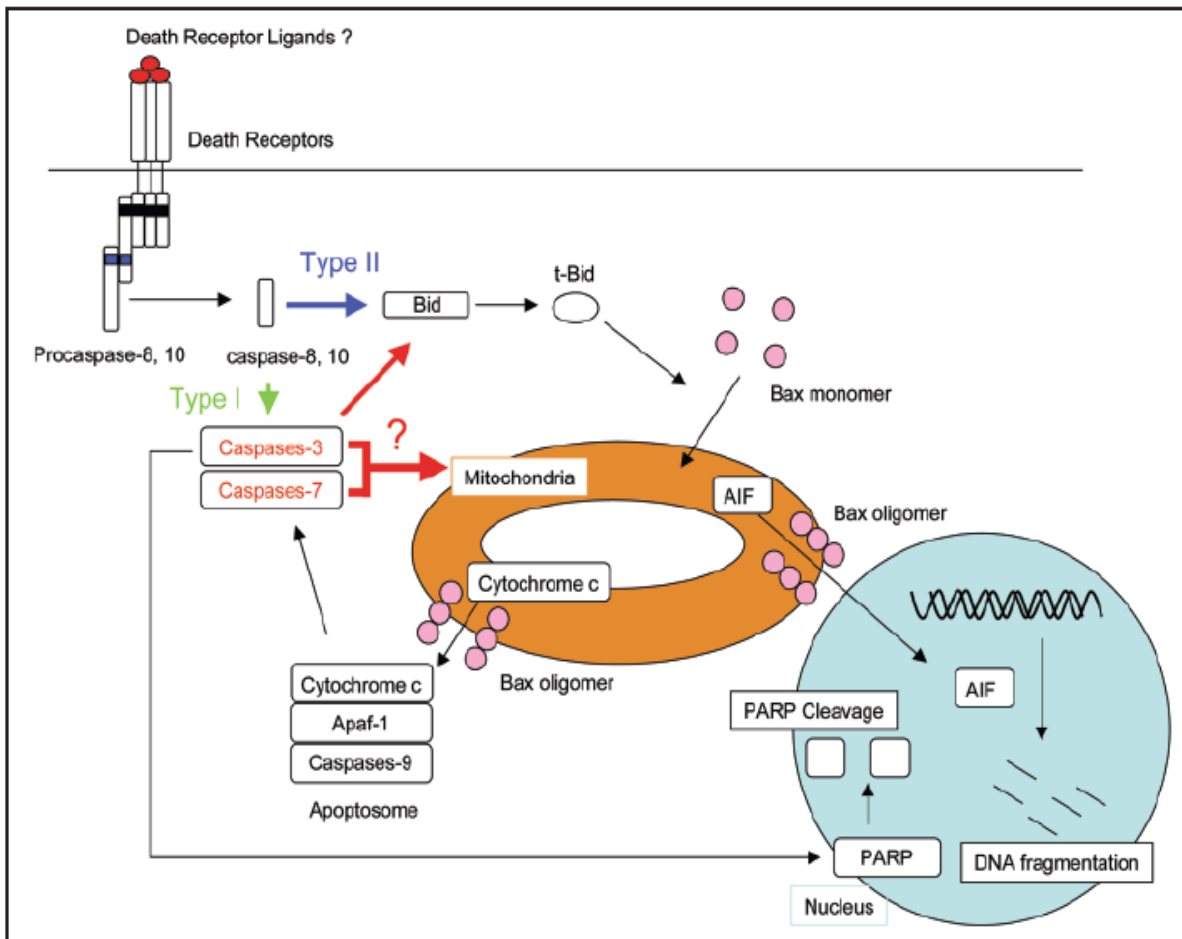
Όλες οι κασπάσες απαιτούν πρωτεολυτική επεξεργασία για την ενεργοποίησή τους. Οι εκτελεστικές κασπάσες ενεργοποιούνται από τις εναρκτήριες (initiator ή apical κασπάσες), οι οποίες ενεργοποιούνται μέσω σχηματισμού μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, όπου συγκεντρώνονται αρκετά ζυμογόνα (Chai et al., 2001a; Chang et al., 2002; Mittl et al., 1997; Riedl et al., 2001; Wei et al., 2000). Οι προκασπάσες -8 και -10 ενεργοποιούνται στον εξωκυττάριο μηχανισμό επαγωγής της απόπτωσης. Διάφορα μέλη της οικογένειας του TNF-υποδοχέα (TNFR1, CD95 [Fas/APO-1], TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR3, DR6) εμπεριέχουν DD περιοχές στο ενδοκυττάριο τμήμα τους, οπότε και καλούνται death receptors (Ashkenazi and Dixit, 1998; Tartaglia et al., 1993). Η πυροδότηση των CD95 and TRAIL-R1/R2 από τους συνδέτες τους, οδηγούν στο σχηματισμό του συμπλέγματος DISC (Kischkel et al., 1995; Scaffidi et al., 2000; Scaffidi et al., 1999a; Scaffidi et al., 1997; Scaffidi et al., 1999c). Τα CD95 και TRAIL-R1/R2 DISC συμπλέγματα, αποτελούνται από ολιγομερή, πιθανώς τριμερή, υποδοχέων, 2 ισομορφές της προκασπάσης-8 (procaspase-8/a [FLICE, MACHα1, Mch5] και procaspase-8/b [Machα2]), την προκασπάση-10 και τις κυτταρικές FLICE-ανασταλτικές πρωτεΐνες (c-FLIPL/S/R) (Golks et al., 2005; Peter and Krammer, 2003). Η DD περιοχή του υποδοχέα αλληλεπιδρά με την DD περιοχή του FADD, ενώ η περιοχή DED του FADD αλληλεπιδρά με τις διαδοχικές περιοχές DED του αμινοτελικού άκρου των προκασπασών -8, -10 και των FLIPL/S/R. Οπότε και ο σχηματισμός του DISC έχει ως αποτέλεσμα τη συμπλησίαση των προκασπασών -8 και -10. Η ενεργοποίηση της προκασπάσης-8 πιστεύεται ότι γίνεται με

την υψηλή συγκέντρωση και τον προσανατολισμό μορίων προκασπάσης-8 στο DISC σύμπλεγμα, με αποτέλεσμα την αυτο-πρωτεολυτική της ενεργοποίηση (Boatright et al., 2003;Chang et al., 2003;Martin et al., 1998;Muzio et al., 1998). Επίσης, έχει δειχθεί ότι διμερή προκασπάσης-8 έχουν πρωτεολυτική δραστικότητα και ότι μπορούν να αυτοενεργοποιήσουν την προκασπάση-8 (Chang et al., 2003). Ενδιαφέρον είναι το ότι η προκασπάση-8 και η ώριμη μορφή της έχουν διαφορετική ειδικότητα υποστρωμάτων (Chang et al., 2003). Η ενεργοποίηση της προκασπάσης-8 γίνεται σε δύο βήματα πρωτεολυτικής διάσπασης (Chang et al., 2003;Scaffidi et al., 1997), ένα που αφορά τη διάσπαση μεταξύ μεγάλης και μικρής υπομονάδας και ένα δεύτερο που αφορά τη διάσπαση μεταξύ prodomain και μεγάλης υπομονάδας. Τελικά, σχηματίζεται ένα ετεροτετραμερές στο DISC σύμπλεγμα, η ώριμη κασπάση-8, που απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα για την επαγωγή της αποπτωτικής διαδικασίας. Η προκασπάση-10, επίσης, σχηματίζει ένα ενεργό ετεροτετραμερές (Chang et al., 2003;Kischkel et al., 2001), αν και διαφορούμενες είναι οι απόψεις, αν επί απουσίας της κασπάσης-8, μπορεί η κασπάση-10 μόνη της να πυροδοτήσει την απόπτωση.

Μία σειρά ενδοκυττάρων διεγέρσεων, όπως το ενδοκυττάριο στρες, το θερμικό σοκ, το οξειδωτικό στρες και βλάβες στο DNA, οδηγούν στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, δημιουργώντας το σύμπλεγμα του αποπτοσώματος (Acehan et al., 2002). Η βασική πρωτεΐνη του αποπτοσώματος (140-kDa), Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1), επί παρουσίας κυτοχρώματος-c και dATP, μέσω ολιγομερισμού, σχηματίζει το μεγάλο (700-1,400 kDa) σύμπλεγμα του αποπτοσώματος. Η προκασπάση-9 στρατολογείται στο σύμπλεγμα μέσω αλληλεπίδρασης με CARD περιοχή, οπότε και ενεργοποιείται (Jiang and Wang, 2000). Έχει αποδειχθεί βιοχημικά ότι η ενεργοποίηση της προκασπάσης-9 γίνεται με διμερισμό (Boatright et al., 2003).

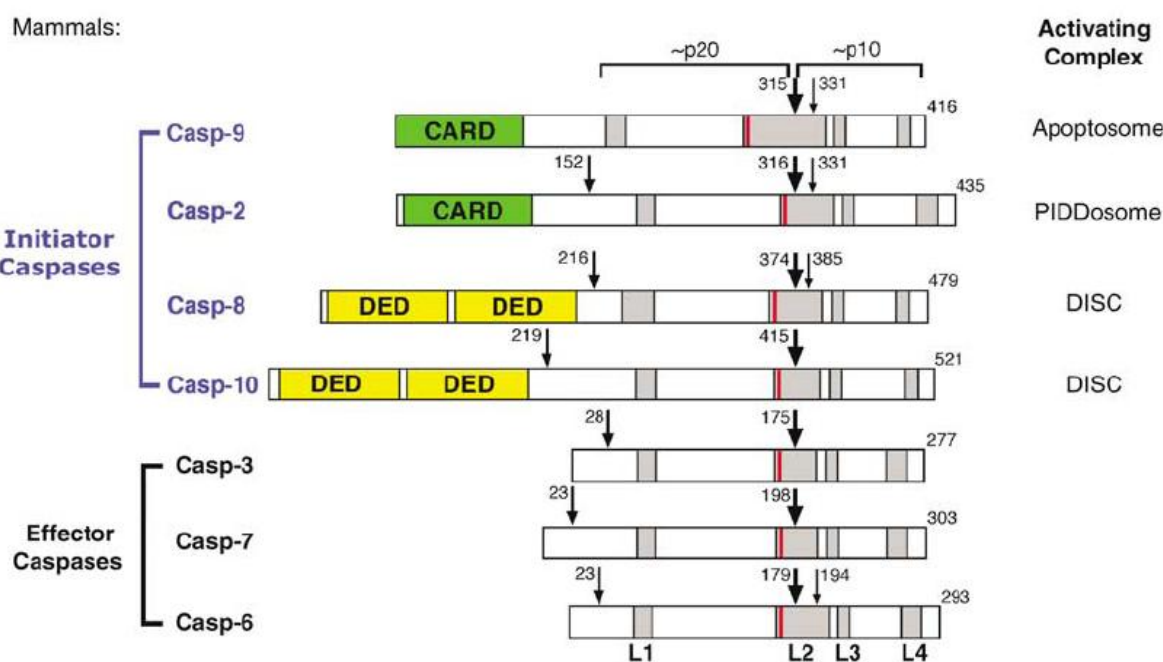
Η πορεία προς την ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών διαφέρει μεταξύ ενδοκυττάρου και εξωκυττάρου μονοπατιού σηματοδότησης της απόπτωσης. Στο εξωκυττάρια-ενεργοποιούμενο αποπτωτικό μονοπάτι, 2 τύποι σηματοδότησης έχουν προταθεί (Scaffidi et al., 1998). Στα τύπου-I κύτταρα, που χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα σχηματισμού DISC και αυξημένα επίπεδα ενεργού κασπάσης-8, η ενεργοποιημένη κασπάση-8 οδηγεί στην άμεση ενεργοποίηση των "downstream" κασπασών -3 και -7. Στα τύπου-II κύτταρα, υπάρχουν χαμηλά επίπεδα DISC και ενεργού κασπάσης-8. Στην περίπτωση αυτή, η ενεργοποίηση της απόπτωσης απαιτεί την ενίσχυση του σήματος μέσω

του ενδοκυττάριου μονοπατιού. Η διάσπαση της Bcl-2 πρωτεΐνης Bid, οδηγεί στο σχηματισμό του tBid (truncated Bid), που μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια και οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c (Korsmeyer et al., 2000). Ακολουθεί ο σχηματισμός του αποπτοσώματος και η ενεργοποίηση της κασπάσης-9, η οποία και ενεργοποιεί (με διάσπαση) τις κασπάσες -3 και -7. Η τύπου-II σηματοδότηση μπορεί να μπλοκαριστεί από τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL. Στον ενδοκυττάρια-ενεργοποιούμενο αποπτωτικό μονοπάτι, η απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c οδηγεί στο σχηματισμό του αποπτοσώματος και στην ενεργοποίηση της προκασπάσης-9 (Jiang and Wang, 2000). Αυτή στη συνέχεια διασπά τις κασπάσες -3 και -7 και ξεκινάει η διαδικασία της απόπτωσης (Σχήμα 17).



Σχήμα 17. Σχηματική απεικόνιση των δύο μονοπατιών αποπτωτικής σηματοδότησης, στον εξωκυττάρια ενεργοποιούμενο μηχανισμό σηματοδότησης. Οπότε και φαίνεται η διάκριση των κυττάρων σε τύπου-I και -II. (Kuribayashi et al., 2006)

Έχει, επίσης, προταθεί σε περιπτώσεις γονοτυπικού στρες, η έναρξη αποπτωτικής διαδικασίας από την προκασπάση-2, πριν την ενεργοποίηση των μιτοχondρίων, κάτι που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση (Lassus et al., 2002;Robertson et al., 2002). Η κασπάση-2 έχει όλα τα χαρακτηριστικά των εναρκτήριων κασπασών, συμπεριλαμβανομένης της CARD περιοχής στο αμινοτελικό της άκρο. Ο χαρακτηρισμός της ενεργοποίησης της κασπάσης-2 in vitro, έδειξε ότι αυτο-καταλυτική της διάσπαση, σταθεροποιεί το σχηματισμό διμερών και ενισχύει την καταλυτική δραστηριότητά της (Baliga et al., 2004). Η ενεργοποίηση της κασπάσης-2 απαιτεί τη δημιουργία ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου, μοριακού βάρους 670 kDa (Read et al., 2002;Tinel and Tschopp, 2004). Το σύμπλοκο αυτό περιλαμβάνει μία RAIDD πρωτεΐνη και την p53-επαγόμενη πρωτεΐνη με death domain (p53-induced protein with a death domain ή PIDD) (Tinel and Tschopp, 2004), οπότε και αναφέρεται ως PIDDosome (Tinel and Tschopp, 2004) (Σχήμα 18).



Σχήμα 18. Οι εναρκτήριες κασπάσες, με τις death domains που εμπεριέχουν και τα αντίστοιχα σύμπλοκα, ο σχηματισμός των οποίων απαιτείται για την ενεργοποίησή τους. Αντιπαραβολή του μεγέθους των εκτελεστικών κασπασών. (Bao and Shi, 2007)

Δομικές πληροφορίες, εκτός της ενεργοποιημένης κασπάσης-2, διατίθενται για την CARD περιοχή της RAIDD (Chou et al., 1998), που χρειάζεται για την πρόσδεση στην CARD περιοχή της κασπάσης-2, αλλά και για την death domain (DD) της RAIDD (Park

and Wu, 2006), που πιστεύεται ότι αλληλεπιδρά με την DD της PIDD. Επί του παρόντος ενιγματική παραμένει η στοιχειομετρία μεταξύ PIDD, RAIDD και κασπάσης-2, καθώς και ο μηχανισμός με τον οποίο το PIDDosome ενεργοποιεί την κασπάση-2, όπως επίσης δεν είναι γνωστό αν επιπρόσθετοι παράγοντες συμμετέχουν στο σχηματισμό του PIDDosome.

Στην παρούσα μελέτη, έγινε διερεύνηση της δραστηριότητας των κασπασών -8, -2, -9 και -3, σε κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Η επιλογή έγινε με βάση το γεγονός ότι τον κυρίαρχο ρόλο στην αποπτωτική διαδικασία φαίνεται να τον έχουν οι εναρκτήριες κασπάσες, ενώ η κασπάση-3 αποτελεί την πιο αντιπροσωπευτική κασπάση, που αποδεικνύει την έναρξη της εκτελεστικής φάσης της απόπτωσης. Αν και δε θα μας απασχολήσει η κατηγορία των προφλεγμονωδών κασπασών, παρακάτω γίνεται μια σύντομη αναφορά.

Interleukin converting enzyme (ICE)-like κασπάσες, που εμπλέκονται στην παραγωγή κυτταροκινών (π.χ. κασπάσες -1, -4, -5, -13).

Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες interleukin-1 β and interleukin-18 αποθηκεύονται στο κυτταρόπλασμα, έως την ενεργοποίησή τους με πρωτεόλυση και την απελευθέρωσή τους. Στην πρωτεόλυση αυτή συμμετέχει εν μέρει η κασπάση-1. Αυτό το μεταγραφικά και μεταφραστικά ανεξάρτητο γεγονός λειτουργεί πιθανώς ως μία γρήγορη ανταπόκριση σε φλεγμονή, γεγονός που ενισχύει τη φυσική ανοσία. Το ένζυμο μετατροπέας της ιντερλευκίνης-1 β (Interleukin-1 β -converting enzyme/ICE/caspase-1) ήταν το πρώτο μέλος της οικογένειας των κασπασών που αναγνωρίστηκε ως ένας νέος τύπος κυστεϊνο-πρωτεάσης, υπεύθυνη για τη μετατροπή της πρόδρομης ιντερλευκίνης-1 β (IL-1 β) στην ώριμη μορφή της στα μονοκύτταρα. Η ώριμη μορφή της IL-1 β , διασπώμενη στην Asp-116-Ala-117, αποτελεί ένα μεσολαβητή κλειδί για τη φλεγμονή. Το ICE γονίδιο κωδικοποιεί μία ανενεργό πρόδρομη πρωτεΐνη, που εκφράζεται ιδιοσυστασιακά σε πολλούς τύπους κυττάρων. Το ICE βρέθηκε να αποτελεί ένα ομόλογο σε θηλαστικά, της πρωτεΐνης κυτταρικού θανάτου Ced-3 του *Caenorhabditis elegans*. Το γεγονός αυτό έδωσε το έναυσμα σε μελέτες για την εύρεση πιθανού ρόλου του στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Παρ'όλ'αυτά, ICE-knockout ποντίκια αναπτύσσονται φυσιολογικά, χωρίς προφανείς φυσιολογικές ή μορφολογικές παρεκκλίσεις, υποδεικνύοντας ότι δεν έχει κάποιον ουσιαστικό ρόλο στην απόπτωση. Ο κυρίαρχος ρόλος του έγκειται στην επεξεργασία της

IL-1β και της IL-18. Όπως συμβαίνει και με τις περισσότερες κασπάσες, η πρόδρομη μορφή των 45KDa χρειάζεται να διασπαστεί εσωτερικά σε δύο τμήματα προτού καταστεί ενζυματικά ενεργός, ως ετεροδιμερές από μία αλυσίδα 10 και μία 20KDa. Η ενεργός μορφή της ICE συμβάλλει στην παλίνδρομη αυτο-διάσπαση της πρόδρομης μορφής, ενεργοποιώντας το σχηματισμό ολιγομερών με τον εαυτό της ή άλλα μέλη της οικογένειας των κασπασών, όπως η κασπάση-3 (Gu et al., 1997; Wilson et al., 1994b). Τα αναγνωρισμένα υποστρώματα της ICE είναι η pro-IL-1β και η pro-IL-18. Ποντίκια με έλλειψη της ICE είναι ανθεκτικά σε θανατηφόρο ενδοτοξιναιμία, λόγω αποτυχίας στην επεξεργασία της pro-IL-18 και στην παραγωγή IFNγ και όχι λόγω αναστολής της IL-1β (Norman et al., 1997; Rau et al., 2001). Επίσης, μακροφάγα μολυσμένα από *Shigella flexneri* οδηγούνται σε απόπτωση και απελευθερώνουν IL-1β, ενώ τόσο η απόπτωση όσο και η ωρίμανση της IL-1β μπορεί να ανασταλεί από αναστολείς της ICE (Hilbi et al., 1997; Zychlinsky et al., 1992). Άλλα παραδείγματα στη βιβλιογραφία που αποδεικνύουν ότι η λοίμωξη από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς και η συνοδός εντερική φλεγμονή εξαρτάται από τη δραστηριότητα της κασπάσης-1 είναι η *Entamoeba histolytica* (Zhang et al., 2000) και η *Salmonella typhimurium* (Monack et al., 2001).

Η κατηγορία αυτή των κασπασών, αλλιώς ονομαζόμενη ως ενεργοποιητική κυτταροκινών, περιλαμβάνει κασπάσες με όμοια αλληλουχία και ειδικότητα υποστρώματος, με την κασπάση-1. Στον άνθρωπο, οι κυριότερες κασπάσες αυτής της ομάδας είναι η κασπάση-4 και -5, ενώ στα ποντίκια η κασπάση-11 και πιθανώς η -12 (Fischer et al., 2002; Kalai et al., 2003). Λόγω της εμφάνισης πολυμορφισμού στην κασπάση-12, διαπιστώθηκε ότι άτομα που εκφράζουν το ένζυμο στο πλήρες μήκος του, έχουν εξασθενημένη ανοσιακή απάντηση σε ενδοτοξίνες, όπως ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS), άρα και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης σήψης (Saleh et al., 2004). Σε ποντίκια, γενετικά δεδομένα συνδέουν την κασπάση-1 με την κασπάση-11 (Wang et al., 1998b), ενώ βιοχημικά δεδομένα συνδέουν την κασπάση-1 και -5, στον άνθρωπο (Martinon et al., 2002b). Η κασπάση-5, όπως και η κασπάση-4 ανήκουν στην κασπάση-1 υποοικογένεια. Το mRNA της κασπάσης-4 μπορεί να βρεθεί στους περισσότερους ιστούς, με την εξαίρεση του εγκεφάλου. Μπορεί να ανιχνευθεί επίσης στο ήπαρ, στον πνεύμονα, στην ωοθήκη και στον πλακούντα, όπου το mRNA της κασπάσης-1 είναι ελάχιστα ανιχνεύσιμο. Η κασπάση-4 και η κασπάση-5 έχουν διαφορετική ειδικότητα υποστρωμάτων από αυτή της κασπάσης-1: η pro-IL-1β είναι ένα φτωχό υπόστρωμα αυτών των μορφών. Η κασπάση-4 μπορεί να

αναμιγνύεται στην ενεργοποίηση της κασπάσης-1. Η υπερέκφραση τόσο της κασπάσης-4 όσο και της κασπάσης-5 έχει ως αποτέλεσμα την απόπτωση.

Οι κασπάσες που θα απασχολήσουν την παρούσα μελέτη είναι οι εναρκτήριοι κασπάσες -8, -2 και -9 και η εκτελεστική κασπάση-3.

Οι εναρκτήριοι κασπάσες (initiator ή apical caspases) ή "σηματοδότες θανάτου" (death signaling caspases) (-8, -9, -2) δεσμεύονται σε πρωτεΐνες μετατροπείς (adaptors) και προωθούν, αλλά δεν προκαλούν άμεσα θάνατο. Αντίθετα, ενεργοποιούν τις "εκτελεστικές" κασπάσες (executioner caspases).

Η κασπάση-8 είναι πιθανώς στην κορυφή του καταρράκτη της απόπτωσης. Μπορεί να ενεργοποιήσει όλα τα άλλα μέλη της οικογένειας των κασπασών. Η ενεργοποίησή της πυροδοτείται με την συσχέτισή της με την DED περιοχή της FADD, μίας συνδυαστικής πρωτεΐνης, παίζοντας ένα ρόλο στη συναρμολόγηση ενός συμπλέγματος σηματοδότησης επαγωγής-θανάτου. Το σύμπλεγμα σχηματίζεται όταν το CD95, ένας υποδοχέας κυτοκινών της επιφάνειας του κυττάρου, ενεργοποιείται, και συνδέεται με τη FADD και την κασπάση-8. Η κασπάση-8 περιέχει δύο αμινοτελικές επεκτάσεις ομόλογες με την DED περιοχή της FADD. Αυτές μπορεί να παίζουν ένα ρόλο στο σχηματισμό της FADD. Η ενεργός περιοχή της έχει ένα ασυνήθιστο QACQG πενταπεπτίδιο. Όπως είδαμε παραπάνω, μπορεί να οδηγήσει είτε στην άμεση ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών είτε, με την παραγωγή του tBid (επεξεργασμένο μόριο Bid, προαποπτωτικό μέλος της Bcl-2 υπεροικογένειας), να ενισχύσει την αποπτωτική οδό των μιτοχονδρίων. Η κασπάση-9 είναι ένα μέλος της CED-3 υποοικογένειας. Το ενεργό της τμήμα-πενταπεπτίδιο διαφέρει από αυτό των άλλων μελών της οικογένειας, όντας QACGG αντί QACRG. Η κασπάση-9 έχει πολλαπλές μορφές mRNA, ενώ η μορφή του προενζύμου ενεργοποιείται από την κασπάση-3 και το granzyme B in vitro.

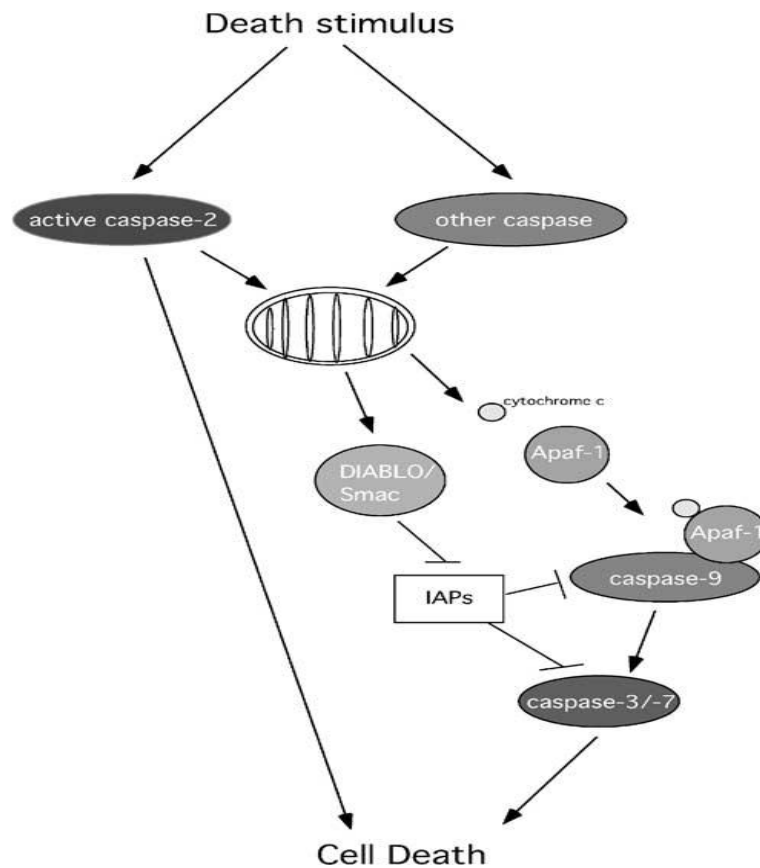
Η κασπάση-2 είναι η 2^η κασπάση που περιγράφηκε και ανήκει στην CED-3 υποοικογένεια (προσδιοριζόμενη από την κασπάση του *C. elegans*) (Kumar et al., 1994; Wang et al., 1994). Εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο ήπαρ, στους νεφρούς και στον πνεύμονα κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Είναι δύσκολο να την εντάξει κανείς στις εκτελεστικές ή στις εναρκτήριοι κασπάσες, διότι εμφανίζει ομολογία στις ακολουθίες με τις εναρκτήριοι κασπάσες (Lamkanfi et al., 2002), αλλά η ειδικότητα της στα σημεία διάσπασης είναι παρόμοια με αυτή των εκτελεστικών κασπασών

(όπως οι κασπάσες 3 και 7) (Talanian et al., 1997; Thornberry et al., 1997). Λόγω της απουσίας δραματικού φαινοτύπου σε ποντίκια με έλλειψη κασπάσης-2 (Bergeron et al., 1998), είχε ατονήσει το επιστημονικό ενδιαφέρον για την κασπάση-2, γεγονός που ανατράπηκε τα τελευταία χρόνια λόγω ενδείξεων ότι η κασπάση-2 ρυθμίζει τον πραγματωμένο κυτταρικό θάνατο μέσω αύξησης της διαπερατότητας των μιτοχονδρίων (Guo et al., 2002; Kumar and Vaux, 2002; Lassus et al., 2002; Paroni et al., 2002; Robertson et al., 2002) (Σχήμα 19).

Δεν είναι ξεκάθαρος ο μηχανισμός μέσω του οποίου ενεργοποιείται η κασπάση-2. Με την αναγνώριση μίας συνδετικής πρωτεΐνης για την κασπάση-2, της RAIDD, προτάθηκε η δημιουργία ολιγομερών, ως μηχανισμός ενεργοποίησης (Duan and Dixit, 1997). Η RAIDD μπορεί να αλληλεπιδράσει με την RIP και στη συνέχεια με τον TNFR1 μέσω του TRADD, οπότε τελικά να στρατολογήσει την κασπάση-2 στο σύμπλεγμα και να προωθηθεί ο TNF-επαγόμενος θάνατος. Φάνηκε, όμως, ότι δεν επηρεάστηκε ο TNF-επαγόμενος θάνατος από την αναστολή του RAIDD ή της κασπάσης-2. Παρόμοια με την κασπάση-9, η κασπάση-2 μπορεί να ενεργοποιηθεί και μέσω του σχηματισμού αποπτοσώματος. Η PACAP (proapoptotic caspase adaptor protein), μία νέα προαποπτωτική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τις κασπάσες -2 και -9, μπορεί να ευθύνεται για το σχηματισμό κασπάσης-2-αποπτοσώματος (Bonfoco et al., 2001). Η κασπάση-2 μπορεί να ενεργοποιηθεί *in vitro* από την κασπάση-1, την κασπάση-3 και την ουδέτερη σερίνη-πρωτεάση granzyme B, που είναι αποθηκευμένη σε ειδικούς λυτικούς κόκκους κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων. Η κασπάση-2 μπορεί να μην απαιτεί συνδετική πρωτεΐνη για το σχηματισμό ολιγομερών, καθώς έχει δείχθει ότι σχηματίζει ομοδιμερή πριν την κατάτμησή της και ότι υπερέκφρασή της οδηγεί στην απόπτωση (Butt et al., 1998). Φαίνεται ότι για την επεξεργασία της κασπάσης-2 απαιτείται η pro-domain και τα σημεία όπου αυτή διασπάται φαίνεται να έχουν αναγνωρισθεί (Allet et al., 1996; Xue et al., 1996). Πολλαπλές μελέτες έχουν δείξει ότι η κασπάση-3 μπορεί να διασπάσει *in vitro* την κασπάση-2 (Li et al., 1997; Paroni et al., 2001; Slee et al., 1999). Σε διάφορες κυτταρικές σειρές έχει φανεί ότι πολλαπλά αποπτωτικά ερεθίσματα, όπως η ετοποσίδη, η σταυροσπορίνη, η στέρηση τροφικού παράγοντα και η γ-ακτινοβολία, οδηγούν στην κατάτμηση της κασπάσης-2 (Droin et al., 2000; Harvey et al., 1997; Li et al., 1997; Robertson et al., 2002; Stefanis et al., 1998).

Η ταυτοποίηση συγκεκριμένου άμεσου μιτοχονδριακού στόχου της κασπάσης-2 φαίνεται να μην είναι εφικτή, καθώς μεταξύ άλλων προ-αποπτωτικών παραγόντων, δεν

απαιτεί τη διάσπαση του μορίου Bid (Guo et al., 2002). Η σχετικά πρόσφατη ανακάλυψη της ιστόνης H1.2, ως παράγοντα απελευθέρωσης του κυτοχρώματος-c, μετά από διάσπαση της διπλής αλυσιάδας του DNA (Konishi et al., 2003), δείχνει ότι όχι μόνο η κασπάση-2, αλλά ίσως και πυρηνικά υποστρώματα, μπορεί να αναμιγνύονται στην επαγωγή της απελευθέρωσης κυτοχρώματος-c. Όπως προαναφέρθηκε, το σύμπλεγμα PIDDosome, με τη συμμετοχή των PIDD (p53-induced protein with a death domain) και RAIDD, φαίνεται να συμμετέχει στην ενεργοποίηση της κασπάσης-2 (Tinel and Tschopp, 2004). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η PIDD πρωτοπεριγράφηκε ως ένα p53-ρυθμιζόμενο γονίδιο (Lin et al., 2000), είναι πιθανό το σύμπλεγμα να ξεκινάει την απόπτωση, σε περίπτωση βλάβης του DNA.



Σχήμα 19. Μία απλή απεικόνιση της θέσης της κασπάσης-2 στα αποπτωτικά μονοπάτια, μετά από ερέθισμα αποπτωτικού θανάτου. (Troy and Shelanski, 2003)

Αντίθετα, καταστολή της κασπάσης-2 μέσω RNA παρέμβασης, φάνηκε να αναστέλλει την εξωκυττάρια ενεργοποιούμενη από TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) αποπτωτική οδό, μέσω ενός μονοπατιού που ενοχοποιεί την κασπάση-2

για την μετέπειτα διάσπαση του Bid (Wagner et al., 2004). Επιπρόσθετα, έχει αποδοθεί ρόλος και στην επεξεργασμένη, αλλά δραστικά ανενεργή κασπάση-2, στη διαδικασία απελευθέρωσης κυτοχρώματος-c από τα μιτοχόνδρια (Robertson et al., 2004), ενώ τόσο το ενδογενές ζυμογόνο όσο και οι υπερεκφρασμένες μορφές κασπάσης-2, έχουν βρεθεί στον κυτταρικό πυρήνα (O'Reilly et al., 2002;Shikama et al., 2001;Zhivotovsky et al., 1999). Σε αντίθεση με τις άλλες κασπάσες, η κρυσταλλική δομή της κασπάσης-2 αποκαλύπτει ένα ομοιοπολικό διμερές, όπου τα απέναντι ευρισκόμενα κατάλοιπα Cys-390 και Cys-390 σχηματίζουν έναν εσωτερικό δισουλφιδικό δεσμό (Schweizer et al., 2003).

Από τις "εκτελεστικές" ή effector κασπάσες (π.χ. κασπάσες -3, -6, -7), η κασπάση-3 αποτελεί μία από τους εκτελεστές-κλειδιά στην απόπτωση. Είναι ευρέως "διανεμημένη", με υψηλή έκφραση στις κυτταρικές σειρές λεμφοκυτταρικής προέλευσης. Η κασπάση-3 προτιμά υποστρώματα με μία DXXD ακολουθία. Τα υποστρώματά της στην απόπτωση μπορούν να ανιχνευθούν με βάση αυτό το μοτίβο αναγνώρισης. Ποντίκια με έλλειψη κασπάσης-3 πεθαίνουν στις 1-3 εβδομάδες ηλικίας με χαρακτηριστικές μορφολογικές ανωμαλίες. Η απόπτωση των νευρώνων έχει αξιοσημείωτα αποτύχει σε αυτά τα ποντίκια, οδηγώντας σε υπερπλασίες, έκτοπες κυτταρικές μάζες και διπλασιασμένες εγκεφαλικές δομές. Μολαταύτα, άλλα μεγάλα όργανα δεν επηρεάζονται από τη μετάλλαξη. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η κασπάση-3 έχει έναν μη περιττό ρόλο στη νευρική απόπτωση, ενώ σε άλλους ιστούς άλλες ισομορφές μπορούν να αντικαταστήσουν την απώλειά του. Η κασπάση-3 ενεργοποιείται από την granzyme B in vitro.

Σε κύτταρα Jurkat που χορηγήθηκε συνδέτης του Fas υποδοχέα, απελευθερώθηκε κυτόχρωμα-c, αλλά δεν απελευθερώθηκε όταν χορηγήθηκε ο αναστολέας των κασπασών zVAD-fmk (zVal-Ala-Asp-CH₂F). Καθαρή κασπάση-8 πυροδότησε την απελευθέρωση κυτοχρώματος-c από τα μιτοχόνδρια in vitro. Το αποτέλεσμα ήταν έμμεσο, καθώς απαιτούσε την παρουσία του κυτταροπλάσματος, ως ένδειξη μεσολάβησης ενός κυτταροπλασματικού υποστρώματος, που στη συνέχεια οδήγησε στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c. Η δραστικότητα του κυτοχρώματος-c δεν μπλοκαρίστηκε από την αναστολή των κασπασών, αλλά ανταγωνιζόταν από τα μόρια Bcl-2 ή Bcl-xL. Η κασπάση-8 και η κασπάση-3 διάσπασε το μόριο Bid, με συνέπεια την απελευθέρωση κυτοχρώματος-c, αλλά οι κασπάσες -6 και -7 δεν το διάσπασαν, παρά την επαγωγή της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος-c, παρουσία κυτταροπλάσματος. Έτσι, οι εκτελεστικές κασπάσες, διασπώντας ίσως κάποιο κυτταροπλασματικό υπόστρωμα (εκτός του Bid), προωθούν την

απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c, ενισχύοντας έτσι τον καταρράκτη ενεργοποίησης των κασπασών (Bossy-Wetzel and Green, 1999).

1.15 Ανασταλτική ρύθμιση των κασπάσεων

Η δράση των κασπασών ρυθμίζεται σε πολλά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής τους στο επίπεδο του DISC, καθώς και της αναστολής της δραστηριότητάς τους. Οι c-FLIP πρωτεΐνες είναι γνωστοί αναστολείς της επαγόμενης από υποδοχέα θανάτου απόπτωσης (Golks et al., 2005;Scaffidi et al., 1999b;Thome et al., 1997). Έχουν δύο διαδοχικές περιοχές DED στο αμινοτελικό τους άκρο, που διευκολύνουν το σχηματισμό του DISC. Τρεις ισομορφές διακρίνονται σε πρωτεϊνικό επίπεδο, οι c-FLIPL, c-FLIPS, και c-FLIPR (Golks et al., 2005). Σε συνθήκες υπερέκφρασης, όλες οι ισομορφές εμποδίζουν την ενεργοποίηση της προκασπάσης-8 στο επίπεδο του DISC (Krueger et al., 2001). Παράλληλα, έχει βρεθεί ότι χαμηλές συγκεντρώσεις c-FLIPL διευκολύνουν τη διάσπαση της προκασπάσης-8 στο DISC, σχηματίζοντας ετεροδιμερή c-FLIPL–προκασπάσης-8 (Chang et al., 2003;Micheau et al., 2002). Η οικογένεια των αναστολέων της απόπτωσης (IAP, inhibitor of apoptosis) περιλαμβάνει 8 μέλη, συμπεριλαμβανομένων των XIAP, c-IAP1, c-IAP2 και MLIAP/ livin (Ashhab et al., 2001;Deveraux and Reed, 1999;Vucic et al., 2000). Αναστέλλουν ειδικά την εναρκτήρια κασπάση-9 και τις εκτελεστικές κασπάσες -3 και -7. Η λειτουργική τους υπομονάδα είναι η baculoviral IAP repeat (BIR) και οι XIAP, c-IAP-1 και c-IAP2 περιέχουν από 3 BIR περιοχές. Η τρίτη (BIR3) είναι αυτή που ευθύνεται για την αναστολή της δραστηριότητας της κασπάσης-9 (Srinivasula et al., 2001), ενώ η συνδετική περιοχή μεταξύ BIR1 και BIR2 στοχεύει τις κασπάσες -3 και -7. Η δραστηριότητα των IAPs ρυθμίζεται από τα μόριο Smac/DIABLO (Du et al., 2000;Ekert et al., 2001), που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, αναστέλλει τις IAPs και διευκολύνει την ενεργοποίηση των κασπασών. Παρόμοιο μόριο ρύθμισης των IAPs είναι το Omi/HtrA2 (Suzuki et al., 2001), μία μιτοχονδριακά εντοπιζόμενη σερίνη-πρωτεάση, που απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και αναστέλλει τις IAPs με παρόμοιο μηχανισμό. Στους φυσικούς αναστολείς της απόπτωσης ανήκουν και οι παν-αναστολείς, baculoviral p35 πρωτεΐνη (Miller, 1999;Xu et al., 2001) και serpin CrmA (Renatus et al., 2000).

1.16 Κασπάσες και καρκίνος

Παράλληλα με την εμφάνιση εκφυλιστικών νόσων λόγω απορρύθμισης της απόπτωσης, οι κασπάσες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση ασθενειών, όπως ο καρκίνος. Ένα παράδειγμα είναι η αποσιώπηση του γονιδίου της κασπάσης-8 στις περιπτώσεις νευροβλαστώματος, υποστηρίζοντας το σκεπτικό ότι οι κασπάσες λειτουργούν ως καταστολείς των όγκων (Teitz et al., 2000). Γενικά, σήματα που οδηγούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, προάγουν και τον αποπτωτικό μηχανισμό (Green and Evan, 2002). Η έμφυτη τάση του ταχέως πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων οδηγεί σε κυτταρική επέκταση, που ρυθμίζεται από ειδικές αλληλεπιδράσεις, κύτταρο με κύτταρο. Όταν τα κύτταρα ξεπεράσουν αυτό το περιβάλλον τοπικής αλληλεπίδρασης, πεθαίνουν με μία διαδικασία γνωστή ως 'anoikis', που ξεκινάει από την απώλεια των επαφών μεταξύ των κυττάρων (Frisch and Screaton, 2001). Τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να απενεργοποιήσουν τα αποπτωτικά σήματα που φυσιολογικά θα οδηγούσαν στην εξάλειψή τους, και είναι τώρα πια σαφές ότι στην πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων, η καρκινική εξαλλαγή σχετίζεται με την απενεργοποίηση των αποπτωτικών μονοπατιών (Kaufmann and Vaux, 2003; Salvesen and Abrams, 2004). Οπότε, αντικαρκινικά φάρμακα που μπορούν να επαναφέρουν τους μηχανισμούς της απόπτωσης, έχουν σημαντική θέση στη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου. Πράγματι, πολλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα που επάγουν την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα ή που παρεμβαίνουν σε ανασταλτικούς μηχανισμούς των κασπασών, οδηγούν σε υποστροφή του όγκου *in vivo* (Fulda et al., 2002). Επιθυμητός στόχος είναι η πρόκληση απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα, χωρίς να προκαλείται απόπτωση στους μη-καρκινικούς κυτταρικούς πληθυσμούς (Green and Evan, 2002).

1.17 Οι κασπάσες ως στόχοι φαρμακευτικής θεραπείας

Οι κασπάσες, ως πρωταγωνιστές του εκτελεστικού αποπτωτικού μηχανισμού, αποτελούν δυνητικό στόχο φαρμακευτικής ρύθμισης του κυτταρικού θανάτου, τόσο σε περιπτώσεις καρκίνου (MacKenzie and Clark, 2008; Melet et al., 2008; Okun et al., 2008; Tan and White, 2008), όσο και σε άλλες κατηγορίες νοσημάτων.

Αυξημένα επίπεδα δραστηριότητας των κασπασών παρατηρείται σε σημεία κυτταρικής βλάβης, σε σειρά νοσημάτων, όπως: σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, σε αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, σε σήψη, αλλά και σε νόσους όπως Alzheimer, Parkinson

και Huntington. Η αναστολή των κασπασών στις ασθένειες αυτές προβλέπεται να είναι θεραπευτικά ωφέλιμη. Παράλληλα, η ανακάλυψη φαρμάκων επιλεκτικής αναστολής των φλεγμονωδών κασπασών (κασπάσες -1, -4 και -5) ίσως να βοηθήσει στον έλεγχο αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Τέλος, η επιλεκτική ενεργοποίηση κασπασών θα μπορούσε να αποτελέσει μία προσέγγιση στην αντιμετώπιση του καρκίνου και χρόνιων ιογενών φλεγμονών.

Επί του παρόντος, η διερεύνηση άμεσων αναστολέων των κασπασών βρίσκεται στο επίκεντρο των ερευνών. Αποδείξεις επί αυτού έχουν προκύψει από τη χορήγηση μειωμένων δόσεων πεπτιδικών αναστολέων των κασπασών, όπως ο zVAD-fmk, σε τρωκτικά, με αποτέλεσμα την ουσιαστική προφύλαξη από εγκεφαλικό, μυοκαρδιακό έμφραγμα, ηπατική βλάβη, σήψη και σειρά άλλων νοσημάτων (Endres et al., 1998; Rabuffetti et al., 2000; Wiessner et al., 2000). Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί οι λεγόμενοι μικρομοριακοί, μη πεπτιδικοί αναστολείς των κασπασών, όπως ο IDN6556 (Pfizer), που βρίσκεται στη φάση II των κλινικών μελετών. Πρόκειται περί ενός αναστολέα κασπασών ευρέος φάσματος, που σχηματίζει μη αναστρέψιμη σύνδεση με κατάλοιπα κυστεΐνης του ενεργού κέντρου των κασπασών (Hoglen et al., 2004). Θεωρείται υποψήφιο για την αντιμετώπιση οξέων ιστικών βλαβών, που συνοδεύονται από εκτεταμένη απόπτωση. Ο αναστολέας χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση ηπατικών ασθενειών, όπως η ηπατίτιδα C και η ισχαιμική/reperfusion βλάβη στην ηπατική μεταμόσχευση. Μεταξύ των αναστολέων των φλεγμονωδών κασπασών, το VX-740 (Vertex Pharmaceuticals Inc.) είναι, επίσης, στη φάση II των κλινικών μελετών (Leung-Toung et al., 2002). Αναστέλλει επιλεκτικά και αναστρέψιμα την κασπάση-1 και αφορά χρήση στη ρευματοειδή αρθρίτιδα.

Όσον αφορά την στρατηγική επιλεκτικής ενεργοποίησης των κασπασών σε καρκινικά κύτταρα για την πρόκληση απόπτωσης, σημαντική συμβολή φάνηκε να έχει η προσέγγιση “forward chemical genetics” (Stockwell, 2000). Πρόκειται για τη διερεύνηση της ικανότητας μικρών μορίων να διαταράσσουν ενδοκυττάρια μονοπάτια και στη συνέχεια να αναγνωρίζουν ειδικούς στόχους των ενεργών μορφών τους. Μία σειρά τέτοιων υποψήφιων φαρμάκων για την επιλεκτική ενεργοποίηση της απόπτωσης, έχει βρεθεί από μόρια που ενεργοποιούν την κασπάση-3, ως κεντρική εκτελεστική κασπάση. Μεταξύ αυτών είναι: ένα μικρό μόριο, το PETCM [\square -(trichloromethyl)-4-pyridine ethanol] (Jiang et al., 2003), οι τάξεις των καρβαμιδικών αλάτων και της ινδόλης (carbamate and indolone classes of compounds) (Nguyen and Wells, 2003), καθώς και τα MX2167, MX116407, MX128504 και MX90745 (Maxim Pharmaceuticals. 2004. Annual Report 2004). Το

PETCM επιταχύνει το σχηματισμό του αποπτοσώματος, αλληλεπιδρώντας με τον αναστολέα prothymosin- α (Jiang et al., 2003), οι “carbamate and indolone classes of compounds” προωθούν τον ολιγομερισμό του Araf-1, οπότε και το σχηματισμό του αποπτοσώματος και την ενεργοποίηση των κασπασών -3 και -9 (Nguyen and Wells, 2003). Η δράση του MX2167 διαμεσολαβείται μέσω του υποδοχέα της τρανσφερρίνης, που υπερεκφράζεται σε πληθώρα όγκων. Το MX116407 είναι παράγοντας που στοχεύει αγγεία, ενώ ο MX128504 στοχεύει μία νέα κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, που επηρεάζει τα σηματοδοτικά μονοπάτια του IGF (insulin growth factor). Την ίδια στιγμή, όλα αυτά τα φάρμακα χαρακτηρίζονται από επιλεκτική επαγωγή απόπτωσης και ορισμένα εξ'αυτών βρίσκονται σε προκλινικό στάδιο ή στη φάση I των μελετών.

Στην στρατηγική της επιλεκτικής στόχευσης των καρκινικών κυττάρων, εντάσσεται και η χρήση αντισωμάτων που δεσμεύονται σε ενεργοποιημένες κασπάσες. Υπήρχαν αναφορές για μία χιμαιρική πρωτεΐνη, γνωστή ως immunocasp-3, αποτελούμενη από ένα μονής-αλυσίδας αντι-erbB2/HER2 αντισωμα, μία περιοχή μετατόπισης της εξωτοξίνης A της *Pseudomonas A* και ενεργοποιημένη κασπάση-3 (Jia et al., 2003a). Η immunocasp-3 φάνηκε να προσδένεται επιλεκτικά σε καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν erbB2/HER2, με αποτέλεσμα την εσωτερίκευσή της και τη λυσοσωμική της διάσπαση. Ένα καρβοξυτελικό τμήμα, εμπεριέχων κασπάση-3, απελευθερώνεται, μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα και επάγει απόπτωση. Σε επόμενη μελέτη έγινε αναφορά σε μία erbB2/HER2-στοχεύουσα immunocasp-6, που διασπά άμεσα την lamin A, οδηγώντας σε πυρηνική βλάβη και επαγωγή απόπτωσης (Xu et al., 2004). Οι μελέτες αυτές παρέχουν την πλατφόρμα για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών αντικαρκινικών σχημάτων, έναντι όγκων που υπερεκφράζουν erbB2/HER2.

Εκτός της άμεσης στόχευσης των κασπασών, μία άλλη στρατηγική είναι η ρύθμιση των κυτταρικών αναστολέων των κασπασών, όπως οι IAPs, c-FLIPs και Smac. Μερικοί καρκίνοι εμφανίζουν υπερέκφραση των IAPs, άρα και αντοχή στην απόπτωση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η IAP του μελανώματος (melanoma IAP ή MILAP ή livin/KIAP), που ανευρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στα κύτταρα μελανώματος (Vucic et al., 2000). Οπότε, στρατηγικές κατιούσας ρύθμισης των IAPs είναι σημαντικές, καθώς θα αυξήσουν τη δραστικότητα των κασπασών και την επαγόμενη απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Το XIAP μόριο μπορεί να επάγει άμεσα την απόπτωση, αλλά και να ευαισθητοποιήσει τα κύτταρα στη χημειοθεραπεία και την ακτινοβολία (Schimmer et al., 2004). Άλλη προσέγγιση είναι η εύρεση μικρών μορίων πρόσδεσης στις IAPs, με

αποτέλεσμα την αναστολή της ανασταλτικής τους δράσης (Glover et al., 2003; Schimmer et al., 2004; Tamm et al., 2003; Wu et al., 2003).

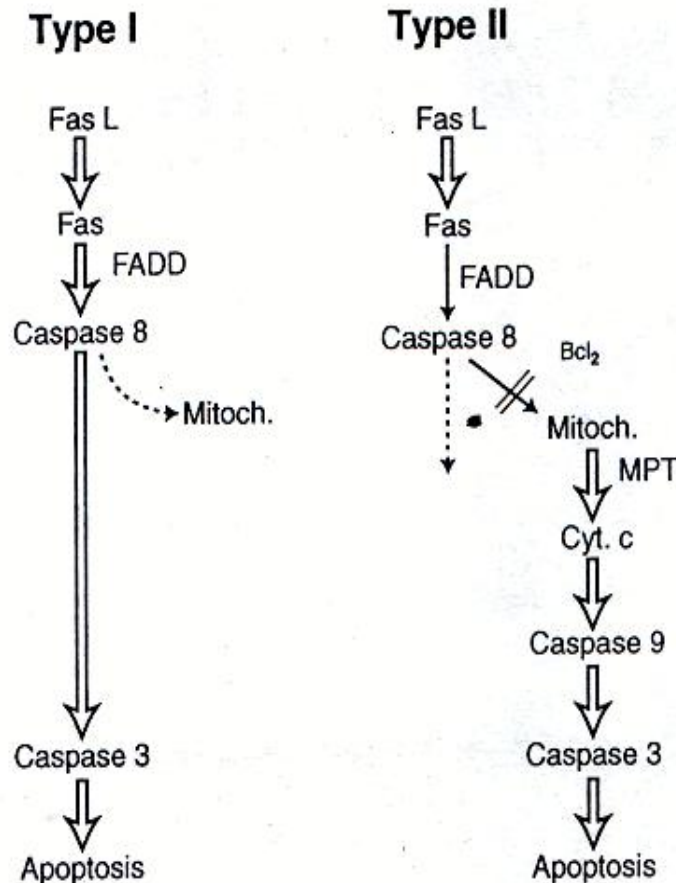
Με βάση την παρούσα κατάσταση της έρευνας στο πεδίο των κασπασών, ως στόχων φαρμακευτικών χειρισμών, ποικίλει η αξία κάθε στρατηγικής προσέγγισης. Αξιοσημείωτο παράδειγμα που δείχνει ότι η χρήση, για παράδειγμα, των αναστολέων των κασπασών, ίσως να μην είναι αποτελεσματική, αποτελεί η ενεργοποίηση κασπασο-ανεξάρτητου μηχανισμού κυτταρικού θανάτου, με την απελευθέρωση από τα μιτοχόνδρια, εκτός του κυτοχρώματος-c, του AIF και της ενδονουκλεάσης G (EndoG). Η καλύτερη κατανόηση των εναλλακτικών μηχανισμών κυτταρικού θανάτου, που ενεργοποιούνται στις περιπτώσεις αυτές, θα βοηθήσει σε πιο επιτυχή αντιμετώπιση, τόσο του καρκίνου, όσο και άλλων νοσημάτων (Vandenabeele et al., 2006). Ως πιο πολλά υποσχόμενη και πιο γρήγορα εφαρμόσιμη φαίνεται να είναι η στρατηγική επιλεκτικής ενεργοποίησης των κασπασών στα καρκινικά κύτταρα. Η χρήση τέτοιων παραγόντων σε συνδυασμό με κλασσική χημειοθεραπεία θα είναι πιθανώς αποτελεσματικότερη. Τέλος, περισσότερο δυνητικά εφαρμόσιμη στην κλινική πράξη είναι και η στρατηγική των αναστολέων των IAPs (Vucic, 2008).

1.18 Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και απόπτωση

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, φαίνεται να υπάρχουν δύο κατά βάση διαφορετικά μονοπάτια θανάτου από τον Fas υποδοχέα, που είναι χαρακτηριστικά ενός τύπου κυττάρου (Scaffidi et al., 1998). Στα τύπου I κύτταρα το σήμα θανάτου μεταβιβάζεται άμεσα από τις εναρκτήριοιες (κασπάση-8) στις εκτελεστικές κασπάσες (κασπάση-3). Στα τύπου II κύτταρα, τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν μέσω κατάλληλης παραγωγής σήματος από το DISC στα μιτοχόνδρια (πιθανώς μέσω Bid, Bax ή ceramide), για να προωθήσουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, το σχηματισμό του αποπτοσώματος και την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 (Σχήμα 20).

Τα ηπατοκύτταρα ανήκουν στον τύπο II φαινότυπο, όπως προκύπτει από το εύρημα ότι υπερέκφραση του Bcl-2 διαγονιδίου σε ήπαρ ποντικού προστατεύει έναντι της οξείας ηπατικής ανεπάρκειας, που προκύπτει από αγωνιστικά δρών anti-Fas μονοκλωνικό αντίσωμα. Ενώ, όμως, έχει φανεί *in vivo* ότι η απόπτωση του τύπου II ηπατοκυττάρου, απαιτεί την προαποπτωτική Bid πρωτεΐνη για μιτοχονδριακή σηματοδότηση, απομονωθέντα ηπατοκύτταρα ποντικού, καλλιιεργούμενα σε κολλαγόνο ή Matrigel,

εμφανίζουν Fas-ενεργοποιούμενη απόπτωση, ανεξάρτητη του Bid. Η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 γίνεται χωρίς διάσπαση του Bid και χωρίς Bax/Bak ενεργοποίηση ή απελευθέρωση κυτοχρώματος-c, ενώ ούτε η αφαίρεση του Bid ούτε η υπερέκφραση Bcl-2 λειτούργησε προστατευτικά. Η μετατροπή από τύπου II σε τύπου I κύτταρα, εξαρτάται από



Σχήμα 20. Υπάρχουν δύο κατά βάση διαφορετικά μονοπάτια θανάτου από τον Fas υποδοχέα. Στα τύπου I κύτταρα το σήμα θανάτου μεταβιβάζεται άμεσα από τις ενεργητικές (κασπάση-8) στις εκτελεστικές κασπάσες (κασπάση-3). Στα τύπου II κύτταρα, η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 γίνεται μετά από εμπλοκή της ενεργοποίησης των μιτοχονδρίων. (Karlowitz, 2000a)

την προσκολλητικότητα της εξωκυττάριας ουσίας, καθώς τα ηπατοκύτταρα σε διάλυμα πεθαίνουν με έναν Bid-εξαρτώμενο μηχανισμό. Επίσης, ο θάνατος ήταν Fas-L ειδικός, καθώς τα προσκολλημένα σε κολλαγόνο ηπατοκύτταρα, με έλλειψη του Bid, προστατεύονταν από την tumor necrosis factor alpha/actinomycin D (TNFalpha/ActD)-επαγόμενη απόπτωση (Walter et al., 2008).

Ο θάνατος του κυττάρου του ήπατος προκαλείται από μεγάλο αριθμό παραγόντων, που ξεκινούν είτε από το εξωκυτταρικό περιβάλλον είτε μέσα από το κύτταρο. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να συνδέονται με κυτταρικούς υποδοχείς και να οδηγούν σε έναν πρωτεολυτικό "καταρράκτη", που περιλαμβάνει τις "εναρκτήριες" και τις "εκτελεστικές" κασπάσες, και που τελικά οδηγεί στον αποπτωτικό θάνατο. Η διαφορά απόπτωσης και νέκρωσης έχει γίνει δυσδιάκριτη μετά την αναγνώριση ότι το ίδιο ερέθισμα μπορεί να προκαλέσει είτε μορφή κυτταρικής νέκρωσης είτε απόπτωση ανεξάρτητη κασπασών (Karlowitz, 2000b). Τα μιτοχόνδρια παίζουν καθοριστικό ρόλο στη μορφή του κυτταρικού θανάτου. Επιλεκτική απελευθέρωση μεσολαβητών ενισχύει το πρόγραμμα της απόπτωσης και έντονη απώλεια της μιτοχονδριακής λειτουργίας οδηγεί σε νέκρωση. Χημικά ενεργοί μεταβολίτες οξυγόνου και το μονοξειδίο του αζώτου συμμετέχουν ως εναρκτήριοι παράγοντες και ρυθμιστές (Karlowitz, 2000b).

Οι ασθένειες του ήπατος σχετίζονται συχνά με αυξημένη ηπατοκυτταρική απόπτωση, όπως στην ιογενή και αυτοάνοση ηπατίτιδα, στις χολοστατικές ασθένειες και σε μεταβολικές διαταραχές. Η διακοπή/αποδιοργάνωση της απόπτωσης ευθύνεται για άλλες ασθένειες, όπως για το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Χρήση και κατάχρηση συγκεκριμένων φαρμάκων, ειδικά του αλκοόλ, χημειοθεραπευτικών παραγόντων και ακεταμινοφαίνης έχουν συσχετισθεί με αυξημένη απόπτωση και ηπατική βλάβη (Neuman, 2001).

Η απόπτωση αποτελεί έναν φυσιολογικό μηχανισμό περιορισμού της περίσσειας των κυττάρων, τόσο κατά την ανάπτυξη του ήπατος, όσο και κατά την αναγέννησή του (Guicciardi and Gores, 2005). Ανεπαρκής απόπτωση έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη και εξέλιξη καρκινωμάτων του ήπατος και του χοληφόρου δέντρου (Fabregat et al., 2007; Guicciardi and Gores, 2005). Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, όντας ο 6^{ος} σε συχνότητα καρκίνος παγκοσμίως (Llovet and Bruix, 2008b), αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον, με σκοπό την αντιμετώπισή του. Πρόκειται για έναν ετερογενή όγκο που σχετίζεται με χρόνιες ηπατικές παθήσεις που συνήθως καταλήγουν σε κίρρωση, όπως η αλκοολική κίρρωση και οι χρόνιες λοιμώξεις από τον ιό της ηπατίτιδας Β και C.

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα είναι ανθεκτικό σε ποικιλία παραγόντων, που δρουν μέσω υποδοχέων θανάτου. Η πλειοψηφία των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων εμφανίζουν μία ή περισσότερες μεταβολές στα μόρια του Fas σηματοδοτικού μονοπατιού, που αναστέλλουν την Fas-επαγόμενη απόπτωση (Lee et al., 2001). Η κατάσταση του Fas και η έκφραση Fas συνδέτη (FasL) μπορούν να προβλέψουν υποτροπή (Ito et al., 2000b). Η απώλεια ανταπόκρισης του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος στο Fas, μπορεί να προκύπτει

είτε με αρνητική ρύθμιση της έκφρασης Fas (Lee et al., 2001;Shin et al., 1998), με συνοδό μειωμένη έκφραση "downstream" μορίων, όπως FADD ή FLICE (Shin et al., 1998), είτε με θετική ρύθμιση ή υπερενεργοποίηση αντι-αποπτωτικών μορίων, όπως ο nuclear factor-kappaB (NF-κB), το Bcl-2 ή το Bcl-XL (Lian et al., 2001;Otsuka et al., 2002;Takahashi et al., 1999). Η ανασταλτική της κασπάσης-8 ενδοκυττάρια κυτταρική πρωτεΐνη, FLICE/caspase-8-inhibitory protein (cFLIP), εκφράζεται ιδιοσυστασιακά στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και βρίσκεται σε υψηλότερα ποσοστά σε ιστούς ηπατοκυτταρικού καρκινώματος από ότι σε μη καρκινικούς, ηπατικούς ιστούς (Okano et al., 2003). Έχει, επίσης, περιγραφεί υπερέκφραση της BRE αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης, η οποία προσδένεται στο κυτταροπλασματικό τμήμα των TNF-R1 και Fas, εξασθενώντας την επαγόμενη από υποδοχέα θανάτου απόπτωση (Chan et al., 2008). Αλλά και εξωκυττάριοι παράγοντες φαίνεται να επιδρούν στην Fas επαγόμενη απόπτωση των κυττάρων ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HKC). Ο ηπατοκυτταρικός παράγοντας ανάπτυξης (hepatocyte growth factor ή HGF), μέσω ενεργοποίησης του PI3K/AKT μονοπατιού, καταστέλλει την Fas-επαγόμενη απόπτωση, αναστέλλοντας το σχηματισμό του DISC συμπλέγματος, και ειδικότερα την αλληλεπίδραση FADD και κασπάσης-8 (Suzuki et al., 2000). Ο TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) επάγει επιλεκτικά απόπτωση σε ποικιλία εξαλλαχθέντων κυτταρικών σειρών, αλλά όχι στους περισσότερους φυσιολογικούς ιστούς (Johnstone et al., 2008). Τα κύτταρα του HKC εκφράζουν ιδιοσυστασιακά mRNA και TRAIL πρωτεΐνη, αλλά είναι αλληλοσυγκρουόμενα τα δεδομένα ως προς την έκφραση των TRAIL υποδοχέων σε κύτταρα και ιστούς HKC (Chen et al., 2003;Herr et al., 2007;Shiraki et al., 2005b). Συγκεκριμένα δεδομένα δείχνουν ότι τα περισσότερα κύτταρα HKC είναι ανθεκτικά στην TRAIL-επαγόμενη απόπτωση, αναδεικνύοντας ότι η παρουσία μεσολαβητών μπλοκάρει το συγκεκριμένο μονοπάτι (Chen et al., 2003;Herr et al., 2007). Έχει, ακόμα, αναφερθεί ότι η πυρηνική πρωτεΐνη της ηπατίτιδας B (hepatitis B virus core protein) αναστέλλει την TRAIL-επαγόμενη απόπτωση, μπλοκάροντας την έκφραση του TRAIL receptor 2 (TRAIL-R2/DR5) (Du et al., 2009). Η υπερέκφραση των NF-κB και Bcl-XL μπορεί, επίσης, να αναχαιτίζει την TRAIL-επαγόμενη απόπτωση (Zender et al., 2005), ενώ αρκετές είναι οι φαρμακευτικές απόπειρες ευαισθητοποίησης του HKC στην TRAIL-επαγόμενη απόπτωση, με τη συνδυασμένη χορήγηση χημειοθεραπευτικών παραγόντων (Yamanaka et al., 2000).

Πολλές γενετικές μεταβολές του HKC οδηγούν σε διαταραχή της ισορροπίας των προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών μορίων της Bcl-2 οικογένειας (Mott and Gores,

2007). Το Bcl-XL υπερεκφράζεται σε ένα μεγάλο ποσοστό ΗΚΚ (Takehara et al., 2001), όπως και το Mcl-1 (Sieghart et al., 2006). Αντίθετα, προαποπτωτικά μόρια, όπως το Bax ή το Bcl-XS έχουν υποστεί αρνητική ρύθμιση, με δυσλειτουργία στο p53 μονοπάτι (Beerheide et al., 2000). Τελευταία δεδομένα έδειξαν ότι ορισμένα προ-αποπτωτικά μόρια της BH3-μόνο περιέχουσας οικογένειας πρωτεϊνών, όπως το Bid, εμφανίζουν μειωμένη έκφραση σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα λόγω χρόνιας λοίμωξης από ηπατίτιδα Β ή C (Chen et al., 2001a). Επιπρόσθετα, σε τελευταίες έρευνες φάνηκε ότι το 90% των καρκινωμάτων, σε ασθενείς με προχωρημένο ΗΚΚ, εκφράζουν υψηλά ποσοστά του X-linked inhibitor-of-apoptosis protein (XIAP), ενός γνωστού αναστολέα των κασπασών. Μελέτες καλά προσδιοριζόμενων κυτταρικών σειρών ΗΚΚ, όσον αφορά τη μεταστατική τους ικανότητα, έδειξαν συσχέτιση της μετάστασης με αντοχή στην απόπτωση και αυξημένη έκφραση της XIAP (Shi et al., 2008). Η υπερέκφραση αυτή ίσως οδηγεί και στην αντοχή στην επαγόμενη από TGF- β απόπτωση, δίνοντας μεταναστευτική και διεισδυτική δυνατότητα στον όγκο. Η υπερέκφραση της χρωμοσωμικής περιοχής 11q22, που είναι υπεύθυνη για την cIAP1 πρωτεΐνη, έναν γνωστό αποπτωτικό αναστολέα, είναι ένα από τα υποψήφια υπεύθυνα ογκογονίδια (Zender et al., 2006). Η survivin, επίσης, ένας ακόμα αναστολέας της απόπτωσης, υπερεκφράζεται σε κύτταρα ΗΚΚ και σε ιστούς (Ito et al., 2000a; Llovet et al., 2006) και ίσως να παίζει ρόλο στην μετάσταση (Zhu et al., 2005), όχι μόνο αναστέλλοντας την απόπτωση (Duan et al., 2005), αλλά επάγοντας και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Ito et al., 2000a). Άρα, εύκολα διακρίνεται η υπεροχή αντι-αποπτωτικών έναντι προ-αποπτωτικών παραγόντων, με αποτέλεσμα την επιβίωση και εξάπλωση του όγκου.

Μία από τις πιο κοινές μεταβολές που παρατηρούνται στο ΗΚΚ είναι οι μεταλλάξεις του p53 ογκοκατασταλτικού γονιδίου (tumor suppressor gene, *TP53*) (Hussain et al., 2007). Πολλοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες απαιτούν το p53 για να επάγουν απόπτωση. Γενικά, όγκοι με διαταραγμένο p53 μονοπάτι, είναι ανθεκτικοί στη χημειοθεραπεία. Χρόνια λοίμωξη από ηπατίτιδα Β και C και έκθεση σε οξειδωτικό στρες, όπως αιμοχρωμάτωση ή φλεγμονή, οδηγεί σε βλάβη του DNA και σε μεταλλάξεις ογκογονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του *TP53*. Πρόσφατα φάνηκε (Farazi et al., 2006) ότι η επίδραση της απώλειας του p53 σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα λόγω χρόνιας ηπατικής νόσου, εξαρτάται από το περιβάλλον και συγκεκριμένα από τα ακέραια ή δυσλειτουργικά τελομερή, οπότε και μειωμένη λειτουργία του p53, επί παρουσίας χρωμοσωμικής αστάθειας λόγω τελομερών, μπορεί να έχει αποτέλεσμα την ηπατοκυτταρική επιβίωση. Η

χρήση ανασυνδυσμένου p53, μέσω αδενοϊού, έχει θέση στην αντιμετώπιση του ΗΚΚ (Guan et al., 2007).

Η οικογένεια των κυτταροκινών του transforming growth factor-beta (TGF-β), παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυική ανάπτυξη και η απορρύθμισή του μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση (Massague, 2008). Ο TGF-β-1 είναι ένας σημαντικός κατασταλτικός ρυθμιστής των ηπατοκυττάρων, εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό (Carr et al., 1986) και επάγοντας κυτταρικό θάνατο (Carr et al., 1986). Συμμετέχει, όμως, και σε προ-καρκινικές διαδικασίες, όπως η διεισδυτικότητα, η ανοσολογική ρύθμιση ή η τροποποίηση του μικροπεριβάλλοντος (Massague, 2008). Η αποφυγή της αντιπολλαπλασιαστικής και προ-αποπτωτικής δράσης του TGF-β, ίσως να αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την πρόοδο του ΗΚΚ (Yang et al., 2006). Διάσπαση του TGF-β μονοπατιού παρατηρείται στο ΗΚΚ και ίσως να προκαλεί απορρύθμιση της απόπτωσης (Caja et al., 2007; Ito et al., 1991).

Αρκετά είναι, επίσης, τα μόρια που μεταβάλλονται και συμβάλλουν στην ενίσχυση αντιαποπτωτικών σημάτων στο ΗΚΚ, βοηθώντας στην επιβίωση, μετά από προαποπτωτικά ερεθίσματα. Η έκφραση και/ή ενεργοποίηση των JAK/STAT, PI3K/AKT και RAS/ERKs μονοπατιών είναι ενισχυμένη σε πολλά κύτταρα ΗΚΚ, καθιστώντας τα ανθεκτικά σε αποπτωτικά ερεθίσματα. Οι ενεργοποιητές του EGF receptor (EGFR), με αυτοκρινή δράση, ίσως να προστατεύουν τα κύτταρα του όγκου, από απόπτωση προκαλούμενη από στρες, φυσιολογικούς παράγοντες ή προαποπτωτικά φάρμακα (Ortiz et al., 2008). Η τυροσίνη-κινάση p60c-src, επίσης, υπερεκφράζεται σε ανθρώπινα ΗΚΚ (Breuhahn et al., 2006; Llovet and Bruix, 2008a), που προστατεύονται από ερεθίσματα κυτταρικού θανάτου (De Toni et al., 2007), ενώ ευθύνεται κατά πολύ για την απευαισθητοποίηση των ηπατικών κυττάρων στα TRAIL και CD95. Οι signal transducer and activator of transcription (STAT) πρωτεΐνες ενεργοποιούνται από τυροσινικές κινάσες, σε απάντηση κυτταροκινών ή παραγόντων ανάπτυξης. Η αποσιώπηση παραγόντων αρνητικής ρύθμισης του JAK2-STAT σηματοδοτικού μονοπατιού, οδηγεί σε ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση των STAT3 σε κύτταρα και ιστούς ΗΚΚ (Niwa et al., 2005; Yoshikawa et al., 2001). Το ενεργοποιημένο RAS ογκογονίδιο συνεργάζεται με την HBx πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας-B για τη μεταμόρφωση των κυττάρων, καταστέλλοντας την HBx-επαγόμενη απόπτωση (Kim et al., 2001), οδηγώντας στην επιβίωση προνεοπλασματικών ηπατοκυττάρων ΗΚΚ, προερχόμενου από HBV ή HCV. Επίσης, σε κυτταρική σειρά ΗΚΚ που εκφράζει διαρκώς τον ιό της ηπατίτιδας B (HepG2.215, με ενσωματωμένο γονιδίωμα HBV), φάνηκε

σημαντική αύξηση των cIAP2 και cIAP1 ανασταλτικών πρωτεϊνών της απόπτωσης σε σχέση με τα προγονικά HepG2, πιθανολογώντας ότι μακρόχρονη HBV φλεγμονή μπορεί να οδηγεί σε υπερέκφραση αναστολέων της απόπτωσης, οδηγώντας τελικά στην γένεση του ΗΚΚ (Lu et al., 2005).

1.19 Ηπατική φλεγμονή και ανοχή στην απόπτωση

Πρόσφατα άρχισε η κατανόηση των μηχανισμών σύνδεσης φλεγμονής και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Naugler and Karin, 2008). Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η φλεγμονή προωθεί την καρκινογένεση και η σηματοδότηση του NF-κB πρωταγωνιστεί (Naugler and Karin, 2008). Διάφορες μελέτες εμπλέκουν την NF-κB/Rel οικογένεια στην ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος από HBV και HCV (Arsura and Cavin, 2005), ενώ διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για την NF-κB ενεργοποίηση από ηπατοτρόπους ιούς. Η φλεγμονώδης ηπατίτιδα φαίνεται να ενεργοποιεί τον NF-κB με τη συγχρονισμένη δράση TNF- α , χημειοκινών, ιντερλευκινών και ικόν πρωτεϊνών, που πιθανώς θα προωθήσουν την κυτταρική επιβίωση προκαρκινικών ηπατοκυττάρων (Arsura and Cavin, 2005). Ένας σημαντικός ρόλος του NF-κB στην αναστολή της c-Myc-επαγόμενης απόπτωσης, έχει θεωρηθεί καθοριστικός για την ηπατοκαρκινογένεση (Qiao et al., 2006). Δύο προ-επιβιωτικοί στόχοι του NF-κB είναι το Bcl-XL και ο αναστολέας XIAP, που συχνά υπερεκφράζονται σε ανθρώπινα ΗΚΚ (Shi et al., 2008; Takehara et al., 2001). Παράλληλα, μελέτες της χρήσης μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (non-steroidal anti-inflammatory drugs ή NSAIDs) που δρουν αναστέλλοντας την κυκλοξυγενάση (COX), η οποία όταν υπερεκφράζεται επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση μέσω ενεργοποίησης του Akt (Leng et al., 2003), έδειξαν επαγωγή απόπτωσης και αναστολή πολλαπλασιασμού στο ΗΚΚ (Kern et al., 2002). Οι COX-2 προκαλούν απόπτωση στο ΗΚΚ πιθανώς μέσω υποδοχών θανάτου και μιτοχονδρίων (Kern et al., 2006).

1.20 TNF-alpha και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ)

Ο TNF-alpha είναι συνδέτης υποδοχέα κυτταρικού θανάτου, επάγοντας την απόπτωση με τον εξωκυττάρια ενεργοποιούμενο μηχανισμό. Έχει μεγάλο εύρος βιολογικών δράσεων, παίζοντας καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής διαφοροποίησης και του κυτταρικού θανάτου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκάλεσε το εύρημα της επιλεκτικής απόπτωσης καρκινικών κυττάρων, μετά από επίδραση TNF-alpha. Ο TNF-alpha μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο με τη μορφή απόπτωσης, νέκρωσης ή συνδυσασμού (Beutler and Cerami, 1986; Park et al., 1996). Η εμφάνιση απόπτωσης ή νέκρωσης φαίνεται να εξαρτάται από την κυτταρική σειρά που εμπλέκεται και από την παρουσία μεταβολικών αναστολέων (Halicka et al., 1995). Ο TNF-alpha επάγει απόπτωση σε ποικιλία καρκινικών κυττάρων, ενώ άλλα απαιτούν μεταγραφική αναστολή (Leist et al., 1994).

Τα κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HepG2, Huh7), υπό την επίδραση TNF-alpha και κυκλοεξιμίδης (αναστολέας της μετάφρασης), οδηγούνται σε απόπτωση, μέσω ενεργοποίησης της κινάσης JNK (MAP κινάσης) (Liedtke et al., 2002). Τα SMMC-7721 κύτταρα HKK ήταν ανθεκτικά στον TNF-alpha, αλλά οδηγήθηκαν γρήγορα σε απόπτωση, υπό την επίδραση TNF-alpha και κυκλοεξιμίδης (Fang et al., 2001). Πολλοί παράγοντες, μεταξύ των οποίων και ο TNF-alpha, οδηγούν έμμεσα στην ενδοκυττάρια παραγωγή αντιδραστικών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species ή ROS) ενώ, τόσο οι ROS μεμονωμένα (Li et al., 2000; Ren et al., 1998) όσο και ο TNF-alpha μέσω παραγωγής ROS, φαίνεται ότι μπορούν να επάγουν απόπτωση σε κύτταρα HKK (Li et al., 2001a; Murray et al., 1997). Η καταλάση, όταν υπερεκφράζεται στο κυτταροπλασματικό και ιδιαίτερα στο μιτοχονδριακό τμήμα κυττάρων HKK, ενισχύει την επαγόμενη από τον TNF-alpha απόπτωση και την ενεργοποίηση των κασπασών (μελέτη με αναστολέα πανκασπάσης), απομακρύνοντας το H₂O₂ (Bai and Cederbaum, 2000). Επιπρόσθετα, η βιολογική δράση του TNF-alpha είναι άμεσα εξαρτώμενη από την αλληλεπίδρασή του με ειδικούς κυτταρικούς υποδοχείς. Δύο διαφορετικοί υποδοχείς, 60 και 80 kDa, έχουν περιγραφεί. Τα HepG2 κύτταρα εκφράζουν τον p60 υποδοχέα και βρέθηκε ότι είναι ανθεκτικά στην επίδραση του TNF-alpha, αλλά πολύ ευαίσθητα στην αντιπολλαπλασιαστική δράση του αντίστοιχου αντισώματος (anti-p60). Παράλληλα, η κυκλοεξιμίδα ενίσχυσε το TNF-alpha-μεσολαβούμενο αποτέλεσμα, αλλά όχι το αποτέλεσμα του anti-p60 (Totpal et al., 1994). Έχει βρεθεί, ακόμα, ότι ένα βήμα ρυθμιζόμενο από την PI3-κινάση στην TNF-alpha σηματοδότηση, είναι καθοριστικό για την έκφραση των NF-kappa B-εξαρτώμενων γονιδίων (αντιαποπτωτικών γονιδίων) (μελέτη σε HepG2, transfected με το (NFkB)₃/CAT

reporter gene, και σε U937 κύτταρα) (Reddy et al., 2000). Να σημειωθεί ότι η έκφραση TNF-alpha και η εμφάνιση απόπτωσης ήταν αυξημένη σε καρκινικά κύτταρα, που επώαστηκαν με υπερκείμενα διαλύματα από καλλιέργειες διεγερμένων κυττάρων Kupffer, συγκριτικά με καρκινικά κύτταρα, τα οποία δεν επώαστηκαν με τίποτα.

Όσον αφορά τα ηπατοκύτταρα, ο TNF-alpha επιφέρει κυτταρικό θάνατο σε ηπατοκύτταρα, όπου έχουμε προηγουμένως επιδράσει με τους μεταγραφικούς αναστολείς actinomycin D (ActD), D-galactosamine, ή alpha-amanitin, ενώ οι αναστολείς της μετάφρασης, όπως η cycloheximide (CHX) ή η puromycin δεν ευαισθητοποίησαν τα ηπατοκύτταρα έναντι του TNF-alpha. Αντιθέτως, οι παράγοντες αυτοί παρεμπόδισαν την ηπατοτοξικότητα, την προκαλούμενη από ActD/TNF (Leist et al., 1994). Τέλος, η ενεργοποίηση των Kupffer, ο TNF-alpha και η ενεργοποίηση κασπασών μετά τον TNFR1, φάνηκαν να αναμειγνύονται στην προκαλούμενη από LPS απόπτωση των ηπατοκυττάρων (Hamada et al., 1999).

Η κατανόηση των μηχανισμών ηπατικής βλάβης που προκαλείται μέσω των υποδοχέων κυτταρικού θανάτου, θα βελτιώσει τις θεραπευτικές στρατηγικές αντιμετώπισης των ηπατικών νοσημάτων και, ιδιαίτερα, του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Akazawa and Gores, 2007).

1.21 Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και φαρμακευτική προσέγγιση, σχετιζόμενη με την απόπτωση

Συχνά η απόπτωση ενός κυττάρου προηγείται της επίδρασης ενός κυτταροτοξικού φαρμάκου. Η αναστολή της απόπτωσης μέσω Bcl-2 μπορεί να αναστείλλει την αποπτωτική διαδικασία, αλλά ο θάνατος μπορεί να επέλθει με νεκρωτική μορφολογία. Αν η φαρμακευτική θεραπεία ή η ανοξία είναι παροδική, η αναστολή της απόπτωσης μπορεί να αποτρέψει ολοκληρωτικά τον θάνατο. Ένα κύτταρο μπορεί να ξεκινήσει τη διαδικασία της απόπτωσης, ανιχνεύοντας τις πρώιμες αλλαγές της επίδρασης κάποιου φαρμάκου, ως αλλαγές οφειλόμενες σε κάποιον ιό. Οπότε είναι λάθος να νομίσουμε ότι ένας παράγοντας ανήκει στο σηματοδοτικό μηχανισμό, ενώ στην πραγματικότητα ανήκει στη σύνθεση ενός αρχικού ερεθίσματος. Η βασική δομή του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου έχει διατηρηθεί εξελικτικά, αλλά τα θηλαστικά εμφανίζουν ποικιλία ισομορφών του βασικού μονοπατιού, με πιθανώς ανεξάρτητη ρύθμιση. Η λεπτομερής κατανόηση των μηχανισμών αυτών, ίσως να επιτρέψει την παρασκευή φαρμάκων που θα ενισχύουν ή θα αναστέλλουν

τον κυτταρικό θάνατο, επιλεκτικά, με σκοπό την αντιρρόπηση της απόπτωσης όπου απορρυθμίζεται και οδηγεί σε αντίστοιχα νοσήματα.

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) εμφανίζει ενεργοποίηση πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως μέσω epidermal growth factor receptor (EGFR), Ras/extracellular signal-regulated kinase, phosphoinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin (mTOR), hepatocyte growth factor/mesenchymal-epithelial transition factor, Wnt, Hedgehog και αποπτωτικής σηματοδότησης. Πρόσφατα, ένας αναστολέας πολυκινασών, η sorafenib, έχει δείξει οφέλη σε ασθενείς με προχωρημένο ΗΚΚ, αποδεικνύοντας ότι οι μοριακές θεραπείες ίσως να είναι αποτελεσματικές στο ΗΚΚ. Μελέτες φάσης II έχουν ελέγξει φάρμακα που αναστέλλουν τον EGFR, τον vascular endothelial growth factor/platelet-derived growth factor receptor και την mTOR σηματοδότηση, ενώ δεν υπάρχουν δεδομένα για συνδυαστικές θεραπείες. Μελλοντικές έρευνες αναμένεται να οδηγήσουν στην εύρεση ουσιών με δυνατότητα αναστολής συγκεκριμένων μονοπατιών, ενώ η μοριακή ταξινόμηση του ΗΚΚ, βασιζόμενη σε γονιδιακή ταυτοποίηση των ασθενών θα οδηγήσει στην εξατομίκευση της θεραπείας (Llovet and Bruix, 2008a). Επίσης, η ευαισθητοποίηση των μιτοχονδρίων με τη χρήση φαρμάκων που οδηγούν σε ενδοκυττάριο οξειδωτικό στρες, μπορεί να αποτελεί μία στρατηγική αντιμετώπισης νοσημάτων, όπως το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Gogvadze and Zhivotovsky, 2007).

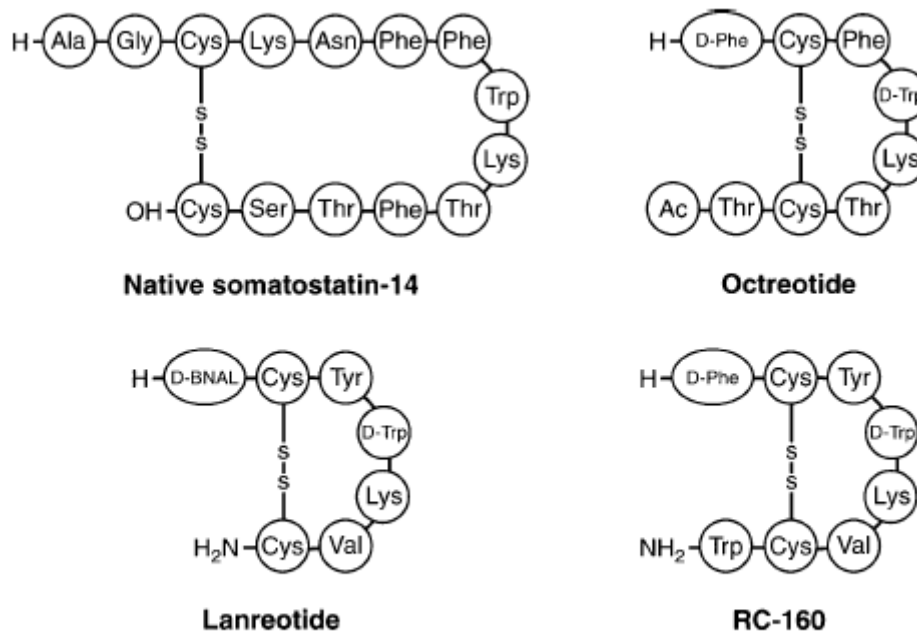
Συμπερασματικά, η διερεύνηση των αποπτωτικών μηχανισμών, που ενεργοποιούνται μετά από επίδραση διαφόρων παραγόντων, σε HepG2 κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, σκοπό έχει να σκιαγραφήσει τις διαφοροποιήσεις στο βασικό αποπτωτικό σηματοδοτικό μονοπάτι και να οδηγήσει στους ανάλογους φαρμακευτικούς συνδυασμούς κλινικής αποτελεσματικότητας.

1.22 Σωματοστατίνη (somatostatin ή SST)

Τα φυσικά πεπτίδια σωματοστατίνης, γνωστά και ως παράγοντες αναστολής της απελευθέρωσης σωματοτροπίνης, έχουν ποικιλία διαφορετικών βιολογικών δράσεων, ανάλογα με το είδος του κυττάρου και του οργάνου του ανθρώπινου οργανισμού που εξετάζεται. Παράγονται από φυσιολογικά κύτταρα του ενδοκρινικού, γαστρεντερικού, ανοσολογικού και νευρικού συστήματος, αλλά και από κάποιους όγκους (Froidevaux and Eberle, 2002;Patel, 1999). Οι επιδράσεις των σωματοστατινών είναι ευρέως ανασταλτικοί

της έκκρισης ορμονών, αλλά και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής επιβίωσης. Αναστέλλουν τόσο ενδοκρινείς εκκρίσεις (π.χ. αυξητική ορμόνη, ινσουλίνη, γλουκαγόνο, γαστρίνη, χολοκυστοκυνίνη, αγγειοδιασταλτικό εντερικό πεπτίδιο και σεκρετίνη), όσο και εξωκρινείς (π.χ. γαστρικό οξύ, εντερικό υγρό και παγκρετικά ένζυμα) (Patel, 1999). Επίσης, αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων (Bousquet et al., 2001). Είναι πεπτίδια, που αρχικά συντίθενται ως μεγάλα πρόδρομα μόρια, τα οποία υφίστανται ιστο-ειδική εκφύλιση, ώστε οδηγούν στο σχηματισμό είτε σωματοστατίνης-14 είτε σωματοστατίνης-28. Παράλληλα, περαιτέρω ενζυματική εκφύλιση μειώνει τη δραστηριότητά τους ή τις καθιστά τελείως ανενεργές. Αυτό επισυμβαίνει σύντομα, ώστε τα φυσικά πεπτίδια σωματοστατίνης έχουν μικρό χρόνο ημίσειας ζωής (<3 λεπτά). Η διπλή δράση των φυσικών σωματοστατινών (αναστολή ορμονικής έκκρισης και κυτταρικής ανάπτυξης) τις κατέστησε ισχυρά υποψήφια αντικαρκινικά φάρμακα, αλλά και φάρμακα για την αντιμετώπιση νευροενδοκρινικών διαταραχών. Παρά ταύτα, ο μικρός χρόνος ζωής τους, αποτέλεσε φραγμό στην περαιτέρω θεραπευτική τους χρήση.

Τα συνθετικά παράγωγα σωματοστατίνης έχουν παρόμοια δράση με τη φυσική σωματοστατίνη, αλλά έχουν μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής. Μεταξύ εκατοντάδων συνθετικών αναλόγων σωματοστατίνης, δύο χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη: η οκτρεοτίδη (octreotide) και η λανρεοτίδη (lanreotide) (Σχήμα 21). Ένα τρίτο ανάλογο, η βαπρεοτίδη (vapreotide ή RC-160) έχει καλώς χαρακτηριστεί σε προκλινικές μελέτες και έχει εφαρμοστεί σε κλινικές δοκιμές (Gonzalez-Barcena et al., 2003). Στα ανάλογα σωματοστατίνης απουσιάζουν τα σημεία κλειδιά της ενζυμικής τους διάσπασης, καθιστώντας τα πιο σταθερά από τη φυσική σωματοστατίνη. Οπότε και έχουν σχετικά αυξημένο χρόνο ημιζωής (περί τα 90 λεπτά για την οκτρεοτίδη). Τα μακράς-δράσης ανάλογα της οκτρεοτίδης και της λανρεοτίδης πρέπει να χορηγούνται μόνο μία φορά εβδομαδιαίως, για 4 εβδομάδες.



Σχήμα 21. Χημική δομή της σωματοστατίνης-14 και των συνθετικών αναλόγων: οκτρεοτίδης, λανρεοτίδης και RC-160 (βαπρεοτίδης) (Susini and Buscail, 2006).

Οι δράσεις των πεπτιδίων σωματοστατίνης μεσολαβούνται μέσω αλληλεπίδρασης με ειδικούς υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Πέντε διακριτοί υποδοχείς σωματοστατίνης (somatostatin receptors ή SSTRs) έχουν χαρακτηριστεί επαρκώς (Patel, 1999). Οι σωματοστατίνες -14 και -28 έχουν σχεδόν ισόβαθμη συγγένεια για όλους τους υποδοχείς (αν και η σωματοστατίνη-28 έχει λίγο υψηλότερη συγγένεια με τον SSTR5). Τα συνθετικά ανάλογα οκτρεοτίδη, λανρεοτίδη και RC-160 προσδέονται εκλεκτικά στους SSTR2 και SSTR5, ενώ εμφανίζουν μέτρια συγγένεια για τον SSTR3 και χαμηλή για τους SSTR1 και SSTR4 (Πίνακας 4) (Bruns et al., 2002; Patel, 1997; Patel, 1999).

Πίνακας 4. Συγγένεια πρόσδεσης της φυσικής σωματοστατίνης-14 και των συνθετικών αναλόγων με τους πέντε υποτύπους υποδοχέων σωματοστατίνης (Susini and Buscail, 2006).

	sst ₁	sst ₂	sst ₃	sst ₄	sst ₅
Binding affinities (IC ₅₀ values; nmol/l)					
Somatostatin-14	0.93	0.15	0.56	1.5	0.29
Synthetic analogs					
Octreotide	280	0.38	7.1	>1000	6.3
Lanreotide	180	0.54	14	230	17
SOM230	9.3	1.0	1.5	>1000	0.16
RC-160 ^a	>1000	5.4	31	45	0.7

Στρατηγικές μοριακής μηχανικής οδήγησαν στην ανακάλυψη πεπτιδίων και μη πεπτιδικών ουσιών είτε με υψηλή συγγένεια για έναν υποδοχέα είτε με υψηλή συγγένεια για δύο ή περισσότερους υποδοχείς είτε για καθολική πρόσδεση. Τέτοιες ουσίες, όπως ο πολλαπλός συνδέτης υποδοχέων σωματοστατίνης, ο SOM230, βρίσκονται σε προκλινική εκτίμηση ή σε πρώιμο στάδιο κλινικών δοκιμών (Bruns et al., 2002; Weckbecker et al., 2003).

Η οκτρεοτίδη και η λανρεοτίδη έχουν έγκριση χρήσης για τον έλεγχο των ορμονικών συμπτωμάτων σε περιπτώσεις αδενωμάτων της υπόφυσης. Μειώνουν και κανονικοποιούν την υπέρμετρη έκκριση αυξητικής ορμόνης και τα επίπεδα του insulin like growth factor (IGF-1), που σχετίζεται με ακρομεγαλία, ενώ μειώνουν το μέγεθος του όγκου (Ben-Shlomo and Melmed, 2003; Cozzi et al., 2003; Freda, 2002). Οι όγκοι της υποφύσεως εκφράζουν όλους τους υποδοχείς σωματοστατίνης εκτός του SSTR4, ενώ ποικιλία έκφρασης εμφανίζεται μεταξύ υποτύπων αδενωμάτων της υπόφυσης. Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας της ακρομεγαλίας με ανάλογα σωματοστατίνης βασίζεται στην έκφραση των SSTR2 και SSTR5, που επικρατούν στα εκκρίνοντα αυξητική ορμόνη αδενώματα (Heaney and Melmed, 2004; Jaquet et al., 2000). Επίσης, τόσο η οκτρεοτίδη όσο και η λανρεοτίδη έχουν θέση στη θεραπεία γαστροεντεροπαγκρεατικών (gastroenteropancreatic ή GEP) ενδοκρινικών όγκων (Aparicio et al., 2001; Garland et al., 2003; Oberg, 2001). Κάθε GEP όγκος εκφράζει πάνω από έναν υπότυπο υποδοχέα σωματοστατίνης, με τον SSTR2 να αποτελεί τον συχνότερα εκφραζόμενο υπότυπο (Reubi et al., 1994). Η ανοσοϊστοχημεία και η αυτοραδιογραφία έχει αποκαλύψει την υψηλή έκφραση SSTR πρωτεϊνών σε γαστρινώματα, ινσουλινώματα, καρκινοειδείς όγκους και στις μεταστάσεις τους, με ομοιογενή κατανομή υποδοχέων. Η συχνότητα και το μοτίβο έκφρασης των διαφόρων υποτύπων ποικίλει μεταξύ διαφορετικών όγκων, αλλά και μεταξύ των ασθενών (Fjallskog et al., 2003; Janson et al., 1998; Kulaksiz et al., 2002; Papotti et al., 2002). Οι αδιαφοροποίητοι GEP ενδοκρινικοί όγκοι εκφράζουν SSTR σε χαμηλότερη πυκνότητα, σε σύγκριση με καλά διαφοροποιημένους όγκους. Σε μελέτες της έκφρασης αυτής, η πλειοψηφία των όγκων εκφράζει SSTR2, ακολουθούμενο από τους SSTR1, SSTR5 και SSTR3, ενώ ο SSTR4 εκφράζεται στη μειοψηφία αυτών (Kulaksiz et al., 2002; Reubi and Waser, 2003).

1.23 Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και σωματοστατίνη

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ ή hepatocellular carcinoma ή HCC) είναι ο πέμπτος συχνότερος συμπαγής όγκος παγκοσμίως και η τέταρτη αιτία θανάτου-σχετιζόμενου με καρκίνο (Thomas and Zhu, 2005). Το 80% των νέων περιπτώσεων εμφανίζεται σε αναπτυσσόμενες χώρες, ενώ την ίδια στιγμή η επίπτωσή του αυξάνεται στις αναπτυγμένες χώρες (Llovet et al., 2003; Thomas and Zhu, 2005), σε συνάρτηση με την επιδημιολογία των λοιμώξεων από τους ιούς της ηπατίτιδας Β (hepatitis B virus ή HBV) και της ηπατίτιδας C (hepatitis C virus ή HCV) (Bosch et al., 2004). Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων το ΗΚΚ αναπτύσσεται σε κίρρωτικούς ασθενείς, με την κίρρωση να αποτελεί τον ισχυρότερο προδιαθεσικό παράγοντα (Llovet et al., 2003). Ωστόσο, υπάρχουν πολλαπλές αιτιολογίες (Bosch et al., 2004; Fattovich et al., 2004), σημαντική μοριακή γενετική ετερογένεια (Branda and Wands, 2006; Kaposi-Novak et al., 2006; Thomas and Zhu, 2005; Thorgeirsson and Grisham, 2002) και ποικιλία της φυσικής ιστορίας, μεταξύ των ασθενών με ΗΚΚ (Llovet and Beaugrand, 2003; Varela et al., 2003).

Η θεραπευτική προσέγγιση του ΗΚΚ απαιτεί πολυπαραμετρική φροντίδα και μπορεί να είναι θεραπευτική (χειρουργική αφαίρεση, ηπατική μεταμόσχευση, διαδερμική ablation) ή ανακουφιστική (Llovet et al., 2003). Δυστυχώς, λίγοι ασθενείς (<20%) είναι κατάλληλοι για θεραπευτική αντιμετώπιση, για λόγους όπως ο βαθμός της υποκείμενης κίρρωσης, ο αριθμός, το μέγεθος και η εντόπιση των βλαβών, η διήθηση της πυλαίας φλέβας ή παράγοντες σχετιζόμενοι με τη διαδικασία της μεταμόσχευσης (Mela et al., 2003; Schwartz, 2004; Song et al., 2004). Από την άλλη μεριά, οι ανακουφιστικές θεραπείες μπορούν να προσφέρουν μόνο βελτίωση των συμπτωμάτων και σε ορισμένες περιπτώσεις παράταση της επιβίωσης (Llovet et al., 2003). Ένα μεγάλο εύρος θεραπευτικών παρεμβάσεων έχουν αξιολογηθεί σε τυχαιοποιημένες μελέτες, εκ των οποίων μόνο ο χημειοεμβολισμός έχει αναφερθεί να βελτιώνει την επιβίωση, συγκριτικά με την υποστηρικτική θεραπεία σε μία επιλεγμένη ομάδα ασθενών (Burroughs et al., 2004). Παρά ταύτα, πολλοί ασθενείς με ανεγχείρητο ΗΚΚ δεν αποτελούν υποψήφιους για χημειοεμβολισμό, είτε λόγω εκτεταμένης νόσου είτε λόγω σοβαρής διαταραχής της ηπατικής λειτουργίας (Schwartz and Beutler, 2004). Τα τελευταία χρόνια, τα ανάλογα της σωματοστατίνης εμφανίστηκαν ως θεραπεία πολλά υποσχόμενη, για το μη-χειρουργήσιμο ΗΚΚ.

1.24 Κλινικά μαθήματα από τη χρήση αναλόγων σωματοστατίνης στο ΗΚΚ

Βασιζόμενοι σε πειραματικές ενδείξεις, από νευροενδοκρινικούς και μη ορμονοπαραγωγούς όγκους, αλλά και σε κλινικές παρατηρήσεις, προ 9 ετών περίπου, οι Κουρούμαλης και συνεργάτες (Kouroumalis et al., 1998) διεκπεραίωσαν την πρώτη τυχαιοποιημένη μελέτη για την αντιμετώπιση μη χειρουργήσιμου ΗΚΚ με οκτρεοτίδη, ένα ανάλογο σωματοστατίνης. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η οκτρεοτίδη διπλασίασε σχεδόν την επιβίωση της θεραπευόμενης ομάδας και φάνηκε ως πολλά υποσχόμενη θεραπεία για αυτή την κατηγορία ασθενών. Παρόμοια μελέτη της ίδιας ερευνητικής ομάδας (Samonakis et al., 2002), μη τυχαιοποιημένη, με ανάλογα σωματοστατίνης μακράς δράσης, επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα χρησιμοποιώντας ιστορικά controls. Και από τις δύο μελέτες φάνηκε ξεκάθαρα ότι οι διαφορές στην επιβίωση αρχίζουν να γίνονται αισθητές μετά το πέρας 6μήνου, καθώς η SST δεν είναι φάρμακο διάσωσης και απαιτείται χρόνος μέχρι να αποκαλυφθεί το όφελος από τη χρήση της. Επίσης, εντυπωσιακή ήταν η βελτίωση στην ποιότητα ζωής των ασθενών και των δύο μελετών, καθώς ακόμα και ασθενείς προχωρημένης νόσου διατήρησαν την όρεξή τους και ένα λογικό σωματικό βάρος, ενώ αισθάνονταν καλά έως και τη στιγμή που απεβίωσαν. Έως τότε, δημοσιεύθηκε σειρά μελετών, ενώ αναδείχθηκε και συζητήθηκε ο ρόλος των υποδοχέων σωματοστατίνης (somatostatin receptors ή SSTR).

Μέχρι σήμερα, έχουν γίνει τέσσερις τυχαιοποιημένες (τρεις placebo) ελεγχόμενες μελέτες με οκτρεοτίδη (Samonakis et al., 2008): δύο από την Ελλάδα (Dimitroulopoulos et al., 2007; Kouroumalis et al., 1998), μία από το Hong Kong (Yuen et al., 2002) και μία από Γερμανία και Ελβετία (Becker et al., 2007) (Πίνακας 5). Υπήρξε ετερογένεια στη διάρκεια χορήγησης θεραπείας και διαφορές στα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών (όπως αλκοολική αιτιολογία και συχνότητα θρόμβωσης πυλαίας φλέβας). Με αυτές τις διαπιστωμένες διαφορές, οι δύο Ελληνικές τυχαιοποιημένες μελέτες έδειξαν όφελος από τη χρήση της οκτρεοτιδης, ενώ οι άλλες δύο όχι. Από τα αρνητικά αποτελέσματα, η μελέτη των Yuen και συνεργατών (Yuen et al., 2002) παρουσίασε ένα εντυπωσιακό ποσοστό ασθενών, της τάξης του 60% της θεραπευθείσας ομάδας, που δεν έλαβε πάνω από ένα μήνα θεραπείας, με φτωχή επιβίωση, παρά το ότι είχαν Okuda score A or B, ενώ η ομάδα

ελέγχου είχε διάμεση επιβίωση 1.9 μήνες. Στη μελέτη των Becker και συνεργατών (Becker et al., 2007), περισσότεροι από το 50% των ασθενών ήταν αλκοολικοί και περισσότεροι

Πίνακας 5. Το σύνολο των τυχαιοποιημένων, ελεγχόμενων θεραπευτικών κλινικών μελετών, για την αντιμετώπιση του ανεγχείρητου ΗΚΚ (Samonakis et al., 2008).

Publication	Therapeutic regimen	Randomization	Outcome	Comments
Kouroumalis	Octreotide sc. 250 µg twice daily	Treat 28 Controls 30	↑ survival ↓ AFP ↑ QoL	SSTR investigation only from 23 patients- various aetiologies (acute/chronic hepatitis, HCC)
Yuen	Octreotide LAR 30 mg	Treat 35 Placebo 35	Nil improvement on survival, QoL, AFP	60% of "treatment" group received 1 or nil injection—unexpectedly low median survival despite 83% of treatment group Okuda I/II
Dimitroulopoulos	Octreotide LAR 30 mg	Treat 31 Placebo 30 Controls 66	↑ survival ↑ QoL	Patient inclusion if positive SSTR in indium-111 scintigraphy—66 patients with negative scintigraphy used as controls
Becker	Octreotide LAR 30 mg	60 Treat 59 Placebo	No difference in survival	55% Alcoholic aetiology- >80% partial or complete portal vein thrombosis—Only 29% treated > 6 months

QoL, quality of life; SSTR, somatostatin receptors

από το 80% είχαν σε ένα βαθμό θρόμβωση της πυλαίας. Το πιο εντυπωσιακό εύρημα της συγκεκριμένης, κατά τα άλλα καλοσχεδιασμένης μελέτης, ήταν ότι ενώ και στις δύο ομάδες ασθενών, το Child-Pugh score ήταν Α ή Β σε > 88% των ατόμων και το Okuda score ήταν Ι ή ΙΙ σε >90%, η διάμεση επιβίωση έφτασε μόλις τους 5 μήνες, αντίθετα με την αναμενόμενη (Llovet et al., 2003; Llovet et al., 1999). Ακόμα, το 71% των ασθενών στη θεραπευθείσα ομάδα έλαβε 6 ή λιγότερες ενέσεις οκτρεοτίδης, συγκριτικά με το 66% στην ομάδα ελέγχου. Η τελευταία τυχαιοποιημένη μελέτη προέρχεται από τους Dimitroulopoulos και συνεργάτες (Dimitroulopoulos et al., 2007), βασιζόμενη σε σπινθηρογράφημα οκτρεοτίδης, σημασμένης με ίνδιο, για τη διερεύνηση της έκφρασης υποδοχέων σωματοστατίνης. Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 127 ασθενείς με προχωρημένο ΗΚΚ (ανεγχείρητο ΗΚΚ, μεταστατική νόσος, μη υποψήφιοι για ενδοαρτηριακό χημειοεμβολισμό), με περισσότερους από το 80% να ανήκουν στο στάδιο C κατά Barcelona Liver Cancer (BCLC). Αυτοί με το αρνητικό σπινθηρογράφημα εμφανίστηκαν ως ομάδα ελέγχου (N=66), ενώ σε 33 χορηγήθηκε τυχαιοποιημένα οκτρεοτίδη και σε 30 placebo (από του στόματος). Οι ασθενείς της ομάδας της οκτρεοτίδης είχαν σημαντικά υψηλότερη διάμεση επιβίωση και χαμηλότερο κίνδυνο θανάτου (P<0.001, και στις δύο ομάδες), καθώς επίσης καλύτερη ποιότητα ζωής συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου και τους SSTR αρνητικούς ασθενείς. Κατά συμφωνία με παλαιότερες μελέτες, βρέθηκε ότι 48% των ασθενών ήταν θετικοί για SSTR.

Από την άλλη μεριά, οι περισσότερες μελέτες περιπτώσεων αναφέρουν πλεονεκτική δράση των μακράς δράσης αναλόγων σωματοστατίνης σε μη χειρουργήσιμο ΗΚΚ, ενώ ορισμένες έχουν και εντυπωσιακά αποτελέσματα (Πίνακας 6). Συνολικά φαίνεται ότι το 40% σχεδόν των θεραπευθέντων ασθενών αναταποκρίνονται στη θεραπεία. Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με το ποσοστό των ΗΚΚ που εκφράζουν SSTR (Blaker et al., 2004;Reubi et al., 1999). Τα SST ανάλογα που χρησιμοποιήθηκαν στις κλινικές μελέτες ήταν κυρίως οκτρεοτίδη και σε μερικές λανρεοτίδη. Δεσμεύονται κυρίως στον SSTR2, με χαμηλότερη συγγένεια στους SSTR3 και SSTR5, ενώ δεν δεσμεύονται στους SSTR1 και SSTR4 (Patel, 1999). Βεβαίως αυτό δεν σημαίνει ότι όλα τα ΗΚΚ έχουν το ίδιο SSTR προφίλ, ενώ δεν είναι γνωστό εάν ένα ανάλογο που μπορεί να προσδεθεί επιλεκτικά με όλους τους SSTRs μπορεί να έχει διαφορετική κλινική έκβαση.

Πίνακας 6. Μη τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές και αναφορές περιπτώσεων με οκτρεοτίδη ή λανρεοτίδη (μονοθεραπεία) (Samonakis et al., 2008).

Publication	Type of study	No. of patients	Response to treatment—outcome
Raderer	Case report	1 (LAN)	Stabilization and ↑ survival
Raderer	Longitudinal (prospective)	21 (LAN)	43% improved/stabilized on treatment
Samonakis	Prospective, case control study	32 (OCT/LAN)	↑ Survival, QoL
Dimitroulopoulos	Prospective, case control study	28 (OCT)	↑ Survival, QoL
Siveke	Case report	1 (OCT)	↑ Survival, QoL
Gill	Prospective, case control study	22 (OCT)	↓ aFP
Plentz	Prospective, case control study	41 (OCT)	↑ Survival and QoL, ↓ aFP
Slijkhuis	Longitudinal (prospective)	30 (OCT)	OCT safe-Survival comparable to TACE-Possibly improved
Deming	Case report	1 (OCT)	Marginal benefit: 60% of patients had treatment <3 months; 50% with vascular thromboses
			↑ Survival and QoL, ↓ aFP, impressive reduction in tumor size

QoL, quality of life; TACE, transarterial chemoembolization

1.25 Πιθανοί μηχανισμοί δράσης των αναλόγων σωματοστατίνης στο ΗΚΚ

Η σωματοστατίνη δρα ως ανασταλτικό πεπτίδιο μία ποικιλίας εκκριτικών και πολλαπλασιαστικών απαντήσεων. Οι δράσεις της διαμεσολαβούνται από υποδοχείς συνδεδεμένους με G πρωτεΐνες (SSTRs 1-5), οι οποίοι μπορεί να συνδέονται με διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως η αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης και γουανυλικής κυκλάσης, η ρύθμιση καναλιών ιοντικής αγωγιμότητας και η πρωτεϊνική

αποφωσφορυλίωση. Οι πέντε υποδοχείς προσδένονται με το φυσικό πεπτίδιο με υψηλή συγγένεια, αλλά μόνο οι SSTR2, SSTR3 και SSTR5 προσδένονται με τα μικρά συνθετικά ανάλογα (Ferjoux et al., 2000). Η SST και τα ανάλογά της έχει δειχθεί ότι αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό φυσιολογικών και νεοπλασματικών κυττάρων (Hofland et al., 1992;Schally, 1988), συμπεριλαμβανομένων των HepG2 κυττάρων ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Notas et al., 2004), ενώ έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν μία ποικιλία πειραματικών όγκων. Η δράση αυτή είναι αποτέλεσμα είτε αναστολής της ανάπτυξης (ρύθμιση της mitogen activated protein κινάσης ή MAPK, μέσω των SSTR1, SSTR4 και SSTR5 και επαγωγή αναστολής του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση) είτε αποπτωτικής δράσης (μέσω ενεργοποίησης του p53 και της Bax πρωτεΐνης). Η αποπτωτική δράση μεσολαβείται είτε άμεσα από υποδοχέα SSTR που υπάρχει στον όγκο είτε έμμεσα από υποδοχέα SSTR που υπάρχει σε κάποιον μη-ηπατικό στόχο (Lamberts et al., 2002;Lamberts et al., 1994;Lamberts et al., 1996;Patel, 1999).

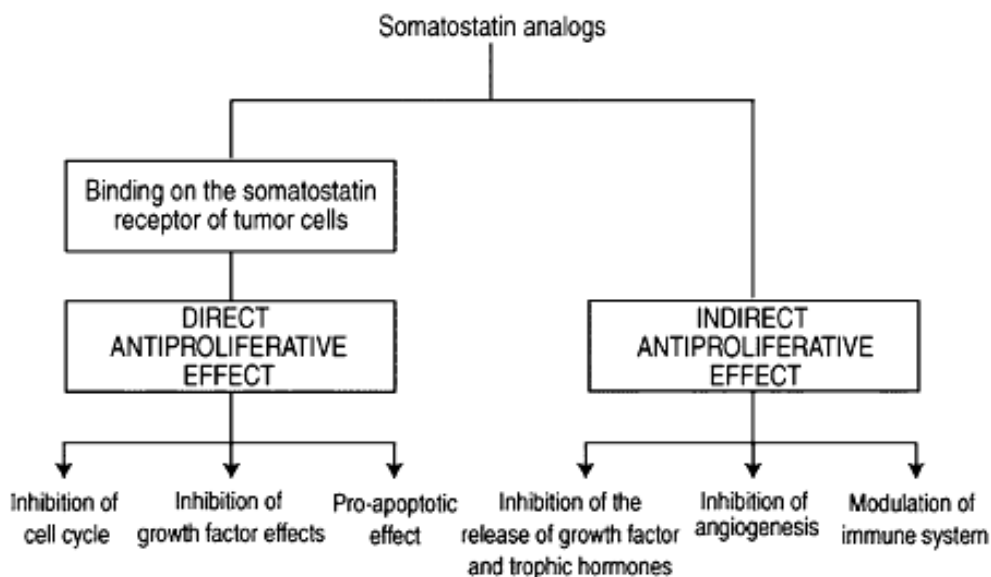
Τουλάχιστον έξι διαφορετικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην αναστολή του HKK από τη σωματοστατίνη και τα ανάλογά της (Σχήμα 22).

1. Έμμεση αντιπολλαπλασιαστική δράση

- Αναστολή έκκρισης της αυξητικής ορμόνης (GH), της ινσουλίνης, γαστρεντερικών ορμονών (γαστρίνη, γλουκαγόνο) και τροφικών παραγόντων, που μπορεί να αναμειγνύονται στη ρύθμιση της ανάπτυξης του όγκου (Bousquet et al., 2004;Dasgupta, 2004).
- Άμεση ή έμμεση (μέσω GH) αναστολή των insulin-like growth factor IGF-I και IGF-II (που παράγονται από φυσιολογικά ηπατοκύτταρα και κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος) ή των IGFbinding πρωτεϊνών (Dasgupta, 2004;Huynh et al., 2002).
- Άμεση in vivo και in vitro αναστολή της αγγειογένεσης, μίας θεμελιώδους διαδικασίας για την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση (Adams et al., 2005;Dasgupta, 2004;Liu et al., 2004).
- Αντινεοπλασματική δράση μέσω ανοσορρύθμισης (Lamberts et al., 2002).

2. Άμεση αντιπολλαπλασιαστική δράση, μέσω SSTR (Ferjoux et al., 2000;Notas et al., 2004)

- Άμεση αντιπολλαπλασιαστική επίδραση στα καρκινικά κύτταρα με αναστολή του κυτταρικού κύκλου.
- Αναστολή των αποτελεσμάτων που επιφέρουν αυξητικοί παράγοντες.
- **Επαγωγή απόπτωσης, εξαρτώμενης ή μη από το p53** (Lasfer et al., 2005;Liu et al., 2004;Xidakis et al., 2004)



Σχήμα 22. Οι μέσω υποδοχέων σωματοστατίνης επιδράσεις των αναλόγων σωματοστατίνης στα καρκινικά κύτταρα (Susini and Buscail, 2006).

1.26 Έμμεση αντιπολλαπλασιαστική δράση

Ένας από τους έμμεσους μηχανισμούς αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι η αναστολή της έκκρισης παραγόντων ανάπτυξης και ορμονών που προάγουν την ανάπτυξη. Μείωση στην ανάπτυξη του όγκου μπορεί να επέλθει μέσω καταστολής της σύνθεσης και της έκκρισης (οπότε και εξάλειψη της δράσης) παραγόντων ανάπτυξης και ορμονών, όπως η ινσουλίνη, η προλακτίνη, ο IGF-1, ο EGF, ο transforming growth factor- α , η γαστρίνη, η χολοκυστοκυνίνη και η αυξητική ορμόνη. Για παράδειγμα, ο IGF-1 είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής πολλών νεοπλασμάτων. Η καταστολή της έκκρισης του IGF-1 είναι σημαντική, επειδή, καταστέλλοντας την αυξητική ορμόνη και απορρυθμίζοντας την οδηγούμενη από την αυξητική ορμόνη ανάπτυξη του όγκου, τα ανάλογα σωματοστατίνης ίσως ασκούν έμμεση αντιπολλαπλασιαστική δράση. Τα ανάλογα

σωματοστατίνης καταστέλλουν τον άξονα δράσης της ορμόνης IGF-1 με κεντρικούς και περιφερικούς μηχανισμούς. Οι SSTR2 και SSTR5 είναι οι βασικοί υποδοχείς, μέσω των οποίων αναστέλλεται η υποφυσιακή απελευθέρωση αυξητικής ορμόνης. Τα ανάλογα σωματοστατίνης αναστέλλουν, επίσης, την μέσω αυξητικής ορμόνης ηπατική παραγωγή IGF-1, μέσω SSTR2 και/ή SSTR3 μεσολαβούμενης ενεργοποίησης μίας φωσφατάσης τυροσίνης. Ακολουθεί αποφωσφορυλίωση της STAT5b και μείωση της γονιδιακής μεταγραφής του IGF-1 [(Murray et al., 2004a). Ένα άλλο παράδειγμα αλληλεπίδρασης της σωματοστατίνης με ορμόνες, όπως η ινσουλίνη, αποτέλεσαν αρουραίοι που εμβολιάστηκαν υποδόρια με κύτταρα μαστικού αδενοκαρκινώματος. Συνδυασμός θεραπείας με σωματοστατίνη και ινσουλίνη, αύξησε κατά πολύ το λόγο ινσουλίνης/γλυκαγόνου και είχε ως αποτέλεσμα την αναστροφή της καχεξίας του ξενιστή, αποτέλεσμα που δεν παρατηρήθηκε μόνο με σωματοστατίνη. Παρά ταύτα, δεν παρατηρήθηκε αξιόλογη επίδραση στην ανάπτυξη του όγκου (Bartlett et al., 1995).

Αγγείωση του ΗΚΚ

Η μείωση της αγγείωσης του όγκου φαίνεται να αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς, μέσω του οποίου η οκτρεοτίδη αναστέλλει την ανάπτυξη ηπατικών μεταστάσεων. Διχογνωμία εμφανίζεται στο εάν η αναστολή της ανάπτυξης του όγκου συμβαδίζει με τη μείωση στην αρτηριακή ηπατική ροή (Hemingway et al., 1992). Ωστόσο, η μείωση της αγγειακής ροής του όγκου ίσως να εξαρτάται από την αγγειοβρίθειά του.

Τα ανάλογα σωματοστατίνης μπορούν έμμεσα να ελέγξουν την ανάπτυξη του όγκου μέσω αναστολής της αγγειογένεσης. Η αξία της αγγειογένεσης, ως θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου, έχει προηγουμένα δειχθεί με το φάρμακο bevacizumab, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι ενός από τους βασικούς προαγγειογόνους παράγοντες, του VEGF (Willett et al., 2004). Η αγγειακή υπερέκφραση υποδοχέων σωματοστατίνης με υψηλή συγγένεια για σωματοστατίνη και οκτρεοτίδη γύρω από τον όγκο, παρατηρήθηκε σε πρωτογενή ορθοκολικά καρκινώματα, μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, νεφρικό καρκίνωμα και σε λέμφωμα υψηλής καοήθειας. Η έκφραση φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από την έκφραση των υποδοχέων στον ίδιο τον όγκο και πιθανώς να συσχετίζεται με τον SSTR2 (Woltering, 2003). Επίσης, ο SSTR2 υποδοχέας έχει ανιχνευθεί με ανοσοϊστοχημεία και *in vivo* σπινθηρογραφία σε πολλαπλασιαζόμενα αγγεία ανθρώπινου αγγειακού ενδοθηλίου, αλλά όχι στα μη πολλαπλασιαζόμενα (Reubi et al., 2001). Η οκτρεοτίδη έχει δειχθεί ότι αναστέλλει την αγγειογένεση σε σειρά πειραματικών μοντέλων

όγκου (Danesi et al., 1997;Lawnicka et al., 2000;Woltering et al., 1997). Η οκτρεοτίδη και η RC-160 εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη αναστολή της νεοαγγείωσης, συγκρινόμενες με τη φυσική σωματοστατίνη-14 (Barrie et al., 1993). Σε αγγειοβριθείς όγκους, όπως το ΗΚΚ, η αναστολή της αγγειογένεσης ίσως να αποτελεί ένα μηχανισμό-κλειδί, για την εξήγηση των επιδράσεων της οκτρεοτιδής (Treiber G, Wex T, Malfertheiner P. *Inhibition of angiogenesis rather than growth hormones is a key factor for ocreotide treatment response in HCC patients. Proc ASCO 2004; Abstr 91*). Η αναστολή αυτή ίσως είναι αποτέλεσμα θετικής ρύθμισης του SSTR2 κατά την μετατροπή του ενδοθηλίου από λανθάνουσα κατάσταση σε κατάσταση πολλαπλασιασμού (Woltering, 2003). Παρ'όλα αυτά, οι πρωτεΐνες SST2 και SST5 εκφράστηκαν επιλεκτικά σε πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβας και όχι σε κύτταρα σταδίου ηρεμίας, κάτι που υποδεικνύει ότι ίσως και άλλοι SSTR υποδοχείς παίζουν κάποιο ρόλο (Adams et al., 2004). Σε άλλα κυτταρικά συστήματα, που εκφράζουν μόνο SSTR3, όπως τα EAHy926 κύτταρα, ο SSTR3 φαίνεται να εμπλέκεται με αντι-αγγειογόνο δραστηριότητα.

Σε μοριακό επίπεδο, το αντι-αγγειογόνο αποτέλεσμα της δράσης της σωματοστατίνης είναι αποτέλεσμα αναστολής της δραστηριότητας της MAP κινάσης και της δραστηριότητας της ενδοθηλιακής NO συνθάσης (eNOS), εμπλέκοντας τους STTR1, SSTR2 και SSTR3 υποδοχείς (Arena et al., 2005;Florio et al., 2003). Φαίνεται να υπάρχουν πολλαπλοί μηχανισμοί ελέγχου της αγγειογένεσης. Ένας από αυτούς, μέσω του οποίου η σωματοστατίνη αναστέλλει την αγγειογένεση, είναι η μείωση της σύνθεσης του VEGF (Jia et al., 2003b;Kumar et al., 2004). Τα ανάλογα σωματοστατίνης ασκούν αντι-αγγειογόνο δράση και μέσω ευρείας αναστολής, τόσο της απελευθέρωσης όσο και των επιδράσεων, παραγόντων ανάπτυξης (growth factors), μερικοί εκ των οποίων είναι αγγειογόνοι, συμπεριλαμβανομένων του platelet-derived growth factor, του IGF-1 και του basic fibroblast growth factor (Hayry et al., 1993). Οι παράγοντες αυτοί, εκκρινόμενοι από τα κύτταρα του όγκου και διηθώντας τα φλεγμονώδη κύτταρα, διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων και κυττάρων λείων μυικών ινών, διαδικασίες σημαντικές για την αγγειογένεση. Συμπερασματικά, τα ανάλογα σωματοστατίνης και ιδιαίτερα η οκτρεοτίδη, φαίνεται να αποτελούν σημαντικούς υποψήφιους θεραπευτικούς παράγοντες για τη στοχευμένη αντι-αγγειογόνο θεραπεία καρκινωμάτων, μόνοι ή σε συνδυασμό με άλλους κυτταροστατικούς ή κυτταροτοξικούς παράγοντες.

Ανοσορρύθμιση

Η ρύθμιση του ανοσολογικού συστήματος φαίνεται να αποτελεί έναν επιπλέον μηχανισμό, μέσω του οποίου η σωματοστατίνη ασκεί αντι-πολλαπλασιαστική δράση. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι υποδοχείς σωματοστατίνης εμφανίζονται σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα (Bhathena et al., 1981) και κύτταρα λεμφώματος και ότι η σωματοστατίνη ρυθμίζει τις εκκρίσεις των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος (Dalm et al., 2003; Ferone et al., 2004). Σύμφωνα με πειραματικές μελέτες, οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς σωματοστατίνης μπορούν και ρυθμίζουν φλεγμονώδεις και ανοσολογικούς μηχανισμούς. Για παράδειγμα, η απελευθέρωση της interferon-c από τα T λεμφοκύτταρα (Elliott et al., 1999) και των tumor necrosis factor-a και interleukin-1b από τα μονοκύτταρα (Peluso et al., 1996), αναστέλλεται από την σωματοστατίνη. Επιπλέον, αλλαγές στη δραστηριότητα των NK κυττάρων έχουν αναφερθεί κατά τη διάρκεια θεραπείας με οκτρεοτίδη, ασθενών με μεταστατικό καρκινοειδές καρκίνωμα, κάτι που ίσως να συμβάλλει στην αντι-πολλαπλασιαστική δράση της [Ritts RE, Kvolts L, Strehlo B et al. *Immunologic studies of patients with malignant neuroendocrine carcinomas and responses to somatostatin analog (SMS 201–995, Sandostatin)*. Dallas, TX: 1989]. Ακόμα, υπάρχουν ενδείξεις ότι η σωματοστατίνη ασκεί αντι-πολλαπλασιαστική και αποπτωτική δράση σε ανθρώπινα B και T λεμφοκύτταρα (Lattuada et al., 2002; Roskopf et al., 2003).

Αναστολή της ηπατικής αναγέννησης μετά από μερική ηπατεκτομή, έχει αναφερθεί για την οκτρεοτίδη, χωρίς να επηρεαστεί η ηπατική ή πυλαία αιματική ροή. Όμως, παράλληλα αυξήθηκε σημαντικά η δραστηριότητα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (ΔΕΣ) (Davies et al., 1997). Στην ίδια μελέτη, μειώθηκε σημαντικά η ανάπτυξη κυττάρων αδενοκαρκινώματος και ινοσαρκώματος, που εμφυτεύτηκαν στο μερικώς εκτομηθέν ήπαρ αρουραίων, από τη δράση της οκτρεοτίδης. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονταν σε συμφωνία με παλαιότερη μελέτη της ίδιας ερευνητικής ομάδας, που έδειξε ότι το μπλοκάρισμα του ΔΕΣ είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανάπτυξης του όγκου, ενώ η οκτρεοτίδη μείωσε τη δραστηριότητα του ΔΕΣ (Davies et al., 1993; Davies et al., 1995b). Ωστόσο, περιορισμένη αναστροφή στην ανάπτυξη του όγκου και στην εμφάνιση ηπατικών μεταστάσεων, παρατηρήθηκε σε αρουραίους με gadolinium chloride-επαγόμενο μπλοκάρισμα της δράσης των κυττάρων Kupffer, οδηγώντας στην υπόθεση ότι παρεμβάλλονται και άλλοι μηχανισμοί στην αναστολή της αύξησης των ηπατικών όγκων από την οκτρεοτίδη.

1.27 Άμεση αντιπολλαπλασιαστική δράση

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου ένα ανάλογο σωματοστατίνης ασκεί άμεση αντινεοπλασματική δράση εξαρτάται από τον υπότυπο του SSTR με τον οποίο προσδένεται. Η πρόσδεση κάθε αναλόγου με κάποιον SSTR πυροδοτεί συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια, ενώ κάθε υποδοχέας έχει τη δυνατότητα μεσολάβησης ποικιλίας διαφορετικών βιολογικών δράσεων (Πίνακας 7) (Froidevaux and Eberle, 2002;Lahlou et al., 2004;Weckbecker et al., 2003).

Οι ερευνητές αναφέρουν διάφορους μηχανισμούς, μέσω των οποίων η σωματοστατίνη και τα ανάλογά της αναστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη. Οι μηχανισμοί αυτοί ενεργοποιούνται κυρίως από τους υποδοχείς SSTR1, SSTR2, SSTR4 και SSTR5 (Pages et al., 1999;Sharma et al., 1996) (Πίνακας 7). Παράδειγμα της διαφοροποίησης στη δραστηριότητα των διαφόρων SSTR αποτελεί το μονοπάτι της MAPK extracellular signal-regulated kinase (ERK), ενός σημαντικού μεσολαβητή της επαγόμενης από τη σωματοστατίνη ρύθμισης της κυτταρικής ανάπτυξης. Στο νευροβλάστωμα και στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, τα ανάλογα που προσδένονται με τον SSTR1 κα/ή τον SSTR2, αναστέλλουν την επαγόμενη από τον platelet-derived growth factor (PDGF) δραστηριότητα της ERK, οπότε και το αποτέλεσμα αυτό σχετίζεται με την αντιπολλαπλασιαστική δράση των συγκεκριμένων πεπτιδίων (Cattaneo et al., 2000). Μέσω του SSTR3 τα ανάλογα σωματοστατίνης αναστέλλουν τον vascular endothelial growth factor, ο οποίος με τη σειρά του μπλοκάρει τη δραστηριότητα της ERK (Florio et al., 2003). Αντίθετα, ο SSTR4, ο οποίος εκφράζεται σταθερά στα CHO-K1 κύτταρα, οδηγεί στην πολλαπλασιαστική δράση της σωματοστατίνης, μέσω μίας protein kinase C-μεσολαβούμενης ενεργοποίησης του ERK1/2 μονοπατιού (Smalley et al., 1999).

Τελευταία, ένας άλλος μηχανισμός αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης από τη σωματοστατίνη είναι η αποκατάσταση των λειτουργικών gap συνδέσεων. Οι gap συνδέσεις συντίθενται από τις κονεξίνες και είναι σημαντικές για τη διατήρηση του σταδίου διαφοροποίησης. Στα περισσότερα καρκινικά κύτταρα, η έκφραση της κονεξίνης είναι διαταραγμένη. Έχει βρεθεί ότι η αποκατάσταση της density-επαγόμενης αναστολής της ανάπτυξης κυττάρων παγκρεατικού καρκινώματος, που ακολουθεί την επανέκφραση του SSTR2, οφείλεται στην υπερέκφραση της ενδογενούς connexin (Cx) 26 και Cx43, και στον επακόλουθο σχηματισμό λειτουργικών gap συνδέσεων (Lahlou et al., 2005).

Τα ανάλογα σωματοστατίνης φαίνεται, επίσης, να αναστέλλουν άμεσα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω επαγωγής απόπτωσης, που πιθανώς μεσολαβείται από τον SSTR3. Όταν ο SSTR3 ενσωματωθεί σε κυτταρικές σειρές που δεν εξέφραζαν προηγουμένως SSTR, η επίδραση της οκτρεοτίδης προκαλεί θετική ρύθμιση στην p53 πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα την πρόκληση απόπτωσης.

Άλλα μονοπάτια επαγωγής απόπτωσης από ανάλογα σωματοστατίνης φαίνονται στον πίνακα, αν και δεν έχει προσδιοριστεί ο πιθανός ρόλος των κασπασών στη συγκεκριμένη αντι-πολλαπλασιαστική δράση τους. Ο SSTR2, όπως και ο SSTR3, έχει αντι-ογκογόνες ιδιότητες. Έχει δειχθεί ότι το ανθρώπινο καρκίνωμα του παγκρέατος εμφανίζει απώλεια έκφρασης του SSTR2 (Buscail et al., 1996). Μετά από διόρθωση της βλάβης του γονιδίου του SSTR2, τόσο η κυτταρική ανάπτυξη όσο και η ογκογονικότητα μειώθηκαν σημαντικά στα στα SSTR2-εκφράζοντα κύτταρα, επί απουσίας κάποιου εξωγενούς συνδέτη (Delesque et al., 1997). Η σύνθεση και απέκκριση της φυσικής σωματοστατίνης-14, από sst2-transfected κύτταρα, ήταν υπεύθυνη για μία αυτοκρινή ανασταλτική καμπύλη (όπου η σωματοστατίνη-14 επηρέασε τα κύτταρα από τα οποία παράχθηκε). Σε πειραματικό αθυμικό μοντέλο ποντικού, η επανέκφραση του sst2 προκάλεσε δραματική μείωση στο μέγεθος του όγκου, καθώς και τοπικές και απόμακρες έμμεσες αντινεοπλασματικές δράσεις (Rochaix et al., 1999). Περαιτέρω προκλινικές μελέτες σε μοντέλο hamster, έδειξαν ότι η επανέκφραση του sst2 γονιδίου προκάλεσε αναστολή στην ανάπτυξη του πρωτογενούς όγκου και ανέστειλλε την πρόοδο των μεταστάσεων (Benali et al., 2000).

Συγκεκριμένοι υποδοχείς σωματοστατίνης μπορεί, επίσης, να αναμειγνύονται στην άμεση αντινεοπλασματική δράση της σωματοστατίνης, μέσω ενός λιγότερου κατανοητού προς το παρόν μηχανισμού, όπου δύο υποδοχείς δρουν συνεργιστικά για να ενισχύσουν την αντιεκκριτική δραστηριότητα (Shimon et al., 1997). Οι υποδοχείς σωματοστατίνης μπορούν να μεταβιβάσουν το επαγόμενο από το συνδέτη τους, σήμα, μέσω διμερισμού του υποδοχέα, παρ'ότι δε φαίνεται αυτό να συμβαίνει σε κύτταρα καρκινώματος. Τέτοιος διμερισμός έχει αναφερθεί για τους SSTR2, SSTR3 και SSTR5 (Patel et al., 2002; Pfeiffer et al., 2001; Rocheville et al., 2000). Αντίθετα, ο SSTR1 δε σχηματίζει ομοδιμερή.

Με βάση τις άμεσες επιδράσεις στα νεοπλάσματα, η θεραπευτική αποτελεσματικότητα των αναλόγων σωματοστατίνης στον έλεγχο των αδενωμάτων της υπόφυσης, φαίνεται να διαρκεί πολύ και δεν μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Αντίθετα, η απευαισθητοποίηση της επίδρασης των αναλόγων σωματοστατίνης εντός

εβδομάδων ή μηνών, έχει παρατηρηθεί στην πλειοψηφία των islet cell ή carcinoid tumor-bearing ασθενών, ενώ σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των ασθενών, σε σχέση με την επαγωγή της εξαρτώμενης από τον τύπο του καρκίνου ταχυφυλαξίας (Hofland and Lamberts, 2003). Μεταξύ των διαφόρων μηχανισμών αντοχής των όγκων με διαφορετικά μοτίβα έκφρασης SSTR, είναι η αρνητική ρύθμιση των υποδοχέων, όπου προσδένεται και με τους οποίους έχει υψηλή συγγένεια, το ανάλογο που χορηγείται. Επίσης, η θετική ρύθμιση υποδοχέων, όπου δεν προσδένονται τα διαθέσιμα ανάλογα, όπως ομόλογη ή/και ετερόλογη ρύθμιση της έκφρασης SSTR, αλλαγές στη μετακίνηση του υποδοχέα ή και

	sst ₁	sst ₂	sst ₃	sst ₄	sst ₅
Binding affinities (IC ₅₀ values; nmol/l)					
Somatostatin-14	0.93	0.15	0.56	1.5	0.29
Synthetic analogs					
Octreotide	280	0.38	7.1	>1000	6.3
Lanreotide	180	0.54	14	230	17
SOM230	9.3	1.0	1.5	>1000	0.16
RC-160 ^a	>1000	5.4	31	45	0.7
Cell growth and death					
Proliferation	↓	↓	↓	↓↑	↓
Apoptosis		↑	↑		
Secretion					
Growth hormone	↓	↓		↓	↓
Insulin		↓			↓
Glucagon		↓			
Adrenocorticotropin		↓			↓
Ghrelin		↓			
Interferon-γ		↓			
IgM		↑			
Amylase					↓
Gastric acid		↓			
Signal transduction pathways					
Adenylate cyclase	↓	↓	↓	↓	↓
Phospholipase C	↑	↑	↑	↑	↓↑
Phospholipase A ₂	↓	↓		↑	
Tyrosine phosphatases	↑	↑	↑	↑	↑
SHP-1		↑			
SHP-2	↑	↑			
Tyrosine kinases					
-c-SRC	↑	↑			
-JAK2		↑			
PI3 kinase	↑	↑		↑	
Nitric oxide synthases					
-nNOS		↑			
-eNOS			↓		
Ca ²⁺ channels	↓	↓			↓
K ⁺ channels	↓	↑	↑	↑	↑
Na ⁺ /H ⁺ exchange	↓		↓	↓↑	
MAP kinases					
-ERK	↓↑	↓↑	↓	↑	↓
-p38		↑		↑	
-JNK					↑

Πίνακας 7. Συγγένεια πρόσδεσης της φυσικής σωματοστατίνης-14 και των συνθετικών αναλόγων στους πέντε υποτύπους υποδοχέων σωματοστατίνης και ιδιότητες των υποδοχέων (Bruns et al., 2002; Reubi et al., 1998; Weckbecker et al., 2003).

απώλεια έκφρασης υποδοχέων (Bruno et al., 1994; Froidevaux et al., 1999; Hofland and Lamberts, 2003; Reubi et al., 1990; Rochaix et al., 1999). Αλλαγές στην έκφραση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών που βρίσκονται σε μια συνεχή αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς και ευθύνονται για τη σωστή μετακίνηση του ανάλογου υποδοχέα, μπορεί να ευθύνονται για την απώλεια της άμεσης δραστηριότητας με την πάροδο του χρόνου, των αναλόγων σωματοστατίνης. Η επαγόμενη από αγωνιστή εσωτερικοποίηση κάθε υποδοχέα, όπως και η περαιτέρω τύχη του (ανακύκλωση ή αποικοδόμηση) μετά την ενδοκύτωση, διαφέρει ανάλογα με τον υποδοχέα. Μετά την εξαρτώμενη από την GRK2 (G protein-coupled receptor kinase-2) φωσφορύλιωση του SSTR2 και την εσωτερικοποίησή του, απευαισθητοποιείται γρήγορα και ανακυκλώνεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αντίθετα, μεγάλο τμήμα του SSTR3 διασπάται σε ενδοκυττάρια κυστίδια και υπόκειται σε εξαρτώμενη από ubiquitin αποικοδόμηση, μετά από ενεργοποίηση από αγωνιστή. Ο SSTR4 είναι μοναδικός στο ότι δεν μπορεί να εσωτερικοποιηθεί, μετά από ενεργοποίηση από αγωνιστή. Έτσι, η διαφοροποίηση στην ενδοκυττάρια ταξινόμηση των SSTR ίσως εξηγεί και την ανταπόκριση των GEP καρκινωμάτων σε θεραπεία με ανάλογα σωματοστατίνης (Tulipano et al., 2001). Τα πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι η άμεση αντιπολλαπλασιαστική δράση κάθε αναλόγου είναι εξαρτώμενη από την επιλεκτική δράση του στους SSTR υποδοχείς. Η επικρατούσα έκφραση SSTR2 στους ανθρώπινους όγκους έχει ως αποτέλεσμα την επιτυχή αντιμετώπιση ορμονοπαραγωγών υποφυσιακών αδενωμάτων, καρκίνου των νησιδίων (παγκρέατος?) και των ενδοκρινικών καρκινοειδών, με οκτρεοτίδη και λανρεοτίδη. Ωστόσο, λόγω της αίσθησης ότι η πολλαπλή δράση ενός αναλόγου θα ήταν πιο αποτελεσματική, το SOM230, με υψηλή συγγένεια για τους SSTR2, SSTR3 και SSTR5 και μέτρια συγγένεια για τον SSTR1 (Bruns et al., 2002; Schmid and Schoeffter, 2004), είναι ένας δυναμικός αναστολέας υποφυσιακών αδενωμάτων, εκκρινόντων αυξητική ορμόνη ή προλακτίνη και έχει τη δυνατότητα να αυξήσει τον αριθμό των ανταποκριθέντων στη θεραπεία αδενωμάτων εκκρινόντων αυξητική ορμόνη (Hofland et al., 2004; Murray et al., 2004b; Weckbecker et al., 2002).

1.28 Σωματοστατίνη και απόπτωση

Αν και η καλύτερη θεραπευτική αντιμετώπιση όλων των ηπατικών καρκινωμάτων είναι η πλήρης χειρουργική αφαίρεση, η οκτρεοτίδη, ένα ανάλογο της σωματοστατίνης, είναι η καλύτερη διαθέσιμη θεραπεία για προχωρημένο ανεγχείρητο ηπατοκυτταρικό

καρκίνωμα (Kouroumalis, 2001). Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα έχει ετήσια επίπτωση περί το 1,000,000 νέες περιπτώσεις (Rustgi, 1987). Η οκτρεοτίδη φαίνεται αποτελεσματική στην αναστολή ποικιλίας πειραματικών μοντέλων (Davies et al., 1995a; Frizelle, 1995) και ένας βασικός μηχανισμός που ενέχεται στην αντιπολλαπλασιαστική δράση της οκτρεοτίδης είναι η μεσολαβούμενη από υποδοχέα ανασταλτική δράση. Οι διάφορες βιολογικές δράσεις, μεταξύ των οποίων και η επαγωγή απόπτωσης, μεσολαβούνται μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που πυροδοτούνται από τους υποδοχείς (Reisine and Bell, 1995). *In vitro* μελέτες έχουν δείξει υψηλή συγγένεια της οκτρεοτίδης για τους SSTR2, SSTR3 και SSTR5, με ελάχιστη προσδετική ικανότητα για τους SSTR1 και SSTR4 (Bruns et al., 1996; Patel and Srikant, 1994; Raynor et al., 1993). Σχετικά πρόσφατα αναφέρθηκε αναστολή των HepG2 κυττάρων HKK από την οκτρεοτίδη (στις συγκεντρώσεις 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 και 4.0 mg/L), με παράλληλη δόσο-εξαρτώμενη αύξηση της απόπτωσης. Οι SSTR2 and SSTR4 υποδοχείς ανιχνεύθηκαν τόσο στα HepG2 όσο και σε φυσιολογικά ηπατοκύτταρα, ενώ ο SSTR3 μόνο στα κύτταρα του HKK (Liu et al., 2004). Παρά τις αναφορές αναστολής πολλαπλασιασμού και επαγωγής απόπτωσης *in vitro* σε κύτταρα HKK από οκτρεοτίδη (Chen et al., 2001b; Diaconu et al., 1999; Raderer et al., 2000; Wang et al., 2001), δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα για το ρόλο και το είδος των κασπασών που πιθανώς να συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή της επαγόμενης απόπτωσης.

Έχει δειχθεί ότι η σωματοστατίνη δρώντας μέσω της Src homology 2 bearing φωσφατάσης τυροσίνης, της SHP-1, ασκεί αποπτωτική δράση σε MCF-7 κύτταρα καρκινώματος του μαστού και ενεργοποιεί την κυτταρική οξινοποίηση και απόπτωση. Η SHP-1-μεσολαβούμενη ενεργοποίηση της κασπάσης-8 είναι απαραίτητη για τη μείωση του PH. Η μείωση του PH είναι απαραίτητη για την ενίσχυση της μείωσης στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και την ενεργοποίηση της κασπάσης-9. Η μείωση του ATP "απομακρύνει" την SST-προκαλούμενη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και την ενεργοποίηση της κασπάσης 9, αλλά όχι και την ικανότητά της να επάγει την ενεργοποίηση των effector κασπασών και την απόπτωση. Προκύπτει έτσι ότι η SHP-1-/κασπάση-8 μεσολαβούμενη οξινοποίηση συμβαίνει σε άλλο σημείο από αυτό του μιτοχονδρίου και η SST-προκαλούμενη απόπτωση είναι ανεξάρτητη της αποδιοργάνωσης της μιτοχονδριακής λειτουργίας και της ενεργοποίησης της κασπάσης-9 (Liu et al., 2000).

Τελευταίες μελέτες έχουν δείξει, ακόμα, ότι η σωματοστατίνη αναστέλλει την παραγωγή IL-6 και IFN- γ από λεμφοκύτταρα και περιτοναϊκά μακροφάγα. Εξετάστηκε η

έκφραση ρυθμιστών της απόπτωσης, όπως το p53, το Bcl-2, το Bax, η inducible nitric oxide synthase (iNOS), ο Fas, η κασπάση-8 και το NO σε thioglycolate-εξαγόμενα περιτοναϊκά μακροφάγα. Η σωματοστατίνη επέφερε θετική ρύθμιση στην δραστηριότητα των p53, Bcl-2, Fas και κασπάση-8, ενώ επέφερε αρνητική ρύθμιση στην iNOS έκφραση και στην παραγωγή NO. Οπότε, φάνηκε ότι η απόπτωση μέσω σωματοστατίνης μπορεί να συμβαίνει μέσω μίας Bax- και NO- ανεξάρτητης συσσώρευσης p53 και μέσω των οδών Fas και κασπάσης-8 ενεργοποίησης (Kang et al., 2001).

Η οκτρεοτίδη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων χολαγγειοκαρκινώματος (μέσω του SSTR2), μέσω αναστολής του κυτταρικού κύκλου στην G0/G1 παρά μέσω απόπτωσης, αποτέλεσμα μεσολαβούμενο μερικώς μέσω ενίσχυσης της έκφρασης του p27 και μειώνοντας την ποσότητα του συμπλέγματος της cyclin-E-CDK2 κινάσης (cyclin-dependent kinase-2). Σε πειραματικό προλακτίνωμα αρουραίου, η δράση της οκτρεοτίδης σχετίζεται σε έναν βαθμό με την επαγωγή απόπτωσης και με αυξημένη έκφραση του bax. Η σχετιζόμενη με την μεμβράνη SHP-1 απαιτείται για την επαγόμενη από υποδοχέα κυτταροτοξική σηματοδότηση, που προκαλεί ενδοκυττάρια οξινοποίηση και απόπτωση. Παράλληλα, το Bcl-2 δρα απόμακρα από τον SHP-1 και το p53, παρεμποδίζοντας την προκαλούμενη οξινοποίηση, αλλά δεν μπορεί να αναστείλλει τα αποπτωτικά γεγονότα που επακολουθούν της ενδοκυττάριας οξινοποίησης.

Παράλληλα, η θεραπεία με οκτρεοτίδη σχετίζεται με αυξημένη αποπτωτική κατάπτωση του DNA σε εντεροκύτταρα. Προάγει την απόπτωση τόσο στα τμήματα των λαχνών όσο και των κρυπτών. Κάποια προδιάθεση στην απόπτωση ίσως να παίζει ρόλο στις επιδράσεις της οκτρεοτίδης στην εντερική ανάπλαση και προσαρμογή. Σε άλλη μελέτη, παρατηρήθηκε η επαγωγή του wt-p53, του Bax και όξινης ενδονουκλεάσης, κατά την μεσολαβούμενη από σωματοστατίνη απόπτωση των MCF-7 κυττάρων καρκινώματος του μαστού, χωρίς αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση. Ο επαγόμενος από την οκτρεοτίδη αποπτωτικός κατακερματισμός του DNA, προκλήθηκε από επιλεκτική ενεργοποίηση μίας μη ευαίσθητης σε κατιόντα όξινης ενδονουκλεάσης.

Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι η οκτρεοτίδη προκαλεί απόπτωση στον oxyntic βλεννογόνο του στομάχου (Erlandsen et al., 2007). Ανιχνεύθηκε αυξημένη έκφραση των προαποπτωτικών γονιδίων KLF10 και MAL, καθώς και του HIP-1, που σχετίζεται με την ενεργοποίηση των κασπασών. Πιο συγκεκριμένα, αλληλεπιδρά με τον HIP1 για τον σχηματισμό προκασπάσης-8, ως μέρος ενός νέου προαποπτωτικού μονοπατιού (Wanker, 2002). Επίσης, η οκτρεοτίδη μείωσε τα αντιαποπτωτικά γονίδια DAD1 και PRLR.

Παράλληλα, η οκτρεοτίδη αναστέλλει την ανάπτυξη και επάγει απόπτωση στο γαστρικό καρκίνωμα και σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν τον SSTR3, αλλά δεν επηρεάζει κύτταρα με απουσία ή ασθενή έκφρασή του (Hu et al., 2004; Tang et al., 2003). Επίσης, η οκτρεοτίδη έχει αρνητική επίδραση στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων χοληδόχου κύστεως, επάγοντας απόπτωση, πιθανώς μέσω μείωσης της έκφρασης των mutant-type p53 και bcl-2 (Wang et al., 2004). Τέλος, έχει αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση του SSTR2 προάγει την απόπτωση, μέσω μηχανισμού ανεξάρτητου της επαγωγής p53 (Teijeiro et al., 2002).

1.29 Υποδοχείς σωματοστατίνης στο ΗΚΚ

Οι SSTRs αναγνωρίστηκαν σε ηπατικό ιστό από ανθρώπινη ηπατική νόσο (ομογενοποιημένα δείγματα βιοψιών από οξεία/χρόνια ηπατίτιδα, κίρρωση και ΗΚΚ) στην πρωτότυπη μελέτη των Kouroumalis και συνεργατών (Kouroumalis et al., 1998). Οι Dimitroulopoulos και συνεργάτες (Dimitroulopoulos et al., 2007) ανέφεραν 48% των ασθενών με προχωρημένο ΗΚΚ να είναι θετικοί για SSTR, χρησιμοποιώντας Octreoscan (οκτρεοτίδη σημασμένη με indium-111). Οι Blaker και συνεργάτες (Blaker et al., 2004) μελέτησαν 56 περιπτώσεις ΗΚΚ, αναλύοντας την έκφραση SSTR με ανοσοϊστοχημεία, ενώ 6 δείγματα διερευνήθηκαν επιπρόσθετα με RT-PCR (reverse-transcriptase polymerase chain reaction), χρησιμοποιώντας ειδικούς primers. Παρατηρήθηκε διαφοροποίηση και ποικιλία στο προφίλ έκφρασης SSTR, ενώ δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης SSTR, του σταδίου του όγκου, του βαθμού κακοήθειας ή της υποκείμενης ηπατικής νόσου (Blaker et al., 2004). Σύμφωνα με τους συγγραφείς, τόσο το μοτίβο έκφρασης όσο και τα επίπεδα έκφρασης θα μπορούσαν να προβλέψουν την αποτελεσματικότητα των αναλόγων σωματοστατίνης στους συγκεκριμένους όγκους. Σε μία άλλη μελέτη, οι Reynaert και συνεργάτες (Reynaert et al., 2004) ανέφεραν (σε κυτταρικές σειρές) ότι σε φυσιολογικό ήπαρ, τόσο τα ηπατοκύτταρα όσο και τα στελεχιαία ηπατικά κύτταρα ήταν αρνητικά για SSTR, ενώ το κίρρωτικό ήπαρ και το ΗΚΚ παρουσίαζαν έκφραση SSTR. Ακόμα, επιβεβαίωσαν ετερογένεια στην έκφραση SSTR στα ανθρώπινα ΗΚΚ, αλλά δεν μπορούσαν να επιβεβαιώσουν ότι τα ανάλογα που χρησιμοποίησαν επηρέασαν τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Ωστόσο, πρότειναν ότι η διέγερση του SSTR1 ίσως να μειώνει τη διεισδυτικότητα του ΗΚΚ (Reynaert et al., 2004). Οι Liu και συνεργάτες αναφέρουν ότι η οκτρεοτίδη μπορεί να αναστείλλει άμεσα τον

πολλαπλασιασμό του HKK και να επάγει απόπτωση, ενώ η απόπτωση των ηπατοκυττάρων ήταν αμελητέα (Liu et al., 2004). Πρόσφατα, αναφέρθηκε η παρουσία SSTR2, SSTR3 και SSTR5 σε HepG2 κύτταρα, χρησιμοποιώντας RT-PCR (Notas et al., 2004) και σε Hep3B (Notas και συνεργάτες). Μελέτες με ανοσοϊστοχημεία, επίσης, έδειξαν μία ενδοκυττάρια κατανομή των SSTR, σε συμφωνία με προηγηθέντα μοτίβα εσωτερικοποίησης SSTR, μετά από έκθεση σε SST συνδέτες. Στην ίδια μελέτη αναφέρεται η έκφραση από τα HepG2 κορτιστατίνης, ενός νευροπεπτιδίου δομικά όμοιου με την SST και με υψηλή συγγένεια για όλους τους SSTRs, αλλά εμφανίζοντας αντίθετες με την SST δράσεις. Αυτό ίσως να περιπλέκει την αποτελεσματικότητα της SST, καθώς η ενδογενώς παραγόμενη κορτιστατίνη ίσως να ρυθμίζει το μοτίβο έκφρασης των SSTR. Η κορτιστατίνη έχει περιγραφεί σε φυσιολογικό ηπατικό ιστό και σε κύτταρα Kupffer (Notas G et al.,(2005) *LPS modifies the expression and accumulation of Somatostatin receptors in rat Kupffer cells. J Hepatol 42(Suppl 2):232*). Εξερευνώντας το ρόλο των κυττάρων Kupffer σε πειραματικό επίπεδο, φάνηκε ότι ίσως η αντινεοπλασματική δράση της οκτρεοτίδης στο HKK να εξηγείται εν μέρει από την αντιαποπτωτική της δράση στα κύτταρα Kupffer (Xidakis et al., 2004).

Γιατί τα ανάλογα σωματοστατίνης δεν δρουν σε κάθε HKK ή γιατί ένα προηγουμένως ανταποκριθέν HKK σταμάτησε να ανταποκρίνεται στη θεραπεία

Τα ανθρώπινα καρκινώματα διαφέρουν από τους πειραματικούς όγκους (SSTR θετικά μοντέλα), που ανταποκρίνονται στα ανάλογα σωματοστατίνης. Παρά ταύτα, τα περισσότερα δεδομένα σχετικά με την αποτελεσματικότητα των SST αναλόγων στο HKK έχουν προέλθει από πειράματα *in vitro* σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, οπότε περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για τη διερεύνηση του εάν οι μηχανισμοί αυτοί λειτουργούν και *in vivo* (Olias et al., 2004). Στο κυτταρικό επίπεδο, μία διαφυγή του όγκου από το ανασταλτικό αποτέλεσμα των SST αναλόγων θα μπορούσε να αποδοθεί σε αιτίες, όπως:

1. Αρνητική ρύθμιση των SSTR στα καρκινικά κύτταρα, μετά από συνεχή έκθεση στον αγωνιστή (ταχυφυλαξία). Αυτό μπορεί να μεταφράζεται σε μείωση του αριθμού και/ή της συγγένειας των SSTR (Hofland and Lamberts, 2003).
2. Απευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων λόγω αποσύνδεσης του υποδοχέα από ενεργοποίηση δεύτερου μηνύματος (Hofland and Lamberts, 2003).

3. Μη ομοιογενή έκφραση των SSTR σε όγκους με επικράτηση ή εμφάνιση SSTR-αρνητικών κυτταρικών κλώνων (Lamberts et al., 2002;Reynaert et al., 2004).
4. Θετική ρύθμιση των θέσεων πρόσδεσης που δεν αναγνωρίζουν το συγκεκριμένο ανάλογο και/ή διαφυγή των καρκινικών κυττάρων που δεν εκφράζουν καθόλου SSTR (Hofland and Lamberts, 2003).
5. Μεταλλάξεις στα SSTR γονίδια που μπορεί να οδηγήσουν σε απουσία λειτουργικών SSTR πρωτεϊνών (Corbetta et al., 2001).
6. Παραγωγή ενδογενών πεπτιδίων, όπως η κορτιστατίνη, που επηρεάζουν την έκφραση και την εσωτερικοποίηση των SSTR (Notas et al., 2004).
7. Άλλο ένα ενδιαφέρον, αλλά όχι πλήρως κατανοητό φαινόμενο, είναι ότι οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως ο tumor necrosis factor- α (TNF α) και η interleukin-1 (IL-1), επηρεάζουν την έκφραση των SSTR, τουλάχιστον σε κυτταρικές σειρές (Valatas et al., 2004a;Valatas et al., 2004b;Xidakis et al., 2004).

Από κλινικής άποψης, υπάρχουν διάφοροι λόγοι που μπορεί να εξηγήσουν πιθανή φτωχή αποτελεσματικότητα των SST αναλόγων στην αναστολή της ανάπτυξης του όγκου (Slijkhuis et al., 2005). Ακόμα, μια αιτία ίσως είναι η επιλογή ετοιμοθάνατων ασθενών με ΗΚΚ για θεραπεία με οκτρεοτίδη, μη επιτρέποντας ένα λογικό χρονικό διάστημα για να παρατηρηθεί κάποιο θετικό αποτέλεσμα.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έχει δειχθεί σε κλινικές μελέτες (Kouroumalis et al., 1998;Samonakis et al., 2002) ότι απαιτείται ένα διάστημα τουλάχιστον 6 μηνών για να γίνει ορατό κάποιο σημαντικό κλινικό αποτέλεσμα, ενώ στις περισσότερες αρνητικές μελέτες, περισσότεροι του 60% των θεραπευθέντων ασθενών δεν έφτασαν βμηνο θεραπείας με οκτρεοτίδη (Reubi, 2003;Yuen et al., 2002). Αν και οι περισσότερες μελέτες έχουν υιοθετήσει μία περίοδο 4 εβδομάδων υποδόριας χορήγησης οκτρεοτίδης, ακολουθούμενης από 30 mg LAR (long-term octreotide formulation), δεν έχει προσδιοριστεί ιδανικό δοσολογικό σχήμα. Επίσης, φαίνεται ότι ενεργοί πότες με αλκοολική κίρρωση δεν ανταποκρίνονται στην SST, κάτι που βρίσκεται υπό διερεύνηση.

Σε πρόσφατη μελέτη, ένα ανασταλτικό αποτέλεσμα των οπιοειδών στον πολλαπλασιασμό των HepG2 κυττάρων, διαπιστώθηκε να μεσολαβείται από SSTR (Notas et al., 2007). Δεδομένου ότι τα οπιοειδή χρησιμοποιούνται συχνά για την αντιμετώπιση του πόνου, ίσως να εξηγείται η μειωμένη απάντηση του όγκου στα SST ανάλογα. Όσον αφορά την κατάλληλη επιλογή SST αναλόγου, η οκτρεοτίδη, που χρησιμοποιήθηκε στην

πλειοψηφία των μελετών, ίσως να μην αντιπροσωπεύει το ιδανικό ανάλογο, καθώς δεν προσδένεται σε όλους τους SSTRs, ενώ οι SSTRs δεν εκφράζονται πάντα σε υψηλή πυκνότητα ή ομοιογενώς στα ανθρώπινα ΗΚΚ.

Πρωτοποριακή έρευνα από τους Reubi και συνεργάτες (Reubi et al., 1999) έδειξε ότι μόνο το 41% μίας σειράς ΗΚΚ εξέφραζαν SSTR, ποσοστό παρόμοιο με τη συχνότητα ανταπόκρισης των κλινικών μελετών (Deming et al., 2005; Kouroumalis et al., 2003). Οι Blaker και συνεργάτες στη μελέτη τους (Blaker et al., 2004) επιβεβαίωσαν το 40% για την έκφραση του SSTR2 σε ΗΚΚ, ενώ η συνολική έκφραση SSTR1, SSTR3 και SSTR5 ήταν 46%, 64% και 75%, αντίστοιχα, χωρίς έκφραση SSTR4. Οπότε, καλύτερη θεραπευτική στόχευση των SSTR με νέα SST ανάλογα, σε σύγκριση με τα ήδη κλινικά διαθέσιμα (που στοχεύουν κυρίως τον SSTR2 και σε μικρότερο βαθμό τον SSTR5), θα αποτελούσε μία λογική προσέγγιση. Επιπρόσθετα, η στόχευση των SSTR αγνοεί επιλεκτικά την ύπαρξη έκφρασης άλλων πεπτιδίων στον ίδιο όγκο, που μπορεί να έχουν ανασταλτική δράση. Ένα άλλο θέμα είναι ότι υπάρχουν συμπαγή νεοπλάσματα, όπου η SSTR έκφραση συχνά υποδεικνύει απώλεια διαφοροποίησης (αδιαφοροποίητοι όγκοι με νευροενδοκρινική διαφοροποίηση έχουν φτωχή πρόγνωση σε αυτό το στάδιο) (Lamberts et al., 2002). Κλινικές παρατηρήσεις δείχνουν ταχυφυλαξία και/ή αντοχή σε θεραπεία με SST ανάλογο σε ασθενείς με νευροενδοκρινικούς όγκους, ενώ δεδομένα από συμπαγείς νεοπλασίες δεν υπάρχουν. Άμεσες επαρκείς αποδείξεις που να εξηγούν τους αναμειγνυόμενους μηχανισμούς δεν υπάρχουν στην παρούσα φάση (Hofland and Lamberts, 2003).

Ο δυνητικός και δυναμικός ρόλος της SST στην αντιμετώπιση του καρκίνου δεν είναι μία πεπερασμένη ιστορία (Lamberts et al., 2002). Πειραματικές και πρώιμες κλινικές αποδείξεις είναι διαθέσιμες σήμερα. Η κλινική εμπειρία με SST ανάλογα βασίζεται κυρίως σε νευροενδοκρινικούς όγκους, αλλά τελευταία και σε συμπαγείς όγκους και ΗΚΚ. Η θεραπεία με σωματοστατίνη αποτελεί μία καλά ανεκτή θεραπεία, με περιορισμένες παρενέργειες, κάτι που θεωρείται σημαντικό για έναν ευπαθή πληθυσμό, όπως οι κίρρωτικοί. Απαιτούνται καλύτερα σχεδιασμένες, τυχαιοποιημένες μελέτες με σαφώς καθορισμένα χαρακτηριστικά του εξεταζόμενου πληθυσμού, που ίσως να διαφωτίσουν την αξία της χρήσης SST αναλόγων στο ΗΚΚ. Μία στοχευμένη προσέγγιση με συγκεκριμένη εξατομικευμένη χαρτογράφηση των εκφραζόμενων SSTR και με τη χρήση του αναλόγου, κάθε φορά, SST αναλόγου, θα αποτελούσε την ιδανική προσέγγιση, αναγνωρίζοντας έτσι το ιδανικό θεραπευτικό σχήμα και την ομάδα των ασθενών που θα είχαν μεγαλύτερο όφελος. Οι κλινικές δοκιμές των SST αναλόγων, σε συνδυασμό με άλλους θεραπευτικούς

χειρισμούς, όπως ο χημειοεμβολισμός ή ablation, δικαιολογούνται με βάση τα σημερινά δεδομένα.

1.30 Ουρσοδεοξυχολικό οξύ (Ursodeoxycholic acid ή UDCA)

Το ήπαρ είναι υπεύθυνο για την πρόσληψη και μεταφορά χολικών οξέων σε δύο επίπεδα επιθηλικών κυττάρων, τα ηπατοκύτταρα και τα χολαγγειοκύτταρα. Τα ηπατοκύτταρα πρέπει, επίσης, να συνθέσουν αυτές τις ουσίες από χοληστερόλη. Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα χολικά οξέα είναι υπεύθυνα για την γαλακτωματοποίηση των λιπιδίων στον εντερικό αυλό και η σύνθεση και μεταφορά τους οδηγεί τον σχηματισμό της χολής και λειτουργεί ως μονοπάτι αποικοδόμησης της χοληστερόλης. Η δομή τους, τους επιτρέπει να προσκολλώνται σε πρωτεΐνες και να εισέρχονται στη λιπιδική διπλοστιβάδα. Αυτό θα ήταν μοιραίο για την κυτταρική δομή και λειτουργία, εάν το ήπαρ δεν ήταν αποτελεσματικό στη διατήρηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσής τους στο ελάχιστο.

Το ουρσοδεοξυχολικό οξύ (ursodeoxycholic acid ή 3α, 7β-dihydroxy-5β-cholanic acid ή UDCA) είναι ένα υδρόφιλο χολικό οξύ που χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο στη θεραπεία ποικιλίας χολοστατικών διαταραχών (Beuers et al., 1998; Lazaridis et al., 2001). Βρίσκεται φυσιολογικά στην ανθρώπινη χολή, αν και σε χαμηλή συγκέντρωση, αποτελώντας το 3% περίπου του συνόλου των χολικών οξέων. Είναι το βασικό χολικό οξύ στην μαύρη αρκούδα, από όπου και χρησιμοποιήθηκε στην Κινέζικη παραδοσιακή ιατρική για τη θεραπεία ηπατικών ασθενειών (Hagey et al., 1993).

Μετά από χορήγηση από το στόματος, το UDCA απορροφάται με παθητική μη ιοντική διάχυση, κυρίως από το λεπτό έντερο (-80%) και λιγότερο από το παχύ έντερο (-20%), ενώ ακολουθεί διαλυτοποίηση του σε μικτά μικύλλια ενδογενών χολικών οξέων στην εγγύς νήστιδα (Hofmann, 1994; Rubin et al., 1994). Ο βαθμός απορρόφησής του μπορεί να ενισχυθεί όταν χορηγείται με το γεύμα και μπορεί να μειωθεί, σε ασθενείς με μειωμένες χολικές εκκρίσεις ενδογενών χολικών οξέων (Sauer et al., 1999). Μετά την εντερική απορρόφηση, μέσω του αίματος μεταφέρεται στα ηπατοκύτταρα, από όπου και διαπερνά στο χώρο των κολποειδών με τη μεσολάβηση ειδικών μεταφορέων, όπως οι NTCP και OATP. Η μεταφορά του γίνεται μέσω σύζευξής του, κυρίως με γλυκίνη και σε μικρότερο βαθμό με ταυρίνη, ενώ στη συνέχεια μεταφέρεται στο χοληδόχο πόρο μέσω ενός άλλου μεταφορέα, του BSEP (Hofmann, 1994; Kullak-Ublick et al., 2000). Οι συζευγμένες

μορφές του UDCA φτάνουν στο λεπτό έντερο και επανααρροφώνται κυρίως από τον άπω ειλεό, μέσω ενός ενεργού Na⁺-εξαρτώμενου μηχανισμού, με αποτέλεσμα μία αποτελεσματική εντεροηπατική κυκλοφορία. Το μη-απορροφούμενο UDCA και οι συζευγμένες μορφές που διατρέχουν το παχύ έντερο, μετά από βακτηριακή εξουδετέρωση των προσδετών τους, μετατρέπονται κυρίως σε λιθοχολικό οξύ από την εντερική χλωρίδα και αποβάλλονται στα κόπρανα (Hofmann, 1994). Μετά από συνεχή θεραπεία από του στόματος με φαρμακολογικές δόσεις (13-15 mg/kg την ημέρα), το UDCA καθίσταται το κυρίαρχο χολικό οξύ στο ήπαρ και τη συστηματική κυκλοφορία, αποτελώντας το 40% με 60% της χολής (Hofmann, 1994;Rubin et al., 1994).

Οι πρώτες αναφορές για την επίδραση των χολικών οξέων σε ασθενείς με ηπατικές παθήσεις προήλθαν από την Ιαπωνία, περί το 1961 (Hagey et al., 1993). Μέχρι το 1989, ένας σημαντικός αριθμός ελεγχόμενων δοκιμών της χρήσης του UDCA στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση (primary biliary cirrhosis ή PBC) και στην πρωτογενή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (primary sclerosing cholangitis ή PSC) δημοσιεύτηκαν στη δυτική βιβλιογραφία (Leuschner et al., 1989). Έως και σήμερα, το UDCA χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπεία της PBC, για την οποία είναι και το μοναδικό εγκεκριμένο φάρμακο από τον FDA (U.S. Food and Drug Administration).

Είναι κοινώς παραδεκτό ότι σε χολοστατικές διαταραχές, τα ενδογενή χολικά οξέα παραμένουν εντός των ηπατοκυττάρων, οδηγώντας σε προοδευτική επιδείνωση της ηπατικής λειτουργίας. Τα ευεργετικά αποτελέσματα του UDCA στους δείκτες ηπατικής λειτουργίας έχουν αποδοθεί στις φυσικοχημικές του ιδιότητες, καθώς είναι υδρόφιλο, οπότε και μη τοξικό στις βιολογικές μεμβράνες (Attili et al., 1986;Hofmann and Popper, 1987). Παρά ταύτα, αυτό δεν επιβεβαιώθηκε πειραματικά, καθώς δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της χολικής δεξαμενής προς υδρόφιλο χαρακτήρα, κατά τη χορήγηση UDCA (Crosignani et al., 1991). Έχει προταθεί μία άμεση κυτταροπροστατευτική δράση του UDCA, για την οποία διαφορετικοί μοριακοί μηχανισμοί ίσως είναι υπεύθυνοι, όπως η ρύθμιση των κυτταρικών σηματοδοτικών μηχανισμών και η προστασία έναντι της απόπτωσης (Paumgartner and Beuers, 2002). Ανοσορυθμιστικές δράσεις έχουν επίσης περιγραφεί (Paumgartner and Beuers, 2002), παρά το ότι δεν χρησιμοποιείται συνήθως ως ανοσοκατασταλτικό φάρμακο σε μη-ηπατικές ασθένειες.

1.31 UDCA και θεραπεία PBC

Οι περισσότεροι ασθενείς με PBC θεραπεύονται με UDCA (Kaplan and Gershwin, 2005) και η ευρεία χρήση του φαίνεται να έχει αλλάξει τη φυσική πορεία της νόσου (Kaplan and Gershwin, 2005; Lee and Kaplan, 2005). Η θεραπεία με UDCA βελτιώνει ορολογικούς δείκτες, όπως τη χολερυθρίνη, τον σημαντικότερο προγνωστικό δείκτη της νόσου, αλλά και τις ALP, γ-GT, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, χοληστερόλη, όπως και τα επίπεδα του IgM, που αποτελεί ανοσολογικό δείκτη της PBC (Heathcote et al., 1994; Leuschner et al., 1989; Pares et al., 2000). Σύμφωνα με το συνδυασμό των δεδομένων τριών ελεγχόμενων μελετών, το UDCA σε δοσολογία 13 έως 15 mg/kg θεωρείται η προτεινόμενη θεραπεία για την PBC (Poupon et al., 1997). Είναι ασφαλές και οι παρενέργειες λίγες. Σε μερικούς ασθενείς παρουσιάζεται αραίωση της τριχοφυΐας, αύξηση βάρους και/ή διάρροια. Σημαντική αύξηση βάρους που εμφανίζεται στους 12 πρώτους μήνες θεραπείας, επιμένει για όλη τη διάρκεια της θεραπείας και επισυμβαίνει ανεξάρτητα από το βασικό δείκτη μάζας σώματος (body mass index ή BMI) (Siegel et al., 2003). Το UDCA βελτιώνει την 10-ετή επιβίωση (Poupon et al., 1999) και/ή καθυστερεί την εξέλιξη της ηπατικής ίνωσης σε αρχόμενα στάδια της νόσου (Corpechot et al., 2000), καθώς και την ανάπτυξη οισοφαγικών κίρσων σε ασθενείς με PBC (Lindor et al., 1997). Πρόσφατα, μία Ισπανική ομάδα έδειξε ότι μία καλή βιοχημική ανταπόκριση στο UDCA (προσδιοριζόμενη από μία μείωση της alkaline phosphatase > 40% των baseline values ή των φυσιολογικών επιπέδων) εντός 1 έτους από την έναρξη θεραπείας, σχετίζεται με παρόμοια επιβίωση με Ισπανικό πληθυσμό ελέγχου, κάτι που δεν ισχύει για ασθενείς με καμία αρχική ανταπόκριση (Pares et al., 2006). Τα ευρήματα αυτά δεν συναντώνται σε ασθενείς προχωρημένης νόσου. Μη τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες από την Ελλάδα και την Ολλανδία, δείχνουν ότι, οι περισσότεροι ασθενείς με PBC (ιδιαίτερα αυτοί που βρίσκονται σε πρώιμα στάδια νόσου), εμφανίζουν 10-ετή επιβίωση συγκρίσιμη με αυτή του γενικού πληθυσμού (Koulentaki et al., 2004; ter Borg et al., 2006). Τελευταία μετα-ανάλυση έδειξε ότι η παρατεινόμενη θεραπεία με μεσαίες δόσεις UDCA (10–20 mg/kg/day) βελτιώνει την ηπατική βιοχημεία και την επιβίωση ελεύθερη-μεταμόσχευσης, ενώ καθυστερεί την ιστολογική εξέλιξη σε ασθενείς πρώιμης νόσου (Shi et al., 2006). Αντιφατικές, πάντως, παραμένουν οι απόψεις για το εάν η θεραπεία της PBC με UDCA βελτιώνει τελικά την επιβίωση. Η πιο τελευταία μετα-ανάλυση της ομάδας Cochrane, συμπεριέλαβε 6 δοκιμές μικρής χρονικής διάρκειας, μερικές εκ των οποίων μη

τυχαιοποιημένες μελέτες, ενώ υπήρχαν λάθη στη συλλογή δεδομένων με ποικίλουσες δοσολογίες UDCA. Έτσι, τα αποτελέσματά τους που δείχνουν ότι δεν υπάρχει κανένα όφελος στην επιβίωση των ασθενών, προβληματίζουν (Gong et al., 2007).

Σε πολύ πρόσφατη πολυκεντρική, προοπτική μελέτη, οι Kuiper και συνεργάτες, παρακολούθησαν τις μεταβολές και την προγνωστική αξία των ηπατικών βιοχημικών εξετάσεων, σε θεραπευόμενους με UDCA ασθενείς με PBC (Kuiper et al., 2009). Η PBC ταξινομήθηκε ως πρόωμη (επίπεδα χολερυθρίνης και αλβουμίνης φυσιολογικά προ θεραπείας), μέτρια προχωρημένη (ένα επίπεδο διαταραγμένο) και προχωρημένη (και τα δύο επίπεδα διαταραγμένα). Η βιοχημική ανταπόκριση ορίστηκε σύμφωνα με τον Pares (μείωση αλκαλικής φωσφατάσης [ALP] >40% από τη βασική τιμή της ή τη φυσιολογική τιμή), σύμφωνα με τον Corpechot (ALP <3-φορές το ανώτατο φυσιολογικό όριο της φυσιολογικής, aspartate aminotransferase <2-φορές το ανώτατο φυσιολογικό της όριο, επίπεδα χολερυθρίνης <1-φορά το ανώτατο φυσιολογικό όριο) και σύμφωνα με τους ιδίους (Rotterdam; Κανονικοποίηση των διαταραγμένων τιμών χολερυθρίνης και/ή αλβουμίνης). Η μελέτη συμπεριέλαβε 375 ασθενείς, με διάμεσο χρόνο παρακολούθησης 9,7 έτη. Η πρόγνωση της πρόωμης PBC ήταν συγκρίσιμη με αυτή του Dutch πληθυσμού και καλύτερη από την προβλεπόμενη από το Mayo σκορ επικινδυνότητας. Η επιβίωση αυτών που ανταποκρίνονταν ήταν καλύτερη από αυτών που δεν ανταποκρίνονταν, σύμφωνα με τα κριτήρια Corpechot και Rotterdam ($P < .001$). Η πρόγνωση της πρόωμης PBC ήταν συγκρίσιμη για ανταποκριθέντες και μη, ενώ στην μέτρια προχωρημένη, οι ανταποκριθέντες είχαν αισθητά καλύτερη πρόγνωση. Οπότε και φαίνεται ότι, ενώ η πρόγνωση UDCA-θεραπευόμενων ασθενών με πρόωμη PBC είναι συγκρίσιμη με αυτή του γενικού πληθυσμού, σε προχωρημένο νόσο με βιοχημική ανταπόκριση η πρόγνωση είναι πολύ καλύτερη, συγκριτικά με τους μη ανταποκριθέντες. Το UDCA φαίνεται να ωφελεί ανεξάρτητα από το στάδιο της νόσου, ενώ η προγνωστική πληροφορία από τις μετρήσεις χολερυθρίνης και αλβουμίνης, είναι ανώτερη από αυτή της αλκαλικής φωσφατάσης (Kuiper et al., 2009).

Έχει, ακόμα, προταθεί ότι το 20% τουλάχιστον των ασθενών, δε θα εμφανίσουν ιστολογική εξέλιξη της νόσου για 4 έτη, ενώ κάποιοι ακόμα και για μια δεκαετία ή περισσότερο (Locke, III et al., 1996). Σε 4 μελέτες παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση ποικιλίας ιστολογικών δεικτών (Combes et al., 1995; Heathcote et al., 1994; Pares et al., 2000; Roupon et al., 1991). Η ομάδα της Mayo Clinic δεν αναφέρει βελτίωση στην ηπατική ιστολογία, αλλά αναφέρει σε ξεχωριστή δημοσίευση, καθυστέρηση της εμφάνισης

οισοφαγικών κισσών με τη χορήγηση UDCA (Lindor et al., 1997), αναδεικνύοντας όφελος στην εξέλιξη της νόσου με τη χορήγηση UDCA. Επίσης, μεταξύ των έξι μελετών που εκτίμησαν την αποτελεσματικότητα του UDCA στον κνησμό (Combes et al., 1995;Eriksson et al., 1997;Heathcote et al., 1994;Lindor et al., 1994;Pares et al., 2000;Poupon et al., 1991), βελτίωση παρατηρήθηκε μόνο σε τρεις (Combes et al., 1995;Pares et al., 2000;Poupon et al., 1991), αλλά οι μελέτες αυτές δεν σχεδιάστηκαν αποκλειστικά για την αξιολόγηση του κνησμού. Όσον αφορά σημαντικές παρενέργειες, δεν υπάρχουν δεδομένα που να δείχνουν τερατογένεση από UDCA, αλλά είναι προτιμητέο να διακόπτεται η αγωγή πριν την εγκυμοσύνη και κατά το πρώτο τρίμηνο. Το UDCA χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ενδοηπατικής χολόστασης στην εγκυμοσύνη (Palma et al., 1992) και δε φαίνεται να είναι τοξικό για το έμβρυο, αν χορηγηθεί κατά το 2^ο ή 3^ο τρίμηνο της εγκυμοσύνης.

Συνοπτικά, φαίνεται ότι το UDCA είχε ευεργετικά αποτελέσματα στη φυσική ιστορία της PBC, αλλά μία απόλυτη απόδειξη της ωφέλειας αυτής, πλην της τελευταίας ίσως μελέτης (Kuiper et al., 2009) δεν υφίσταται, επειδή οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν είτε μελέτησαν ανεπαρκή αριθμό ασθενών είτε είχαν ανεπαρκή χρόνο παρακολούθησης είτε υπήρχε ετερογένεια στους δείκτες που εκτιμήθηκαν είτε είχαν ανεπαρκή σχεδιασμό. Στρατηγικές βελτίωσης των θεραπευτικών παραγόντων για την αντιμετώπιση της PBC φαίνεται ακόμα να χρειάζονται, κυρίως μέσω της χορήγησης βοηθητικών παραγόντων. Διάφοροι θεραπευτικοί παράγοντες έχουν δοκιμαστεί σε συνδυασμό με το UDCA. Τα αποτελέσματα από τη συγχορήγηση κολχικίνης και βουδεσονίδης είναι τα πιο υποσχόμενα, αν και δεν φάνηκαν επιπρόσθετα οφέλη, σε όρους σχετικής κλινικής αποτελεσματικότητας, σε σύγκριση με μονοθεραπεία με UDCA (Angulo et al., 2000;Battezzati et al., 2001;Leuschner et al., 1999;Poupon et al., 1996;Rautiainen et al., 2005).

Σε κλινική δοκιμή έχει φανεί ότι η χορήγηση UDCA μείωσε σημαντικά τον κίνδυνο θετικότητας στο αντιγόνο της ηπατίτιδας Β, στο τέλος της θεραπείας, και ανίχνευσης HBV DNA στον ορό, στο τέλος του follow-up. Σε άλλη μελέτη, η χορήγηση UDCA έναντι καμίας θεραπευτικής παρέμβασης για χρόνια ηπατίτιδα Β, μείωσε τον κίνδυνο εμφάνισης παθολογικών τιμών τρανσαμινασών στο τέλος της θεραπείας. Τα χολικά οξέα οδήγησαν σε σημαντική βελτίωση των τρανσαμινασών σε ηπατίτιδα Β και C, αλλά δεν υπήρξε κανένα αποτέλεσμα στην κάθαρση του ιού (Chen, W., J. Liu, and C. Gluud. "Bile acids for viral hepatitis." *Cochrane.Database.Syst.Rev.4* (2007): CD003181).

Παράλληλα, το UDCA ίσως να προλαμβάνει την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε HCV-σχετιζόμενη κίρρωση, όπως φάνηκε από μελέτη 102 ασθενών, σε 56 εκ των οποίων χορηγήθηκε UDCA. Ενδιαφέρον ήταν ότι οι μεταβολές των επιπέδων της ALT στον ορό μεταξύ αυτών που πήραν UDCA και αυτών που δεν πήραν, ήταν παρόμοιες, οπότε το χημειοπροστατευτικό αποτέλεσμα του UDCA δε συνοδεύτηκε από μεγαλύτερες μειώσεις της ALT σε ασθενείς που έλαβαν UDCA, σε σχέση με ασθενείς που δεν έλαβαν (Tarao et al., 2005).

1.32 Μηχανισμοί δράσης UDCA

Πειραματικά δεδομένα έχουν καταδείξει τρεις βασικούς μηχανισμούς δράσης του UDCA: προστατεύει τα χολαγγειοκύτταρα από την κυτταροτοξικότητα των υδρόφοβων χολικών οξέων, διεγείρει την ηπατοχολική έκκριση και προστατεύει τα ηπατοκύτταρα έναντι της απόπτωσης που προκαλείται από τα χολικά οξέα. Ένας ή και όλοι αυτοί οι μηχανισμοί μπορεί να εμπλέκονται σε κάθε εξατομικευμένη περίπτωση χολοστατικής διαταραχής, ανάλογα και με το στάδιο της νόσου. Τα υδρόφοβα χολικά οξέα προκαλούν βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες, σε χαμηλές έως και υψηλές συγκεντρώσεις (micromolar έως millimolar) *in vitro*. Οι συζευγμένες μορφές του UDCA δρουν αντίθετα από τα υδρόφοβα χολικά οξέα (Guldutuna et al., 1993; Heuman et al., 1996). Ο καθορισμός της δομής και της σύνθεσης των μικτών και πλούσιων σε φωσφολιπίδια μικυλλίων της χολής, φαίνεται να ευθύνεται για την προστασία των μεμβρανών από το UDCA (Heuman et al., 1996). Καθώς οι υψηλές συγκεντρώσεις χολικών οξέων ανευρίσκονται μόνο στο χοληφόρο δέντρο, τα παραπάνω *in vitro* ευρήματα φαίνεται να αφορούν μόνο αυτό. Τα φωσφολιπίδια στη χολή, με τη μορφή μικτών μικυλλίων από χολικά οξέα, προστατεύουν τα χολαγγειοκύτταρα έναντι της μεμβρανικής βλάβης που προκαλείται από υδρόφοβα χολικά οξέα. Τα ποντίκια με έλλειψη του *mdr2* γονιδίου μίας P-γλυκοπρωτεΐνης, που δε μπορούν να εκκρίνουν φωσφολιπίδια στη χολή, αναπτύσσουν μία χρόνια μη-διαπυητική χολαγγειίτιδα, που υποδύεται ανθρώπινη χρόνια χολοστατική ηπατική νόσο (Van Nieuwkerk et al., 1996). Ο εμπλουτισμός της χολής με UDCA, την καθιστά πιο υδρόφιλη και λιγότερο κυτταροτοξική. Η χορήγηση UDCA σε ποντίκια μείωσε το βαθμό της χολαγγειοκυτταρικής βλάβης και τη φλεγμονή (Van Nieuwkerk et al., 1996). Αντίστοιχα, σε ασθενείς με PBC και PSC υπό θεραπεία με UDCA, η φλεγμονώδης αντίδραση γύρω από τα χοληφόρα φάνηκε περιορισμένη (Beuers et al., 1992; Heathcote et al., 1994; Pares et

al., 2000; Roupon et al., 1991; Stiehl et al., 1994). Μηχανισμοί Ca^{+2} - and PKC- εξαρτώμενοι φαίνεται να συμβάλλουν στην αντι-χολοστατική δράση συζευγμένων μορφών του UDCA, σε ηπατοκύτταρα (Beuers et al., 2001; Beuers et al., 1993; Beuers et al., 1996).

Σε πειραματικό επίπεδο, το UDCA διεγείρει την απέκκριση χολικών οξέων και άλλων οργανικών ανιόντων (π.χ., γλυκουρονίδια χολερυθρίνης, συνδέτες γλουταθειόνης) και εμποδίζει τη χολόσταση που προκαλείται από υδρόφοβα χολικά οξέα στο ήπαρ αρουραίου (Beuers et al., 2001; Kitani et al., 1985). Παρόμοια, σε ασθενείς με PBC και PSC (Jazrawi et al., 1994), το UDCA διεγείρει την απέκκριση των χολικών οξέων και μειώνει τα επίπεδα της χολερυθρίνης του ορού (Beuers et al., 1992; Heathcote et al., 1994; Lindor, 1997; Lindor et al., 1994; Roupon et al., 1991) και των ενδογενών χολικών οξέων (Roupon et al., 1993). Επίσης, το UDCA διεγείρει την έκφραση πρωτεϊνών-μεταφορέων για την απέκκριση της χολής από τα ηπατοκύτταρα (Fickert et al., 2001) και ευθύνεται για την στόχευση και εισαγωγή μορίων μεταφορέων στην canalicular membrane (Beuers et al., 2001; Kurz et al., 2001). Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι το συζευγμένο με ταυρίνη UDCA (TUDCA), μέσω πολύπλοκης σηματοδότησης, διεγείρει την ηπατοχολική κυστική εξωκύτωση και εισάγει πρωτεΐνες-μεταφορείς στην κορυφαία μεμβρανική επιφάνεια του ηπατοκυττάρου (Beuers et al., 2001; Beuers et al., 1993; Beuers et al., 1996; Haussinger et al., 1993; Kurz et al., 2001; Schliess et al., 1997). Έτσι, φαίνεται ότι το αντι-χολοστατικό αποτέλεσμα του TUDCA οφείλεται, εν μέρει, σε Ca^{+2} - και PKC (protein kinase-C)-εξαρτώμενους μηχανισμούς (Beuers et al., 2001). Οπότε, συζευγμένες μορφές του UDCA βελτιώνουν την διαταραγμένη εκκριτική ικανότητα του χολοστατικού ήπατος μέσω συμπλέγματος ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπου συμμετέχουν το ασβέστιο, η PKC και οι διάφορες MAPK (MAP kinases). Να σημειωθεί ότι τα χολικά οξέα προσλαμβάνονται από τα ηπατοκύτταρα μέσω Na^{+} -εξαρτώμενων και μη, μηχανισμών μεταφοράς. Έχειδειχθεί ότι η πρόσληψη των χολικών οξέων από τα HepG2 κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος μεσολαβείται από το multi-specific organic anion transporting πολυπεπίδιο (OATP), υποδεικνύοντας ότι οι όποιες θεραπευτικές στρατηγικές μπορεί να εξαρτώνται από την έκφραση του Na^{+} ανεξάρτητου OATP μεταφορέα στα κύτταρα του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Ενδεικτικά, τα επίπεδα έκφρασης του OATP στα HepG2 κύτταρα, προσδιορίστηκαν με Northern blot ανάλυση, στο 40%, συγκριτικά με φυσιολογικό ήπαρ (Kullak-Ublick et al., 1996).

1.33 UDCA και απόπτωση

Η απόπτωση αποτελεί βασική μορφή κυτταρικού θανάτου σε χολοστατικές παθήσεις του ήπατος, όπως η PBC (Lazaridis et al., 2001). Για την απόπτωση αυτή έχουν ενοχοποιηθεί οι υψηλές συγκεντρώσεις υδρόφιλων χολικών οξέων στα κύτταρα του ήπατος (Lazaridis et al., 2001). Σε ηπατοκύτταρα αρουραίου, το glycochenodeoxycholic acid ή το glycodeoxycholic acid επάγει απόπτωση με ένα μηχανισμό ενεργοποίησης του Fas υποδοχέα, ανεξάρτητα πρόσδεσης συνδέτη, που ακολουθείται από ενεργοποίηση της κασπάσης-8 και του προ-αποπτωτικού μορίου Bid. Αυτό μεταφέρεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, συνοδευόμενο από το προ-αποπτωτικό μόριο Bax, οδηγώντας στην αύξηση της μεμβρανικής μιτοχονδριακής διαπερατότητας, στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c., στη δημιουργία του αποπτοσώματος, με τη συμμετοχή του μορίου Apaf-1 και στην ενεργοποίηση της κασπάσης-9, με αποτέλεσμα την απόπτωση (Lazaridis et al., 2001). Η αντιαποπτωτική δράση του UDCA έχει καταδειχθεί *in vitro* και *in vivo* σε αρουραίο (Benz et al., 1998;Rodrigues et al., 1998b). Συσχετίστηκε με μείωση της μεμβρανικής μιτοχονδριακής διαπερατότητας και της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος-c (Lazaridis et al., 2001;Rodrigues et al., 1998b). Σε πρόσφατη μελέτη φάνηκε ότι το UDCA, μέσω ενεργοποίησης του epidermal growth factor υποδοχέα και των MAPK κινασών, επάγει ένα σήμα επιβίωσης στα ηπατοκύτταρα, που μπορεί να συμβάλλει στην αντιαποπτωτική του δράση (Qiao et al., 2002). Γενικότερα, η βαρύτητα της αντιαποπτωτικής δράσης του UDCA, στα πλαίσια της ευεργετικής του δράσης στις χολοστατικές παθήσεις του ήπατος, δεν έχει διευκρινιστεί επαρκώς μέχρι σήμερα. Μεταξύ των διαφόρων πιθανών στόχων δράσης του UDCA στις χρόνιες χολοστατικές παθήσεις, είναι και η ρύθμιση της κυτταρικής ανοσίας, μέσω της αναστροφής της παρεκκλίνουσας έκφρασης HLA τάξης I μορίων στα ηπατοκύτταρα (Beuers et al., 1992;Calmus et al., 1990). Αν και φαίνεται η δράση αυτή να είναι δευτερεύουσα του βασικού αντι-χολοστατικού αποτελέσματος του UDCA. *In vitro* μελέτες αναφέρουν την άμεση ανοσορυθμιστική δράση του UDCA στην κυτταροκινική έκκριση των περιφερικών μονοκυττάρων, αν και έχουν αμφισβητηθεί μεθοδολογικά (Bergamini et al., 1997).

Το UDCA και οι συζευγμένες μορφές του, δρώντας ποικιλοτρόπως, ίσως αντιπροσωπεύουν μία αποτελεσματική θεραπευτική στρατηγική για ασθένειες, όπου εμφανίζεται αυξημένη απόπτωση. Ένας από τους μηχανισμούς που πρέπει να διερευνηθεί είναι ο τρόπος ρύθμισης της γονιδιακής αντιγραφής, από το UDCA. Το UDCA φάνηκε

οπτικά να συσσωρεύεται στον πυρήνα των ηπατοκυττάρων, ένδειξη πιθανού σχηματισμού συμπλεγμάτων, μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα πρωτεϊνικά συμπλέγματα. Όπως και άλλα χολικά οξέα, το UDCA ίσως προσδένεται άμεσα στο DNA, αν και θα πρέπει να αλληλεπιδράσει με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μέσα στον πυρήνα, για να ρυθμίσει τη γονιδιακή έκφραση. Βασικός υποψήφιος θεωρείται κάποιος μεταγραφικός παράγοντας, καθώς έχει δείχθει ότι το UDCA μπορεί να καταστείλει την p53-επαγόμενη έκφραση του Bax. Ακόμα, το UDCA ρυθμίζει την έκφραση της E2F-1 πρωτεΐνης και του ίδιου του p53, κάτι που δείχνει ότι άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζονται με παρόμοιο τρόπο.

Την επόμενη δεκαετία θα αποκαλυφθεί, σχεδόν βέβαια, η αξία των βασιζόμενων στην απόπτωση θεραπειών, για τον έλεγχο των ανθρώπινων ασθενειών. Το UDCA, ένα ενδογενές υδρόφιλο χολικό οξύ, παρουσιάζει ενδιαφέρον, διότι ρυθμίζει το αποπτωτικό κατώφλι, δρώντας σε ποικιλία διαφορετικών μονοπατιών. Έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά στη θεραπεία ηπατικών ασθενειών με αυξημένη απόπτωση, συμπεριλαμβανομένης των PBC, PSC, παιδιατρικών χολοστατικών διαταραχών, κυστικής ίνωσης και ενδοηπατικής χολόστασης, σχετικής με εγκυμοσύνη (Pouyon et al., 1994;Rubin et al., 1994). Στη συζευγμένη του μορφή, με ταυρίνη, όταν χορηγηθεί σε υψηλές δόσεις μεταφέρεται σε ιστούς εκτός ήπατος, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου. Με βάση την παρατήρηση αυτή, έχει δείχθει in vitro και in vivo, η ευεργετική δράση του taurooursodeoxycholic acid (TUDCA) σε συγκεκριμένες οξείες και χρόνιες νευροεκφυλιστικές διαταραχές, που σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα απόπτωσης. Το TUDCA είναι ένα εν δυνάμει νευροπροστατευτικό, όχι μόνο σε φαρμακολογικά και διαγονιδιακά μοντέλα νόσου Huntington (Keene et al., 2002;Keene et al., 2001), αλλά και σε οξύ ισχαιμικό και εγκεφαλικό επεισόδιο (Rodrigues et al., 2003;Rodrigues et al., 2002). Λόγω της κλινικής του ασφάλειας, το UDCA αποτελεί δυναμική θεραπευτική επιλογή σε σειρά βλαβών, σχετιζόμενων με την απόπτωση.

Η συνέργεια μεταξύ εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων αποπτωτικών μονοπατιών, ενισχύει τον καθοριστικό ρόλο των μιτοχονδρίων στον αποπτωτικό θάνατο. Το UDCA δείχθηκε να αναστέλλει μερικώς το εξωκυττάρια-ενεργοποιούμενο αποπτωτικό μονοπάτι σε ηπατοκύτταρα ποντικού, σε συγκαλλιέργειες με ινοβλάστες που εκφράζουν τον Fas συνδέτη, πιθανώς μέσω άμεσης δράσης στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Azzaroli et al., 2002). Τα κυτταρικά μονοπάτια επιβίωσης πυροδοτούνται από μία ποικιλία παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των κυτταροκινών της TNF υπεροικογένειας (Gaur and Aggarwal, 2003) και των χολικών οξέων (Rust et al., 2000).

Τα ερεθίσματα επιβίωσης μεταβιβάζουν ενδοκυττάρια το σήμα επιβίωσης, μέσω ενεργοποίησης διαμεμβρανικών υποδοχέων, που είτε έχουν δράση εσωτερικής τυροσινικής κινάσης (π.χ. ο insulin-like growth factor I receptor) είτε συνδέονται έμμεσα με τυροσινικές κινάσες (π.χ. ιντεγκρίνες) είτε συνδέονται έμμεσα με επταμερείς διαμεμβρανικούς G protein-coupled υποδοχείς (Clark and Brugge, 1995). Τέτοιες πρωτεϊνικές-κινάσες μπορούν να αποτελέσουν φαρμακευτικό στόχο για την επαγωγή απόπτωσης, στη θεραπεία του καρκίνου.

Η ικανότητα τροφικών παραγόντων να προωθούν την κυτταρική επιβίωση έχει αποδοθεί, εν μέρει, στον σηματοδοτικό καταρράκτη των phosphatidylinositide 3'-OH kinase (PI3K)/c-Akt κινασών. Στην πραγματικότητα, η ενεργοποίηση διαμεμβρανικών υποδοχέων έχει αποτέλεσμα την ανασύνταξη PI3K ισομορφών στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, ως αποτέλεσμα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, που ρυθμίζονται από προσδέτη (Toker and Cantley, 1997). Η οικογένεια των Akt κινασών ενεργοποιείται μετά από διάφορους υποδοχείς παραγόντων ανάπτυξης και ογκοπρωτεϊνών, που πυροδοτούν την ενεργοποίηση της PI3K. Το UDCA και το TUDCA φάνηκε να προστατεύουν την ελεγχόμενη από τα μιτοχόνδρια απόπτωση, ενεργοποιώντας το PI3K μονοπάτι επιβίωσης σε ηπατοκύτταρα και σε φλοιώδεις νευρώνες αρουραίου, αντίστοιχα (Schoemaker et al., 2004; Sola et al., 2003a). Άλλος μηχανισμός παρεμπόδισης της απόπτωσης σε ηπατοκύτταρα από το UDCA είναι η ενεργοποίηση του MAPK σήματος επιβίωσης (Qiao et al., 2002). Οι ενεργοποιημένες, μέσω MAPK, κινάσες, οι Rsk, καταλύουν τη φωσφορυλίωση του Bad *in vitro* και *in vivo*. Οι Rsk φαίνεται, επίσης, να ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα CREB, που με τη σειρά του προωθεί την κυτταρική επιβίωση (Bonni et al., 1999). Το UDCA αναστέλλει την ηπατοκυτταρική απόπτωση, ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση του E2F-1/Mdm-2/p53/Bax αποπτωτικού μονοπατιού, με έναν κασπάση-ανεξάρτητο τρόπο (Sola et al., 2003b). Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση της μεταγραφής του E2F-1, η μείωση του παράγοντα Mdm-2, η σταθεροποίηση του p53 και οι μεταβολές στην έκφραση της Bcl-2 οικογένειας, καταργήθηκαν από το UDCA, κατά την ηπατοκυτταρική απόπτωση. Ακόμα, επί απουσίας κάποιου τοξικού ερεθίσματος, το UDCA εμπόδισε την επαγωγή του p53 και του Bax, μέσω υπερέκφρασης των E2F-1 και p53, αντίστοιχα, αποτελώντας ένδειξη της επιλεκτικής ρύθμισης του κυτταρικού θανάτου σε διαφορετικά βήματα, από το UDCA. Έχει, επίσης, δειχθεί ότι το UDCA ρυθμίζει το E2F-1/Mdm-2/p53 αποπτωτικό μονοπάτι μέσω μηχανισμού εξαρτώμενου από έναν πυρηνικό στεροειδικό υποδοχέα (nuclear steroid

receptor ή NSR) (Sola et al., 2004). Η προηγούμενη χορήγηση UDCA σε ηπατοκύτταρα, οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του NSR, σε συνδυασμό με μειωμένη απόπτωση. Το UDCA πρέπει να αλληλεπιδρά άμεσα με μία συγκεκριμένη θέση της περιοχής σύνδεσης συνδέτη, επί του NSR, οδηγώντας στην αποσύνδεση του NSR, στη μεταφορά ενός UDCA-NSR συμπλέγματος και στην αναστολή γονιδίων σχετιζόμενων με την επαγωγή απόπτωσης (Sola et al., 2005).

Έχει δειχθεί ότι η αντιφλεγμονώδης δράση της πλειοψηφίας των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών, δεν είναι DNA εξαρτώμενη, αλλά είναι αποτέλεσμα μίας περίπλοκης σειράς αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών, που οδηγούν στην μεταγραφική αναστολή προ-φλεγμονωδών παραγόντων. Το UDCA, ενεργοποιώντας μη-ειδικά τον γλυκοκορτικοειδικό υποδοχέα, μπορεί να ενεργοποιήσει ή να καταστείλει συγκεκριμένα αντι-αποπτωτικά μονοπάτια και/ή μονοπάτια επιβίωσης μέσα στο ηπατοκύτταρο. Ένα βασικό μονοπάτι επιβίωσης, στα κύτταρα του ήπατος, είναι το μονοπάτι ενεργοποίησης της μεταγραφής του NF-kB (nuclear factor NF-kB), που αποτελεί έναν επαγόμενο μεταγραφικό παράγοντα ρύθμισης σειράς γονιδίων, εμπλεκόμενων στη φλεγμονή και την ανοσιακή απάντηση (Buckbinder and Robinson, 2002). Υπάρχουν διαφορετικά κλασσικά και εναλλακτικά μονοπάτια ενεργοποίησης και καταστολής των NF-kB-ρυθμιζόμενων γονιδίων επιβίωσης. Η αναστολή του NF-kB από τα γλυκοκορτικοειδή έχει δειχθεί ότι αποτελεί έναν λογικό μηχανισμό δράσης των γλυκοκορτικοειδών έναντι της φλεγμονής, της απόπτωσης και της ανοσοκαταστολής (Buckbinder and Robinson, 2002). Οι Miura και συνεργάτες έδειξαν ότι το UDCA καταστέλλει την NF-kB εξαρτώμενη μεταγραφή, μέσω αλληλεπίδρασης με την p65 υπομονάδα του (Miura et al., 2001), ενώ προηγήθηκε μη ειδική ενεργοποίηση του γλυκοκορτικοειδικού υποδοχέα. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, άλλα μονοπάτια επιβίωσης που ενεργοποιούνται από το UDCA είναι το μονοπάτι των MAP κινασών (mitogen activated protein kinases ή MAPK) και το μονοπάτι της PI-3 κινάσης (phosphatidylinositol-3 kinase ή PI3K), αποτελούμενο από τρία διαφορετικά μονοπάτια (extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), p38 και c-Jun amino-terminal kinase). Αυτοί οι καταρράκτες κινασών, οδηγούν στη συνέχεια στην ενεργοποίηση σειράς κυτταρικών μεσολαβητών, εκ των οποίων σημαντικότερη είναι η A serine threonine protein kinase (Akt). Οι μηχανισμοί με τους οποίους η PI3K προωθεί την κυτταρική επιβίωση είναι διαφορετικοί. Τελευταία, οι Shoemaker και συνεργάτες έδειξαν ότι το p38 και η ERK και το MAPK και PI3K μονοπάτι, αναμειγνύονται στην προστασία που επάγει το TUDCA

έναντι της GCDCA-επαγόμενης απόπτωσης σε καλλιέργεια ηπατοκυττάρων αρουραίου (Schoemaker et al., 2004). Αντίθετα με τα ευρήματα των Miura και συνεργατών στο UDCA (Miura et al., 2001), δεν υπήρξαν ενδείξεις ανάμειξης του NF-kB μονοπατιού στην κυτταροπροστατευτική δράση του TUDCA (Schoemaker et al., 2004). Παρά το ότι υπάρχουν ενδείξεις ότι οι βασικές αντι-φλεγμονώδεις και αντι-αποπτωτικές δράσεις του UDCA και του TUDCA ακούνται μέσω μη-ειδικής διέγερσης του γλυκοκορτικοειδικού υποδοχέα, μελέτες απαιτούνται γύρω από τους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης χολικών οξέων και ενός συμπλέγματος μετα-μεταγραφικών αλληλεπιδράσεων, που επισυμβαίνουν σε κυτταροπλασματικό και πυρηνικό επίπεδο, στα ηπατοκύτταρα.

Όπως προαναφέρθηκε, το UDCA, όπως και τα TUDCA, TCDCA και TCA φάνηκε να προστατεύουν τα ηπατοκύτταρα από Fas-L-επαγόμενη απόπτωση. Το προστατευτικό αυτό αποτέλεσμα δεν συσχετίστηκε με μείωση στον τριμερισμό του Fas, παρά σε άμεση δράση στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Azzaroli et al., 2002). Το UDCA μείωσε σημαντικά την DCA-προκαλούμενη διαταραχή του διαμεμβρανικού μιτοχονδριακού δυναμικού, αλλά και την προκαλούμενη παραγωγή αντιδραστικών ριζών οξυγόνου και συσσώρευση της πρωτεΐνης Bax. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε απομονωθέντα μιτοχόνδρια από τροφικά διατρεφόμενα με UDCA (Rodrigues et al., 1998b). Σε μελέτη απόπτωσης ηπατοκυττάρων αρουραίου, προκαλούμενη από deoxycholic acid, okadaic acid και transforming growth factor b1, φάνηκε ότι το UDCA ανέστειλλε 80% την αποπτωτική πυρηνική κατάτμηση, μειώνοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c κατά 70-75%, μειώνοντας τη μιτοχονδριακή μεμβρανική διαπερατότητα, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών, καθώς επίσης μειώνοντας τα επίπεδα της Bax πρωτεΐνης και τη διάσπαση της poly(ADP-ribose) πολυμεράσης (τελικό στάδιο απόπτωσης) (Rodrigues et al., 1999). Η συγχορήγηση UDCA με αιθανόλη, TGF-b1, Fas συνδέτη ή okadaic acid, οδήγησε σε 50-100% μείωση των αποπτωτικών ευρημάτων, συγκριτικά με την μεμονωμένη αποπτωτική δράση των παραγόντων αυτών σε απομονωθέντα ηπατοκύτταρα και σε καλλιέργειες κυττάρων ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Το UDCA, επίσης, μείωσε τη σχετιζόμενη με DCA και phenylarsine oxide μεμβρανική μιτοχονδριακή διαπερατότητα, σε απομονωθέντα μιτοχόνδρια, κατά 40% και 50%, αντίστοιχα. Οπότε και προτάθηκε η ρύθμιση του αποπτωτικού κατωφλίου σε ηπατοκύτταρα από το UDCA, μέσω αναστολής της MPT (Rodrigues et al., 1998a).

Σε μία προσπάθεια διερεύνησης της προστατευτικής δράσης του TUDCA έναντι της βλαπτικής επίδρασης του glycochenodeoxycholic acid (GCDCA), ενός υδρόφοβου

χολικού οξέος, μελετήθηκαν καλλιέργειες ηπατοκυττάρων, υπό την μεμονωμένη επίδραση ή το συνδυασμό των παραπάνω παραγόντων. Βρέθηκε ότι το GCDCΑ σε χαμηλές δοσολογίες προκάλεσε απόπτωση και σε μεγαλύτερες κυτταρόλυση, ενώ το TUDCA δεν είχε κυτταροτοξική δράση σε ευρεία γκάμα συγκεντρώσεων. Σε συγχορήγηση, υπήρξε προστασία των ηπατοκυττάρων, από τη βλαπτική επίδραση του GCDCΑ (Danchenko et al., 2001).

Η TGF-β1 μεσολαβούμενη απόπτωση των ηπατοκυττάρων συσχετίζεται με την ενεργοποίηση των E2F μεταγραφικών παραγόντων και την p53 σταθεροποίηση, μέσω του παράγοντα Mdm-2, ρυθμίζοντας έτσι μια σειρά γονιδίων-στόχων. Σε ηπατοκύτταρα που επώαστηκαν με TGF-β1 παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του E2F-1, 5 φορές αύξηση του p53, 2 φορές μείωση του αναστολέα του, Mdm-2, καθώς επίσης σημαντική επαγωγή του *bax* mRNA και συνακόλουθη αύξηση της Bax πρωτεΐνης. Το UDCA ανέστειλλε την E2F-1 μεταγραφική ενεργοποίηση, την p53 σταθεροποίηση και την έκφραση Bcl-2 πρωτεΐνης, μέσω ενός κασπασο-ανεξάρτητου μηχανισμού. Επί απουσίας TGF-β1, το UDCA παρεμπόδιζε την επαγωγή της έκφρασης p53 και Bax, μέσω υπερέκφρασης E2F-1 και p53, αντίστοιχα. Επίσης, ανέστειλλε την TGF-β1-μεσολαβούμενη αποικοδόμηση του nuclear factor κB (NF-κB) και του αναστολέα του, IκB. Οπότε, φάνηκε ότι το UDCA ανέστειλλε την E2F-1 μεταγραφική ενεργοποίηση της ηπατοκυτταρικής απόπτωσης, παρεμβαίνοντας στη σταθεροποίηση του p53, στην αποικοδόμηση του NF-κB και στην έκφραση πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας (Sola et al., 2003b).

Με σκοπό τη διερεύνηση της δράσης του UDCA και της συζευγμένης με ταυρίνη μορφής του, σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων, προσδιορίστηκαν οι γενετικές επιπτώσεις του, όσον αφορά την παραγωγή micronuclei (MN), τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την επαγωγή απόπτωσης. Επίδραση με UDCA (από τα 10μg/ml) προκάλεσε δόσο-εξαρτώμενη αύξηση στα MN, ενώ το TUDCA προκάλεσε ασήμαντη αύξηση (έως και τα 1000μg/ml). Και τα δύο χολικά οξέα ανέστειλλαν σε σημαντικό βαθμό την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (το UDCA στη συγκέντρωση των 100μg/ml και το TUDCA σε συγκεντρώσεις από 300 έως 1000μg/ml), ενώ κανένα από τα δύο δεν είχε επίδραση στην απόπτωση. Φάνηκε, έτσι, η πιθανή γονοτοξική δράση του UDCA (Fimognari et al., 2001).

Προ-επώαση αισθητικών νευρώνων με UDCA ανέστειλλε την επαγόμενη από cisplatin (αντι-καρκινικό φάρμακο) απόπτωση και συσσωρευση p53, αναδεικνύοντας ένα

νευρο-προστατευτικό ρόλο του UDCA στον θάνατο των αισθητικών νευρώνων, μέσω αρνητικής ρύθμισης του σηματοδοτικού μονοπατιού του p53 (Park et al., 2008).

Επίσης, διερευνήθηκε εάν το TUDCA μπορεί να μειώσει την επαγόμενη από tauroolithocholic acid (TLCA) απόπτωση, ρυθμίζοντας τον ανθρώπινο μεταγραφικό παράγοντα AP-1. Το TUDCA μείωσε σημαντικά την TLCA-επαγόμενη θετική ρύθμιση των cFos και JunB, AP-1 πρωτεϊνών. Επίσης, μείωσε την TLCA-επαγόμενη AP-1 μεταγραφική δραστηριότητα, αναδεικνύοντας ένα πιθανό μηχανισμό αντι-αποπτωτικής δράσης του TUDCA στα ηπατοκύτταρα (Pusl et al., 2008).

Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) προτάθηκε πρόσφατα ως το τρίτο ενδοκυτταρικό τμήμα εκτέλεσης της απόπτωσης. Σε τελευταία μελέτη της επίδρασης του UDCA στη συμπεριφορά της survivin, ενός αναστολέα της απόπτωσης, με τη χορήγηση thapsigargin (TG) προκλήθηκε ER-προκαλούμενη απόπτωση. Το UDCA μείωσε τα επίπεδα της survivin, ενώ ανέστειλλε την TG-προκαλούμενη απόπτωση και την ενεργοποίηση της κασπάσης-12, που χρησιμοποιήθηκε ως ένας από τους δείκτες επύλευσης απόπτωσης. Έτσι, προτάθηκε μία ακόμα μορφή αντι-αποπτωτικής δράσης του UDCA (Sohn et al., 2003). Επίσης, η προκαλούμενη από geranylgeraniol (GGOH), μία ενδιάμεση μορφή μεταβολισμού του μεβαλονικού, απόπτωση κυττάρων HuH-7 ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, αποτράπηκε με την προσθήκη UDCA. Το UDCA οδήγησε στην αποκατάσταση των επιπέδων του Bcl-xL αντιαποπτωτικού παράγοντα, ενώ κατέστειλε τη δραστηριότητα των κασπασών -8, -9 και -3 (Takeda et al., 2001).

Στα πλαίσια διερεύνησης του ρόλου του UDCA στην ηπατοκαρκινογένεση, πραγματοποιήθηκαν *in vivo* και *in vitro* πειράματα. Σε εννήγντα Fisher 344 αρουραίους χορηγήθηκε κλασσική διατροφή (Group 1, n = 30), κλασσική διατροφή εμπλουτισμένη με 0.1% UDCA (Group 2, n = 30), καθώς και διατροφή εμπλουτισμένη με 0.3% UDCA (Group 3, n = 30). Για 6 εβδομάδες, τους χορηγήθηκαν εβδομαδιαίες ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις diethylnitrosamine (DEN). Σε 15 επιπλέον αρουραίους ακολουθήθηκε διατροφή με 0.3% UDCA, χωρίς να χορηγηθεί DEN (Group 4). Οι αρουραίοι θανατώθηκαν 5, 10 και 18 εβδομάδες μετά την τελευταία ένεση DEN. Ο αριθμός των ηπατικών όγκων και το ποσοστό των GST-P-θετικών ηπατοκυττάρων μειώθηκαν σημαντικά με τη θεραπεία με UDCA. Τα PCNA-θετικά κύτταρα μειώθηκαν με τη χορήγηση UDCA στις 18 εβδομάδες. Ο αυξημένος αριθμός αποπτωτικών κυττάρων παρατηρήθηκε στην GST-P-αρνητική περιοχή στις 5, 10 και 18 εβδομάδες και στην GST-P-θετική περιοχή στις 18 εβδομάδες στο UDCA group. Η εμφάνιση Bax στα μιτοχόνδρια και κυτοχρώματος-c στο

κυτταρόπλασμα αυξήθηκε με θεραπεία UDCA, ενώ αυξήθηκε και η δραστηριότητα της κασπάσης-3 στα UDCA groups. Η προσθήκη UDCA σε καλλιέργειες κυττάρων Huh7 και Faο ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, οδήγησε σε δόσο-εξαρτώμενη απόπτωση. Προτάθηκε, έτσι, ότι το UDCA μειώνει την ηπατοκαρκινογένεση μέσω επαγωγής απόπτωσης των 'initiated hepatocytes', καθώς και αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό (Oyama et al., 2002).

Η ενδοφλέβια ένεση Con A ή Fas αντισώματος-αγωνιστή, του Jo2, αποτελεί μοντέλο πρόκλησης αυτοάνοσης ηπατίτιδας σε πειραματόζωα. Η χορήγηση Con A προκαλεί τη συσσώρευση CD4+ T λεμφοκυττάρων στο ήπαρ και ρυθμίζει θετικά την έκφραση FasL, οδηγώντας σε FasL-μεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα. Το NCX-1000 ([2-(acetyloxy)benzoic acid 3-(nitrooxymethyl)phenyl ester]), ένα (NO)-παράγωγο του UDCA, αναστέλλει την ενεργοποίηση των κασπασών, που προκαλείται από Jo2, σε HepG2 κύτταρα. Αυτό επισυμβαίνει μέσω ενδοκυττάριας παραγωγής NO και DTT-αναστρέψιμης αναστολής των προαποπτωτικών κασπασών, προτείνοντας την cysteine S-nitrosylation ως βασικό μηχανισμό της αναστολής τους. Οπότε, το NCX-1000 προστατεύει έναντι της TH1-μεσολαβούμενης ηπατικής βλάβης, αναστέλλοντας προαποπτωτικές και προφλεγμονώδεις κασπάσες (Fiorucci et al., 2001). Ένα άλλο παράγωγο του UDCA, το HS-1030, φάνηκε να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό HepG2 κυττάρων δόσο-εξαρτώμενα, ενώ όπως και σε άλλες μελέτες, το UDCA μόνο του ήταν ανεπαρκές. Αξιοσημείωτο ήταν το ότι δεν είχε καμία επίδραση σε Human Chang ηπατοκύτταρα, μία σειρά φυσιολογικών ηπατοκυττάρων. Η επίδραση αυτή στα HepG2 οφειλόταν σε επαγωγή απόπτωσης, προτείνοντας έτσι το συγκεκριμένο παράγωγο ως υποψήφιο για τη θεραπεία του ηπατώματος (Park et al., 1997). Άλλα, επίσης, παράγωγα, βασισμένα στη δομή του UDCA ή του CDCA (HS-1183, HS-1199 and HS-1200), φάνηκε ότι προκαλούν απόπτωση, εξαρτώμενη από την ενεργοποίηση κασπασών, σε λευχαιμικά, όμως, T-λεμφοκύτταρα.

Σε παρόμοια μελέτη, στην chenodeoxycholic acid (CDCA)-επαγόμενη απόπτωση HepG2 κυττάρων, φάνηκε ότι η κασπάση-9 δραστηριότητα, η κατάτμηση της poly(ADPribose) πολυμεράσης (PARP) και η αποπτωτική κατάτμηση του DNA, παρατηρήθηκαν μόνο σε μεμονωμένη επίδραση με CDCA ή σε συγχορήγηση με TUDCA, αλλά όχι σε συγχορήγηση με UDCA. Το UDCA φάνηκε να συμβάλλει στην κυτταροτοξικότητα του CDCA, επάγοντας κυτταρικό θάνατο με τη μορφή νέκρωσης παρά απόπτωσης, παρεμβαίνοντας στη διαδικασία της απόπτωσης, στο επίπεδο των μιτοχονδρίων (Rolo et al., 2004).

Ενώ το UDCA φάνηκε να προστατεύει από την αποπτωτική δράση των υδρόφοβων χολικών οξέων, το αντίθετο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε στην μιτοχονδριακή φωτοτοξική βλάβη, σε περίπτωση φωτοδυναμικής θεραπείας. Το UDCA ενίσχυσε την απώλεια του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c, την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και την εμφάνιση αποπτωτικού θανάτου, ύστερα από επίδραση ακτινοβολίας σε φωτοευαίσθητα L1210 λευχαιμικά κύτταρα ποντικού ή 1c1c7 κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Τα αποτελέσματα αυτά δεν παρατηρήθηκαν σε προηγούμενα (από την ακτινοβολία) επίδραση με UDCA. Το ίδιο αποτέλεσμα είχαν και οι συζευγμένες μορφές του, ενώ ο μηχανισμός δράσης φάνηκε να σχετίζεται περισσότερο με την ευαισθητοποίηση των μιτοχονδριακών μεμβρανών στην φωτοτοξικότητα (Kessel et al., 2000).

Σχετικά πρόσφατα δείχθηκε ότι το UDCA αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει απόπτωση σε HepG2 και BEL7402 κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Liu et al., 2007). Η επαγωγή απόπτωσης τεκμηριώθηκε με την ανίχνευση της χαρακτηριστικής αποπτωτικής κατάτμησης του DNA και την ανίχνευση του χαρακτηριστικού υπο-G1 κλάσματος κατά τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής (Mohammad et al., 1998).

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από 4 φάσεις: το διάστημα πριν την DNA αντιγραφή (G1), την DNA συνθετική φάση (S), το διάστημα μετά την DNA αντιγραφή (G2) και τη μιτωτική φάση (M) (Cross et al., 1989; Jacobs, 1992). Όταν υπάρχουν διαταραχές στον κυτταρικό κύκλο, αυτός αναστέλλεται και μπορεί να επέλθει απόπτωση (Sherr and Roberts, 1995). Στα κύτταρα των θηλαστικών, κατά την G1 φάση συντίθενται D-τύπου κυκλίνες και παράγοντες επιβράδυνσης για την είσοδο στην S φάση (Fernandez et al., 1998; Nigg, 1995; Pines, 1995). Επιπλέον, οι Cdk αναστολείς ρυθμίζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου δημιουργώντας cyclin/Cdk συμπλέγματα (el-Deiry et al., 1993; Hui et al., 1998). Οι αναστολείς αυτοί ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, συντονίζοντας ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια σήματα και παρακωλύοντας τον κυτταρικό κύκλο σε διάφορα σημεία-ελέγχου (checkpoints) (Xiong et al., 1993). Οι αναστολείς είναι δύο κατηγοριών: οι CIP/KIP και οι INK4 αναστολείς. Η CIP/KIP οικογένεια μπορεί να αναστείλει τη δραστηριότητα κινάσης των Cdks, κατά το σημείο ελέγχου G1/S. Μεταξύ των Cdk αναστολέων, η p21WAF1/CIP1 είναι ένας σημαντικός μεσολαβητής της αναστολής του κυτταρικού κύκλου, επαγόμενος από το p53 γονίδιο, σε απάντηση βλάβης του DNA (Michieli et al., 1994; Waldman et al., 1995).

Στη συγκεκριμένη μελέτη φάνηκε ότι το UDCA προκάλεσε επιλεκτική αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων D-τύπου κυκλινών, ενώ παρατηρήθηκε επιλεκτική αύξηση του p21WAF1/CIP1 Cdk αναστολέα, με έναν p53-εξαρτώμενο μηχανισμό. Ένας άλλος στόχος του cyclin/Cdk συμπλέγματος της G1 φάσης, είναι η pRb, που ρυθμίζεται από Cdk-μεσολαβούμενη φωσφορυλίωση (Tam et al., 1994; Weinberg, 1995). Η pRb είναι, επίσης, γνωστός ρυθμιστής ποικιλίας γονιδίων, που κωδικοποιούν παράγοντες-ρυθμιστές της ανάπτυξης (Adnane et al., 1995; Srikant, 1995). Η επίδραση του UDCA στα HepG2 και BEL7402 κύτταρα οδήγησε σε μείωση της έκφρασης και φωσφορυλίωσης της pRb.

Τα παραπάνω ευρήματα, σε συνδυασμό με την κυτταρομετρική ανίχνευση αύξησης της G0-G1 φάσης, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το UDCA προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην G0-G1 φάση, επάγοντας απόπτωση.

Όπως προαναφέρθηκε, μερικές πρωτεΐνες της bcl-2 οικογένειας (όπως οι Bax και Bad) είναι προαποπτωτικές, ενώ άλλες (όπως οι bcl-2 και Bcl-x1) είναι αντιαποπτωτικές (Farrow and Brown, 1996; Kroemer, 1997; Yang and Korsmeyer, 1996). Μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση bcl-2 μπορεί να αναστείλλει την απόπτωση (Arafat et al., 2000; Hotchkiss et al., 1999), ενώ αυξημένη έκφραση Bax μπορεί να επάγει απόπτωση, καταστέλλοντας τη δραστηριότητα του bcl-2 (Findley et al., 1997). Έχει, ακόμα, αναφερθεί ότι ο λόγος Bax προς bcl-2, παρά η bcl-2 μόνη, είναι καθοριστική για την επιβίωση σε φαρμακο-επαγόμενη απόπτωση (Salomons et al., 1997). Στην παραπάνω μελέτη, το UDCA προκάλεσε δοσο-εξαρτώμενη αύξηση του λόγου Bax προς bcl-2, επάγοντας θετική ρύθμιση στην Bax και αρνητική ρύθμιση στην bcl-2. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι το UDCA δεν αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και δεν επάγει απόπτωση σε L-02 ηπατοκυτταρική σειρά, υποδεικνύοντας μία κυτταρο-επιλεκτική δράση του UDCA.

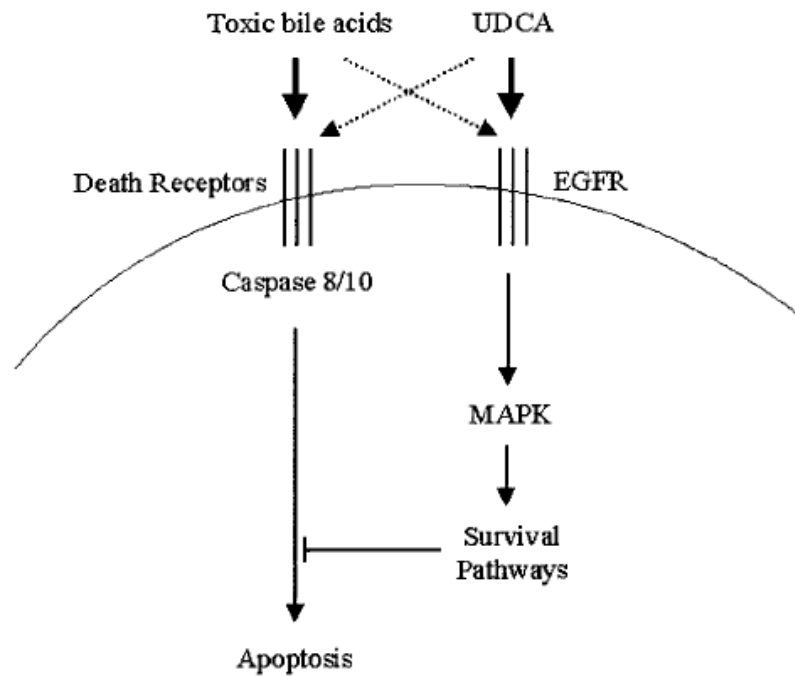
Οι θεραπευτικές δράσεις του UDCA και των συζευγμένων μορφών του με ταυρίνη, έχουν εξεταστεί σε πολλές πειραματικές παθολογικές καταστάσεις, μεταξύ των οποίων και στη νόσο Alzheimer, ως δυνητικοί αντι-αποπτωτικοί παράγοντες. Το TUDCA δεν σταθεροποιεί μόνο τη μιτοχονδριακή μεμβράνη, αλλά εμποδίζει τη μετακίνηση του προ-αποπτωτικού Bax, αναστέλλοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c και την ενεργοποίηση των κασπάσων, όπως επίσης επιδρά σε πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου. Ακόμα, θεωρείται σημαντικός υποψήφιος θεραπευτικός παράγοντας για αυτή τη νόσο, καθώς μπορεί να επάγει και μονοπάτια επιβίωσης (Ramalho et al., 2008).

Το UDCA θεωρείται χημειοπροστατευτικός παράγοντας του καρκίνου του παχέος εντέρου. Εκτός της προκαλούμενης, χαμηλού βαθμού απόπτωσης, φαίνεται να ρυθμίζει τη

χρωματίνη, επάγοντας την υπο-ακετυλίωση των ιστόνων, ενώ αναστέλλει τη δραστηριότητα της τελομεράσης και επάγει τη διαφοροποίηση και τη γήρανση κυττάρων καρκίνου του παχέος εντέρου, ανεξάρτητα από τους παράγοντες p53, p21 και Rb (Akare et al., 2006). Επαγωγή απόπτωσης, μέσω ενεργοποίησης των κασπασών -3, -7, -2 και -8, χωρίς την ανάμειξη του CD95, φάνηκε να προκαλείται κατά την επώαση HT-29 κυττάρων εντερικού καρκινώματος με DCA ή UDCA. Αντίθετα με τα κύτταρα του ήπατος, δεν παρατηρήθηκε το κυτταροπροστατευτικό αποτέλεσμα του UDCA σε αυτά τα καρκινικά κύτταρα (Shiraki et al., 2005a). Επίσης, προ-επώαση κυττάρων εντερικού καρκινώματος με UDCA, μειώνει τον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων που εμφανίζονται κατά την επώαση με DCA και UDCA. Αυτό επισυμβαίνει με καταστολή της DNA προσδετικής δραστηριότητας της activator protein-1, με παράλληλη αρνητική ρύθμιση της δραστηριότητας των extracellular signal regulated (ERK) και Raf-1 κινασών και καταστολή της επαγόμενης ενεργοποίησης του epidermal growth factor receptor (EGFR). Οπότε, η ανασταλτική επίδραση του UDCA στην DCA-επαγόμενη απόπτωση επισυμβαίνει μερικώς με τη ρύθμιση του EGFR/Raf-1/ERK σηματοδοτικού μονοπατιού (Im and Martinez, 2004).

Συνοψίζοντας, θα αναφερθούμε στα σχόλια των Guicciardi ME και Gores GJ (Guicciardi and Gores, 2002), τονίζοντας ότι η κυτταροτοξικότητα των χολικών οξέων δεν συσχετίζεται πάντα με την υδροφοβικότητά τους (Patel T, Spivey JR, Vadakekalam J, Gores GJ. *Apoptosis-an alternative mechanism of bile salt hepatotoxicity. In: Paumgartner G, Beuers U, eds. Bile Acids in Liver Diseases. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 1995;88-95*). Η συγκέντρωση των χολικών οξέων στον ορό κατά την χολόσταση (<300μmol/L) είναι αρκετά χαμηλότερη της κριτικής συγκέντρωσής τους στα μικύλλια (1 mmol/L). Παράλληλα, το ήπαρ προσαρμόζεται στη χολόσταση, προσπαθώντας να διατηρεί χαμηλές ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις χολικών οξέων, είτε με μεμβρανικούς μεταφορείς είτε με ενίσχυση της νεφρικής τους έκκρισης (Gartung et al., 1996; Lee et al., 2000). Οπότε το ερώτημα είναι πώς καθίστανται τοξικά. Σε συγκέντρωση μόνο 25μmol/L επάγουν ηπατοκυτταρική απόπτωση (Patel et al., 1994). Το ενδοκυττάριο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από ποικιλία διαφορετικών διεγερτών, οδηγεί σε ενεργοποίηση προαποπτωτικών σημάτων. Τα χολικά οξέα επάγουν κυτταρικό θάνατο, μέσω μονοπατιών ανεξάρτητων από εξωτερικό συνδέτη, ειδικά όσον αφορά τον Fas (Faubion et al., 1999; Yerushalmi et al., 2001). Η απόπτωση δε μπορεί να ανασταλλεί, μπλοκάροντας μόνο προαποπτωτικά μονοπάτια, αλλά ενισχύοντας και σήματα επιβίωσης που αναμειγνύονται στην αναστολή της απόπτωσης. Σε αυτά τα μονοπάτια συμμετέχουν, κυρίως, η cyclic

adenosine monophosphate (cAMP), η Akt, ο nuclear factor κB (NF-κB), η mitogen-activated protein kinase (MAPK) και η phosphatidyl inositol 3-kinase-mediated kinase (Herr and Debatin, 2001; Webster and Anwer, 1998). Η κυτταροπροστατευτική δράση του UDCA φάνηκε να ασκείται μέσω παρεμβολής σε κλασικά μονοπάτια επιβίωσης (Rodrigues et al., 1998a; Rodrigues and Steer, 2000). Επίσης, τα περισσότερα χολικά οξέα, συμπεριλαμβανομένου και του UDCA, είναι δυναμικοί παράγοντες ενδοκυττάριας σηματοδότησης και ρυθμίζουν το ενδοκυττάριο ασβέστιο ((Beuers et al., 1998), ενεργοποιούν μεμβρανικούς υποδοχείς (Qiao et al., 2001) και προσδέονται σε πρωτεΐνες, οδηγώντας σε δομικές μεταβολές. Τα χολικά οξέα φαίνεται να παρεμποδίζουν την έμφυτη κυτταροτοξική τους δράση, μέσω επίδρασής τους με πυρηνικούς υποδοχείς, ενεργοποιώντας παράλληλα γονιδιακή μεταγραφή σημάτων επιβίωσης (Chawla et al., 2001; Rust et al., 2000; Takikawa et al., 2001). Η ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού από το UDCA φαίνεται να γίνεται μέσω ενεργοποίησης του epidermal growth factor receptor (EGFR) (Qiao et al., 2002). Το UDCA/EGFR/MAPK μονοπάτι, φαίνεται να αποτελεί ένα μονοπάτι επιβίωσης που ενεργοποιείται από το UDCA, ενώ η MAPK αναστολή οδήγησε στην τοξική δράση του UDCA (Σχήμα 23). Τα χολικά οξέα σε περίσσεια, φαίνεται να διεγείρουν την επαγωγή απόπτωση, μέσω υποδοχέων κυτταρικού θανάτου, ενεργοποιώντας τις κασπάσες -8 και -10 (Kischkel et al., 2001). Το UDCA φαίνεται ότι, όπως τα περισσότερα υδρόφοβα και κυτταροτοξικά χολικά οξέα, ενεργοποιεί μερικώς προαποπτωτικά μονοπάτια, αλλά και το MAPK μονοπάτι επιβίωσης. Λαμβάνοντας το μήνυμα ότι τα χολικά οξέα φαίνεται να «χορεύουν» με μονοπάτια τόσο επιβίωσης όσο και κυτταρικού θανάτου, αλλά και ότι κάθε χολικό οξύ πρέπει να αντιμετωπίζεται μεμονωμένα, με τις ιδιαίτερες σηματοδοτικές του συνέπειες κάθε φορά, στην παρούσα μελετήθηκαν τα αποπτωτικά μονοπάτια του UDCA σε κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, με βασικό στόχο τον προσδιορισμό του ρόλου των κασπασών.



Σχήμα 23. Τα χολικά οξέα ενεργοποιούν τόσο μονοπάτια επιβίωσης, όσο και κυτταρικού θανάτου. Τα τοξικά χολικά οξέα επάγουν απόπτωση, ενεργοποιώντας το εξωκυττάρια-ενεργοποιούμενο αποπτωτικό μονοπάτι, ενώ επάγουν ασθενώς και την ενεργοποίηση μονοπατιών επιβίωσης. Το UDCA ενεργοποιεί το EGFR/MAPK μονοπάτι επιβίωσης, μέσω του οποίου αποφεύγεται η μιτοχondριακή δυσλειτουργία και η απόπτωση, ενώ επάγει ασθενώς και προαποπτωτικό μονοπάτι, το οποίο θα υπερισχύσει σε περίπτωση αναστολής του EGFR/MAPK μονοπατιού επιβίωσης (Guicciardi and Gores, 2002).

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) είναι η πέμπτη συχνότερη κακοήθεια παγκοσμίως και υπολογίζεται ότι προκαλεί περί το μισό εκατομμύριο θανάτους ετησίως. Το προσδόκιμο επιβίωσης εξακολουθεί να είναι δυσμενές (διάμεσος χρόνος επιβίωσης 8 μήνες), ενώ η καλύτερη διαθέσιμη θεραπεία είναι η χειρουργική αφαίρεση.

Παρ'όλα αυτά, η οκτρεοτίδη φαίνεται να είναι αποτελεσματική στην αναστολή των όγκων, σε σειρά πειραματικών μοντέλων. Ένας από τους μηχανισμούς αυτούς φαίνεται να είναι η άμεση αντιπολλαπλασιαστική δράση, μέσω αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης-μέσω υποδοχέα. Η οκτρεοτίδη έχει χρησιμοποιηθεί κλινικά για τη θεραπεία του ΗΚΚ με διαφορετικά αποτελέσματα. Παρά το ότι οι αρνητικές μελέτες έχουν σχολιαστεί εκτενώς, οι μηχανισμοί δράσης της οκτρεοτίδης δεν έχουν διαλευκανθεί επαρκώς. Η απόπτωση φαίνεται να αποτελεί θεμελιώδη μηχανισμό. Τόσο αυξημένη απόπτωση όσο και ουδεμία επίδραση επί της αποπτώσεως έχουν προηγουμένως αναφερθεί.

Παράλληλα, το UDCA αποτελεί το βασικό θεραπευτικό μέσο για την αντιμετώπιση της PBC και η εκτεταμένη χρήση του έχει πιθανώς αλλάξει τη φυσική εξέλιξη της νόσου. Είναι γνωστό ότι σε χολοστατικές καταστάσεις, τα ενδογενή χολικά οξέα συκρατούνται εντός των ηπατοκυττάρων, οδηγώντας έτσι σε προοδευτική επιδείνωση της ηπατικής λειτουργίας. Τα ευεργετικά αποτελέσματα του UDCA στους δείκτες της ηπατικής λειτουργίας έχουν αποδοθεί στις φυσικοχημικές του ιδιότητες, καθώς είναι εξαιρετικά υδρόφιλο, άρα και μη τοξικό χολικό οξύ για τις βιολογικές μεμβράνες. Φαίνεται να έχει άμεση κυτταροπροστατευτική δράση και διαφορετικοί μοριακοί μηχανισμοί φαίνεται να ευθύνονται, όπως η ρύθμιση κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών και η προστασία των ηπατοκυττάρων έναντι της απόπτωσης. In vitro δεδομένα έχουν δείξει ότι το UDCA ευνοεί την απόπτωση και ίσως μειώνει την ηπατοκαρκινογένεση επάγοντας την απόπτωση σε ήδη προβληματικά ηπατοκύτταρα και αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Πρόσφατα, αναφέρθηκε επιλεκτική επαγωγή απόπτωσης κυττάρων ΗΚΚ HepG2 και BEL7402, μέσω ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και αύξησης του λόγου Bax προς bcl-2, αν και κανένα αποτέλεσμα δεν παρατηρήθηκε σε L-02 φυσιολογικά ηπατοκύτταρα. Σε κλινική μελέτη της σχετιζόμενης με ηπατίτιδα C κίρρωσης, οι Terao και συνεργάτες (2005) πρότειναν την χορήγηση UDCA ως πιθανό θεραπευτικό μέσο αποφυγής εμφάνισης ΗΚΚ.

Καθώς η αυξημένη απόπτωση αποτελεί θεραπευτικό μηχανισμό έναντι των κακοήθων κυττάρων, μελετήσαμε την απόπτωση των HepG2 κυττάρων ΗΚΚ (προερχόμενα από ανθρώπινο ηπατοβλάστωμα) μετά από επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων οκτρεοτίδης και UDCA στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση και στην ενεργοποίηση των κασπασών, σε HepG2 κύτταρα ΗΚΚ. Το μοντέλο της TNF-alpha επαγόμενης απόπτωσης επιλέχθηκε για να συγκριθεί με την επίδραση της οκτρεοτίδης και του UDCA στη βιολογική συμπεριφορά των κασπασών, μετά από τη χορήγησή τους σε HepG2 κύτταρα ΗΚΚ.

2.2 Υλικά

Η **οκτρεοτίδη** ήταν από την Novartis (Basel, Switzerland) και χρησιμοποιήθηκε σε δοσολογία από 10^{-10} M έως 10^{-7} M, με σκοπό τον προσδιορισμό της ιδανικής ανασταλτικής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού συγκέντρωσης.

Το **UDCA** (Calbiochem, CA, USA) χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις από 1μM έως 500 μM, για την καλύτερη μελέτη της επίδρασής του στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι συγκεντρώσεις του UDCA που χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω ήταν τα 50μM, 100μM και 500μM.

Ο **ανθρώπιος ανασυνδυασμένος TNF-alpha** (specific activity 6×10^7 U/mg), (R&D Systems, Minneapolis, USA) διαλύοταν σε στείρο PBS + 0.1% (w/v) bovine serum albumin (BSA, low endotoxin) (Sigma) και αποθηκευόταν σε aliquots στους -70° C. Οι επωάσεις με TNF-alpha (R&D Systems, Minneapolis, USA) έγιναν αρχικά σε συγκεντρώσεις από 0,1ng/ml έως 100ng/ml (0,1-1-10-20-100ng/ml). Με βάση τις καμπύλες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ως κατάλληλες συγκεντρώσεις για περαιτέρω πειράματα επιλέχθηκαν η συγκέντρωση 10^{-8} M για την οκτρεοτίδη και τα 20ng/ml για τον TNF-alpha (Fang et al., 2001).

Για την διερεύνηση της επίδρασης ενός μεταφραστικού αναστολέα, έγιναν προ-επωάσεις με κυκλοεξιμίδη (**CHX**, 20μg/ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) μία ώρα πριν από τις υπόλοιπες επωάσεις (Kolios et al., 1995).

Για τη μελέτη αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκε η Sulforhodamine B (Biotium Inc., Hayward, CA, USA)

Για τη μελέτη επαγωγής απόπτωσης μετρήθηκε το αποπτωτικό κατακερματισμένο DNA (αποπτωτικά νουκλεοσώματα), με το Cell Death Detection Elisa Plus kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), μία “sandwich” χρωματομετρική ELISA ενός βήματος.

Με σκοπό τη μελέτη επαγωγής απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε, παράλληλα, κυτταρομετρία ροής, εφαρμόζοντας το Annexin-V Apoptosis Detection Kit (BioVision, Mountain View, CA, USA), τροποποιημένο.

Μετρήθηκε η δραστικότητα των κασπασών-3, -9, -8 και -2. Για τις μετρήσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν χρωματομετρικά kits μέτρησης της δραστικότητάς τους (colorimetric assay kits, Chemicon, Temecula, CA, USA).

Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά Bradford

Για την ποσοτική μέτρηση πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα προς ανάλυση της δραστικότητας των κασπασών, χρησιμοποιήθηκε η Bio-Rad Protein microassay, όπου γνωστές συγκεντρώσεις bovine serum albumin (BSA) (Sigma) διαλυόμενες σε phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης.

Υλικά και συσκευές

Αλβουμίνη ορού βοός (BSA)

Διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250: Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad Life Technologies, USA)

Μικροπλάκες ELISA επίπεδου πυθμένα

Φωτόμετρο ELISA (Anthos Reader 2001)

Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα (διαφέρει ανάλογα με το πείραμα)

Διάλυμα αλβουμίνης βοός (200μg/ml)

Όλα τα πλαστικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τις κυτταροκαλλιέργειες αγοράστηκαν από την Nunc.

Τα **HepG2** κύτταρα προέρχονται από μία καλά διαφοροποιημένη κυτταρική σειρά ανθρώπινου ηπατοβλαστώματος και αγοράστηκαν από την European Collection of Cell Cultures (ECACC, Porton Down, UK).

2.3 Μεθοδολογία

2.3.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Τα HepG2 κύτταρα διατηρούνται σε συνεχείς καλλιέργειες, σε RPMI εμπλουτισμένο με 10% FBS (Gibco, Paisley, UK), στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Η αλλαγή του θρεπτικού υλικού γινόταν κάθε 3 ημέρες.

Για την ανακαλλιέργεια κυττάρων σε πλήρη ανάπτυξη μονής στιβάδας (confluent monolayers), γινόταν αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και πλύση 3 φορές με PBS (χωρίς Ca²⁺ και Mg²⁺). Εν συνεχεία τα κύτταρα πλένονταν (1X) με 3ml Trypsin-EDTA μείγμα από 0.05% (w/v) Trypsin και 0.02% (w/v) EDTA. Το περίσσειο διάλυμα αφαιρούταν και τα κύτταρα επωάζονταν για περίπου 5 λεπτά στους 37°C, μέχρι τα κύτταρα να αποκολληθούν από τη φλάσκα. Η δράση του μείγματος trypsin/EDTA αναστελλόταν με την προσθήκη 10ml από πλήρες RPMI medium και το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρούνταν στα 200g για 5 λεπτά. Στη συνέχεια γινόταν ανασύσταση στην κυτταρική πελλέτα με πλήρες θρεπτικό υλικό, ενώ παράλληλα ελεγχόταν ο αριθμός και η βιωσιμότητα των κυττάρων με Neubauer haemocytometer, κατόπιν προσθήκης Trypan Blue (Sigma). Τα νεκρά κύτταρα βάφονταν μπλε, λόγω της πρόσληψης του Trypan Blue. Η κυτταρική βιωσιμότητα ήταν πάντοτε μεγαλύτερη του 95%. Ύστερα από μέτρηση των κυττάρων, τα τελευταία στρώνονταν με πυκνότητα 2x10⁴/ml RPMI εμπλουτισμένου με 10% FBS, σε 80 cm² tissue culture flasks για περαιτέρω διατήρηση της κυτταροκαλλιέργειας, καθώς και σε 6-well, 24-well ή 96-well plates για τα πειραματικά πρωτόκολλα. Οι flasks και οι 6-well plates έφταναν σε confluency σε περίπου 6 ημέρες.

Για την αποθήκευση, γινόταν ανασύσταση 4x10⁶ κυττάρων/ml παγωμένου θρεπτικού. Το τελευταίο περιείχε 10% dimethylsulphoxide (DMSO) (Sigma), 40% FCS, και 50% RPMI medium. Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφερόταν σε cryotubes (Nunc), 1 ml / tube, και πάγωνε σταδιακά σε vapour phase υγρού αζώτου overnight και τα tubes αποθηκεύονταν σε φιάλες υγρού αζώτου. Για την αναβίωση των κυττάρων από το υγρό άζωτο με σκοπό τη επαναχρησιμοποίησή τους, κύτταρα ξεπάγωναν ταχέως στους 37⁰ C σε water bath, πλένονταν με RPMI medium, γινόταν ανασύστασή τους σε πλήρες medium και κύτταρα

από 1 cryotube στρώνονταν σε 80 cm² tissue culture flasks σε RPMI εμπλουτισμένο με 10% FBS, συνεχίζοντας ως ανωτέρω.

Για τα πειράματα, επωάζονταν κύτταρα σε πλάκες των 24-well, σε πυκνότητα 2×10^4 /cm². Ένα 24ωρο προ των επώασεων, τα κύτταρα επωάζονταν σε θρεπτικό χωρίς FBS. Οι ακόλουθες επώσεις γίνονταν στους 37°C, σε συνθήκες CO₂ 5%. Κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέγονταν για την μέτρηση της δραστηριότητας των κασπασών. Το control των πειραμάτων αποτελούσε φρέσκο θρεπτικό υλικό με 10% FBS, με ίδιες χρονικές περιόδους επώασης και συνθήκες συλλογής εκχυλίσματος.

2.3.2 Μελέτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Για την μέτρηση της αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος της σουλφοροδαμίνης Β (Sulforhodamine B colorimetric assay ή SRB assay), όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί (Rubinstein et al., 1990; Skehan et al., 1990). Μετά από τοποθέτηση HepG2 κυττάρων σε πλάκες με 96 θέσεις (96-well plates), σε αρχική πυκνότητα 5×10^3 κυττάρων και σε 200μl θρεπτικό ανά well, ακολουθούσαν επώσεις, 24 ώρες αργότερα, για να έχει γίνει επαρκής προσκόλληση των κυττάρων στον πυθμένα των βοθρίων (wells). Τα κύτταρα καλλιεργούνταν για διάστημα 6 ημερών, ώστε να έχουν ολοκληρωθεί 2-3 κυτταρικοί κύκλοι, με μία αλλαγή την 3^η ημέρα επώασης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στο αυθεντικό πρωτόκολλο.

Συνοπτικά, 50μl από TCA 50% τοποθετούνταν σε 200μl θρεπτικό και οι πλάκες αποθηκεύονταν στους 4°C για 30 λεπτά. Μετά από 5 φορές πλύσιμο με απιονισμένο νερό, οι πλάκες παρέμεναν για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσουν. Εν συνεχεία, ακολουθούσε σε κάθε well προσθήκη 70μl από 0,4% Sulforhodamine B (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) σε 1% acetic acid, και αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Ακολουθούσε πλύσιμο (5 φορές) με 1% acetic acid και νέο στέγνωμα. Στο τέλος της διαδικασίας, γινόταν προσθήκη 200μl unbuffered Tris-base solution (PH: 10.5) σε κάθε well και οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν στα 490nm αφαιρώντας το background στα 620nm. Η μέση οπτική πυκνότητα οκτώ διαφορετικών control θεωρήθηκε ως 100% και όλες οι υπόλοιπες μετρήσεις εκφράστηκαν ως ποσοστό (%) επί των control.

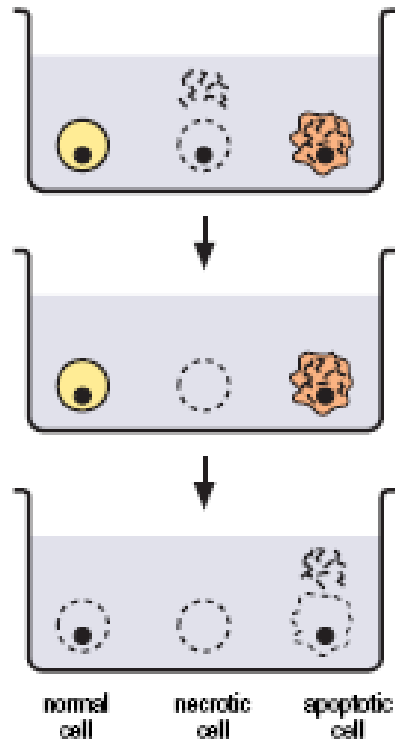
2.3.3 Ανίχνευση απόπτωσης

2.3.3.1 DNA κατάτμηση (fragmentation)

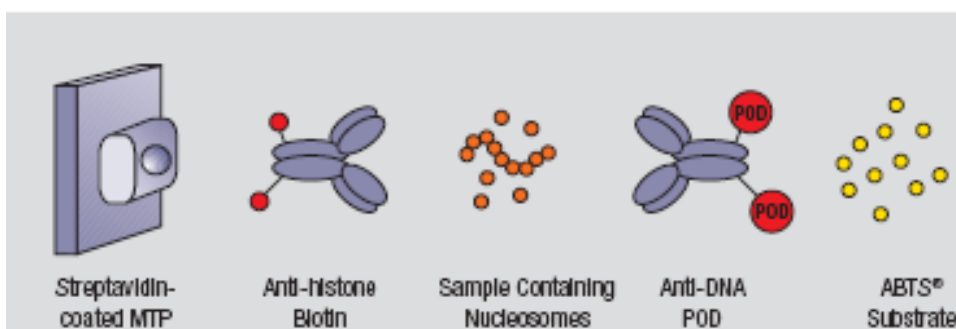
Για την ανίχνευση απόπτωσης, χρησιμοποιήθηκε μία “sandwich” χρωματομετρική ELISA ενός βήματος, το Cell Death Detection Elisa Plus kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Η συγκεκριμένη μέθοδος ανιχνεύει νουκλεοσώματα (δηλαδή θραύσματα του πυρηνικού DNA που δεν έχουν υδρολυθεί από τις ενδονουκλεάσες), μετά την πρόκληση απόπτωσης (μονο- και ολιγονουκλεοσώματα).

Συνοπτικά, μετά από επαγωγή απόπτωσης και 24ωρη επώαση στους 37°C, τα κύτταρα φυγοκεντρώνταν (200g, 10min) και επαναδιαλύονταν σε lysis buffer. Είχε προηγηθεί αφαίρεση του υπερκειμένου, που περιείχε DNA από νεκρά κύτταρα, το οποίο διαπέρασε την μεμβράνη κατά την επώαση. Μετά από 30 λεπτά επώασης με το lysis buffer σε θερμοκρασία δωματίου, οι άθικτοι πυρήνες απομακρύνονταν με δεύτερη φυγοκέντρηση (200g, 10min) (αποτελώντας το ίζημα) (Εικόνα 1).

Τα υπερκείμενα μεταφέρονταν σε πλάκες με μικρά βοθρία, στον πυθμένα των οποίων υπήρχε προσδεδεμένη streptavidin και επωάζονταν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, με δύο μονοκλωνικά αντισώματα: αντίσωμα αντι-ιστόνης (σημασμένο με biotin) και αντίσωμα αντι-DNA (προσδεδεμένο με peroxidase). Το αντίσωμα των ιστονών φέρει και βιοτίνη και έτσι παγιδεύει το νουκλεόσωμα στα wells της πλάκας που έχουν εμπεδωμένη στρεπταβιδίνη. Το αντίσωμα του DNA μένει προσδεδεμένο στο νουκλεόσωμα και φέρει peroxidase που καταλύει την χρωμογόνο αντίδραση και δίνει φως μήκους κύματος 405nm (διόρθωση: 490nm) (Εικόνα 2). Η μέση οπτική πυκνότητα οκτώ διαφορετικών control θεωρήθηκε ως 100% και όλες οι υπόλοιπες μετρήσεις εκφράστηκαν ως ποσοστό (%) επί των control.



Εικόνα 1. Μετά από επώαση των κυττάρων με κάποιον αποπτωτικό παράγοντα και φυγοκέντρηση, στο υπερκείμενο θα υπάρχει DNA μόνο νεκρών κυττάρων (διαφυγή εκ της διασπασμένης μεμβράνης). Αν το υπερκείμενο αυτό αφαιρεθεί και επιδράσει περαιτέρω κάποιος λυτικός παράγοντας, τότε το μετρούμενο γενετικό υλικό θα αντιστοιχεί σε αυτό των αποπτωτικών κυττάρων, τα οποία δεν είχαν υποστεί λύση προηγουμένως.



Εικόνα 2. Τα αποπτωτικά νουκλεοσώματα που περιέχονται σε ένα δείγμα συγκρατώνται από δύο μονοκλωνικά αντισώματα: αντι-ιστόνης (σημασμένο με biotin) και αντι-DNA (προσδεδεμένο με peroxidase, που καταλύει την χρωμογόνο αντίδραση). Το αντίσωμα των ιστονών φέρει και βιοτίνη και έτσι παγιδεύει το νουκλεόσωμα στα βοθρία της πλάκας που έχουν εμπεδωμένη στρεπταβιδίνη. (MTP: microtiter plate, POD:peroxidase)

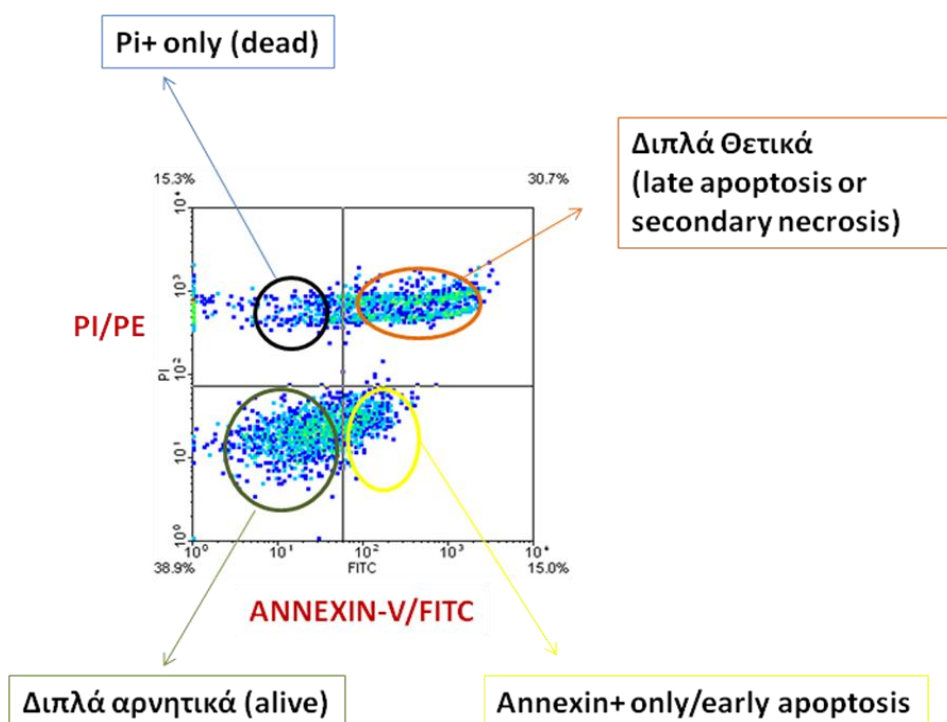
2.3.3.2 Κυτταρομετρία ροής (διπλή χρώση Annexin-V/PI)

Για την εκτίμηση της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε επιπλέον το Annexin-V Apoptosis Detection Kit (BioVision, Mountain View, CA, USA), τροποποιημένο. Στα αποπτωτικά κύτταρα, η Annexin-V προσδένεται με Ca^{2+} -εξαρτώμενο τρόπο στο αρνητικά φορτισμένο φωσφολιπίδιο φωσφατιδυλοσερίνη (PS), που μετακινείται στην εξωκυττάρια πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης από τα αρχικά στάδια της απόπτωσης. Επιπλέον, τα αποπτωτικά κύτταρα είναι συρρικνωμένα και κυτταρομετρικά εμφανίζονται με αυξημένο πλάγιο σκεδασμό (side scatter/SS) και μειωμένο πρόσθιο σκεδασμό (forward scatter/FS). Τα κύτταρα που προσδέουν Annexin-V σημασμένα με το φθοριόχρωμα FITC εμφανίζονται πράσινα (πρώιμα αποπτωτικά), ενώ τα κύτταρα που έχουν χάσει την μεμβρανική τους ακεραιότητα εμφανίζονται ταυτόχρονα κόκκινα (λόγω πρόσδεσης στον πυρήνα) και πράσινα (λόγω πρόσδεσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη) και αντιπροσωπεύουν κύτταρα όψιμα αποπτωτικά ή νεκρά (Εικόνα 3).

Με τη διπλή χρώση Annexin-V/PI, τα νεκρά κύτταρα αναμένεται να ανιχνευθούν είτε ως διπλά θετικά κύτταρα μεγάλων διαστάσεων, καθώς χάνουν γρήγορα την ακεραιότητα της κυτταρικής τους μεμβράνης και ακολουθεί κυτταρική διάγκωση προτού επέλθει η καταστροφή τους, είτε ως συγκρίματα μεμβρανών πολύ χαμηλού πρόσθιου σκεδασμού (forward scatter/FS) και πλάγιου σκεδασμού (side scatter/SS). Τα συγκρίματα αυτά μπορεί να είναι μόνο PI θετικά ή διπλά θετικά, ανιχνεύσιμα όμως στο σημείων των σκεδασμών όπου αναμένονται κυτταρικά συγκρίματα, περιοχή η οποία αποκλείεται από τη στρατηγική της μεθόδου (Εικόνα 4). Παράλληλα, παρατηρήσαμε ότι όλα τα διπλά θετικά κύτταρα που ανιχνεύονταν, αντιστοιχούσαν σε κύτταρα μικρών διαστάσεων (και όχι σε κύτταρα μεγάλων σχετικά διαστάσεων, όπως θα αναμένονταν τα νεκρά κύτταρα), ενώ διατηρούσαν την ακεραιότητά τους (δεν αντιστοιχούσαν στην περιοχή των συγκριμάτων). Γι'αυτό και τα ανιχνεύσιμα διπλά θετικά κύτταρα, θεωρήσαμε ότι είναι πιθανότερο να αντιστοιχούν σε κύτταρα που ακολούθησαν την αποπτωτική διαδικασία (όψιμα αποπτωτικά), παρά τη διαδικασία της νέκρωσης.

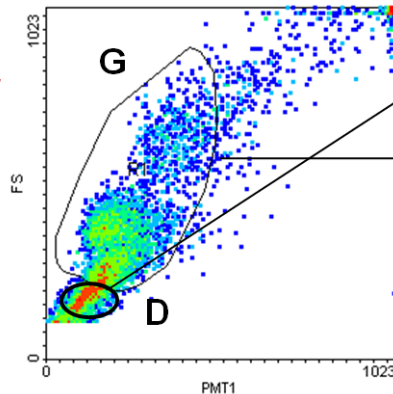
Μετά από 24ωρη επώαση σε πλάκες 24 βοθρίων, τα προσκολλημένα HepG2 κύτταρα επεξεργάζονταν με θρυψίνη (ομαλή ανάδευση) και ακολουθούσε πλύσιμο με θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με FBS. Εν συνεχεία, $1-5 \times 10^5$ κύτταρα συλλέγονταν με

φυγοκέντρωση (98g, 5 λεπτά) και επαναδιαλύονταν σε 300μl από 1X Binding Buffer. Μετά από ομαλό πιπετάρισμα για την επαναδιάλυση του ιζήματος, ακολουθούσε προσθήκη 3μl Annexin-V-FITC και 3 μl propidium iodide (PI 50μg/ml,) και 5-λεπτη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι. Η κυτταρομετρική ανίχνευση της Annexin-V-FITC και του PI-phycoerythrin έγινε σε κυτταρόμετρο (Epics Elite). Κυτταρικά θραύσματα και μεμβρανικά συγκρίμματα αποκλείονταν από την ανάλυση μέσω κατάλληλου gating (ως προς πρόσθιο και πλάγιο σκεδασμό) (Εικόνα 4). Τουλάχιστον 10000 μετρικά γεγονότα μετρήθηκαν για κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



Εικόνα 3. Κάτω δεξιό τεταρτημόριο: περικλείει τα θετικά μόνο σε Annexin-V κύτταρα (Annexin+ only), που είναι πρώιμα αποπτωτικά. Πάνω δεξιό τεταρτημόριο: περικλείει τα διπλά θετικά κύτταρα, σε Annexin-V και σε PI, που αντιπροσωπεύουν κύτταρα όψιμα αποπτωτικά ή δευτερογενώς νεκρά. Πάνω αριστερό τεταρτημόριο: περικλείει τα θετικά μόνο σε PI κύτταρα (PI+ only), που αντιπροσωπεύουν τα νεκρά κύτταρα. Κάτω αριστερό τεταρτημόριο: περικλείει τα διπλά αρνητικά κύτταρα, που αντιπροσωπεύουν τον κυρίαρχο ζώντα πληθυσμό.

Forward Scatter/
δείχνει πρόσθιο σκεδασμό/
μέγεθος

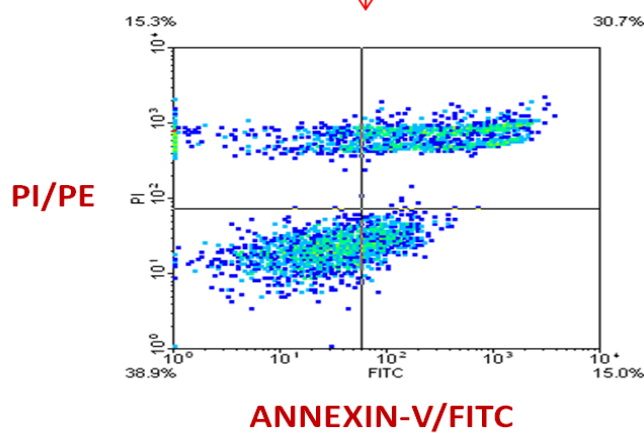


Gate D : Αποκλείονται ως debris (νεκρά, σπασμένες μεμβράνες, μη ειδική πρόσδεση της Annexin-V εσωτερικά της μεμβράνης)

Gate G: Περιλαμβάνονται κύτταρα με σχετικές διαστάσεις για μεγαλύτερη αξιοπιστία

Side Scatter/
δείχνει πλάγιο σκεδασμό/
σύσταση

Μόνο τα κύτταρα
του Gate G



Εικόνα 4. Μόνο events (κύτταρα) με αξιολογήσιμες διαστάσεις ως προς τον πρόσθιο και πλάγιο σκεδασμό τους, εξετάστηκαν μετά από κάθε επίδραση, ως προς την θετικότητά τους σε Annexin-V και/ή PI.

2.3.4 Δραστικότητα κασπασών

Μετρήθηκε η δραστικότητα των κασπασών-3, -9, -8 και -2. Για τις μετρήσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν χρωματομετρικά kits μέτρησης της δραστικότητάς τους (Chemicon, Temecula, CA, USA). Οι συγκεκριμένες μέθοδοι βασίζονται στην φασματοφωτομετρική ανίχνευση της χρωμοφόρου *p*-nitroaniline (*p*NA), μετά από διάσπαση των αντίστοιχων σημασμένων υποστρωμάτων: DEVD-*p*NA (κασπάση-3), LEHD-*p*NA (κασπάση-9), IETD-*p*NA (κασπάση-8) και VDVAD-*p*NA (κασπάση-2). Συνοπτικά, μετά από 24ωρη επώαση με τις ανάλογες ουσίες, αφαιρούνταν τα υπερκείμενα και ακολουθούσε προσθήκη 250μl παγωμένου lysis buffer. Μετά από 10-λεπτη επώαση σε πάγο, συλλέγονταν τα κυτταρικά εκχυλίσματα και φυγοκεντρούνταν (5 λεπτά, 10000g). Τα υπερκείμενα (κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα) μεταφέρονταν σε νέα σωληνάρια και τοποθετούνταν στον πάγο. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε με την BIORAD Protein assay (BIORAD, Munchen, Germany) (Compton and Jones, 1985). Τα δείγματα επωάζονταν για 2-3 ώρες στους 37°C και η μέτρηση της δραστικότητας των κασπασών γινόταν στα 405 nm. Η απορρόφηση του *p*NA κάθε εξεταζόμενου δείγματος συγκρίθηκε με αυτή των controls και οι τιμές εκφράστηκαν ως micromoles *p*NA ανά μικρογραμμάριο κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης (μM/μg). Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν 8 διαφορετικά πειράματα.

Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά Bradford

Η Bio-Rad Protein microassay βασίζεται στην Bradford dye-binding διαδικασία (Bradford, 1976). Με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται προσδιορισμός κυτταρικών πρωτεϊνών (ολικών, μεμβρανικών, κυτταροπλασματικών). Βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250 να υπάρχει σε δύο διαφορετικές χρωματικές μορφές, κόκκινη και μπλε. Μετά τη σύνδεσή της με τις πρωτονιομένες αμινομάδες των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας η κόκκινη μορφή μετατρέπεται σε μπλε, προκαλώντας μία μετατόπιση στο μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 nm στα 595 nm. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής έχει υψηλό συντελεστή απορρόφησης γεγονός το οποίο παρέχει μεγάλη ευαισθησία κατά τη μέτρηση της πρωτεΐνης. Η σύνδεση πραγματοποιείται πολύ γρήγορα (περίπου σε δύο λεπτά) και υπάρχει πολύ καλή σταθερότητα του χρώματος για περίπου 1 ώρα μετά την προσθήκη της χρωστικής.

Σε μία μικροπλάκα 96 βοθρίων-wells τοποθετούνται 160 μl ανά μικροκυψελίδα των γνωστών και των άγνωστων δειγμάτων (κάθε δείγμα τοποθετήθηκε εις διπλούν) και 40 μl ανά μικροκυψελίδα του διαλύματος της χρωστικής. Ακολουθεί καλή ανάδευση του μείγματος και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 595 nm και σε φωτόμετρο ELISA.

Η ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνών κάθε δείγματος γίνεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης, η οποία λαμβάνεται από την ταυτόχρονη μέτρηση δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων BSA (5-100 μg/ml). Τα αποτελέσματα με βάση την πρότυπη καμπύλη εκφράζονται σε μg/ml.

2.4 Στατιστική ανάλυση

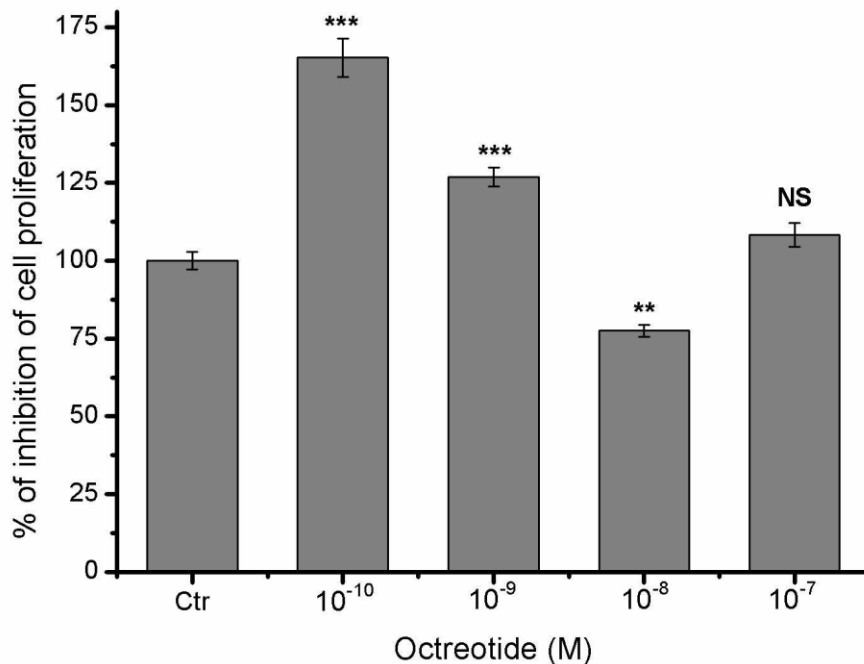
Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Microsoft Excel 2007 και InStat software (GraphPad software inc., San Diego, California, USA). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mean +/- S.E.M. Το Kolmogorov και Smirnov test χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση κατανομής Gaussian των δεδομένων. Οι στατιστικές συγκρίσεις έγιναν με one-way ANOVA test και με Tukey's post hoc συγκρίσεις. Το μη-παραμετρικό Kruskal-Wallis test χρησιμοποιήθηκε, σε περίπτωση που το Burtlett's test έδειχνε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τυπικών αποκλίσεων. Η τιμή $p < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

2.5 Αποτελέσματα

2.5.1 Μελέτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού

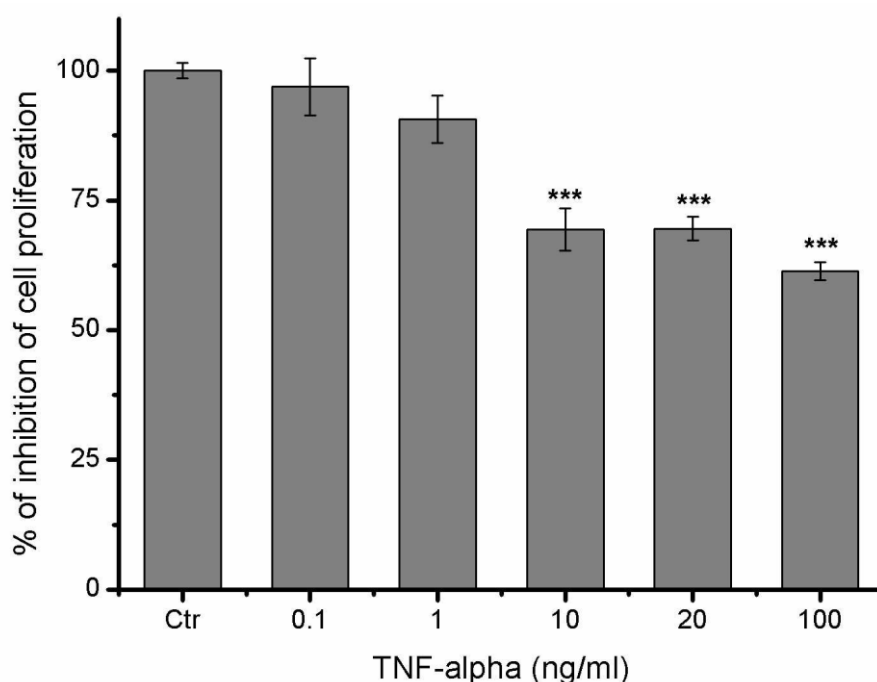
2.5.1.1 Η επίδραση της οκτρεοτίδης στον πολλαπλασιασμό των HepG2 κυττάρων

Η οκτρεοτίδη προκάλεσε μία αρχική αύξηση στον πολλαπλασιασμό των HepG2 κυττάρων ($165,2 \pm 6,2\%$ και $127 \pm 3\%$ για τις συγκεντρώσεις 10^{-10}M και 10^{-9}M , αντίστοιχα), ενώ σημαντική αναστολή παρατηρήθηκε στην συγκέντρωση 10^{-8}M (αναμενόμενη συγκέντρωση στον ορό ασθενών υπό θεραπεία), όπου είχαμε και την μεγαλύτερη αναστολή (μείωση κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο $77,5 \pm 1,9\%$ του control, Εικόνα 5). Καμία σημαντική επίδραση δεν παρατηρήθηκε στην συγκέντρωση 10^{-7}M ($108,3 \pm 3,8\%$).



Εικόνα 5. Η οκτρεοτίδη σε συγκέντρωση 10^{-8}M είχε στατιστικά σημαντική ανασταλτική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HepG2 κυττάρων, συγκριτικά με κύτταρα, χωρίς προηγηθείσα επίδραση. Χαμηλότερες συγκεντρώσεις προκάλεσαν μία αρχική αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν 8 διαφορετικά πειράματα \pm S.E.M. (NS: non significant, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Η επίδραση του TNF-alpha μελετήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων από 0,1ng/ml έως 100ng/ml. Στις χαμηλές συγκεντρώσεις των 0,1 και 1ng/ml, ο TNF-alpha δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HepG2 κυττάρων (96,9±5% και 90,6±4,5%). Σημαντική αναστολή πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις 10, 20 και 100ng/ml TNF-alpha, με αντίστοιχες μειώσεις του πολλαπλασιασμού στο 69,4±4%, 69,6±2,3% και 61,4±1,7% των controls (Εικόνα 6).

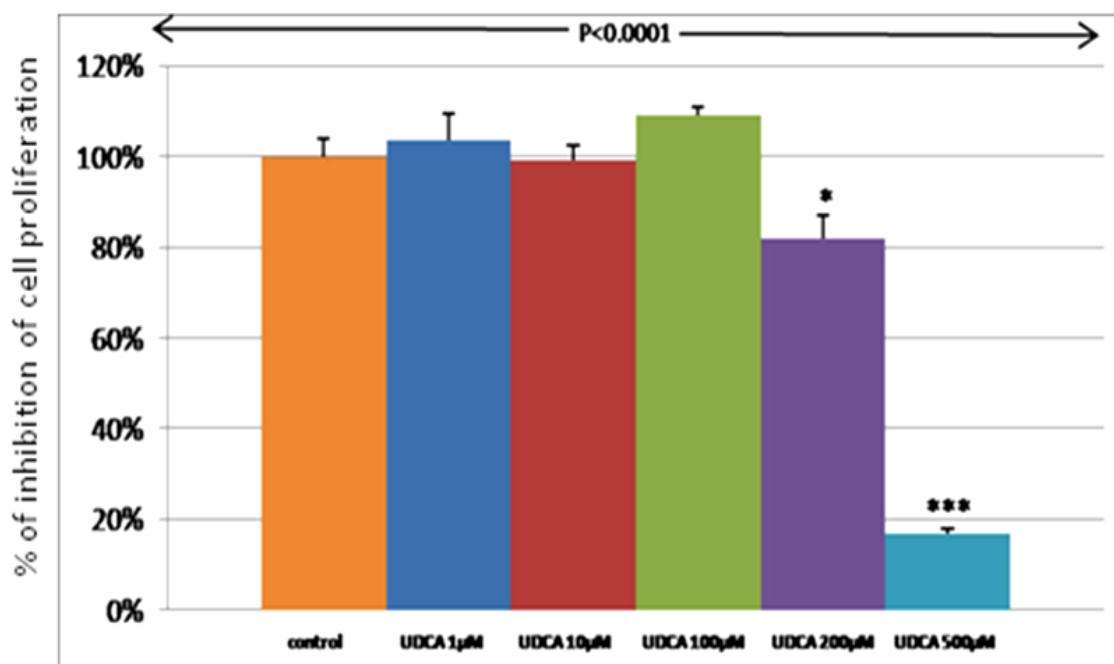


Εικόνα 6. Ο TNF-alpha σε συγκεντρώσεις 10, 20 και 100 ng/ml είχε στατιστικά σημαντική ανασταλτική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HepG2 κυττάρων, συγκριτικά με κύτταρα, χωρίς προηγηθείσα επίδραση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν 8 διαφορετικά πειράματα ± S.E.M. (*) $p < 0.001$**

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, αλλά και επειδή ο TNF-alpha είχε προηγουμένως αναφερθεί να προκαλεί τη μέγιστη αναστολή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κυττάρων ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (SMMC-7721 cells) (Fang et al., 2001), στη συγκέντρωση των 20ng/ml, για τα περαιτέρω πειράματα επιλέχθηκε η συγκεκριμένη συγκέντρωση.

2.5.1.2 Η επίδραση του UDCA στον πολλαπλασιασμό των HepG2 κυττάρων

Μετά από επώαση 6 ημερών (διάστημα αντίστοιχο με 2–3 φορές το χρόνο διπλασιασμού της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς), το UDCA στις συγκεντρώσεις 1μM, 10μM και 100μM δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική αναστολή του πολλαπλασιασμού στα HepG2 κύτταρα (103±6%, 99±3% και 109±2%, αντίστοιχα). Στατιστικά σημαντική αναστολή παρατηρήθηκε στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 200μM (82±5%) και 500μM (17±1%), πάντα συγκριτικά με κύτταρα όπου δεν έγινε καμία επίδραση (controls) (100±4%) (Εικόνα 7).



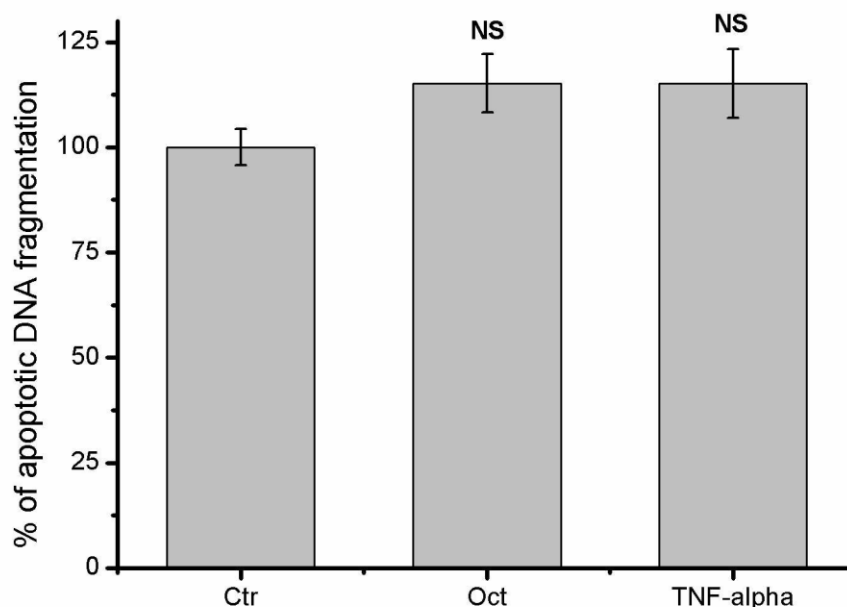
Εικόνα 7. Έγινε επίδραση με UDCA σε συγκεντρώσεις 1μM, 10μM, 100μM, 200μM και 500μM, σε HepG2 κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Στις συγκεντρώσεις των 200μM και 500μM, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 8 διαφορετικών πειραμάτων ± S.E.M. (*p<0.05, ***p<0.001)

2.5.2 Μελέτη της απόπτωσης των HepG2 κυττάρων

2.5.2.1 Ο ρόλος της οκτρεοτίδης στην απόπτωση των HepG2 κυττάρων

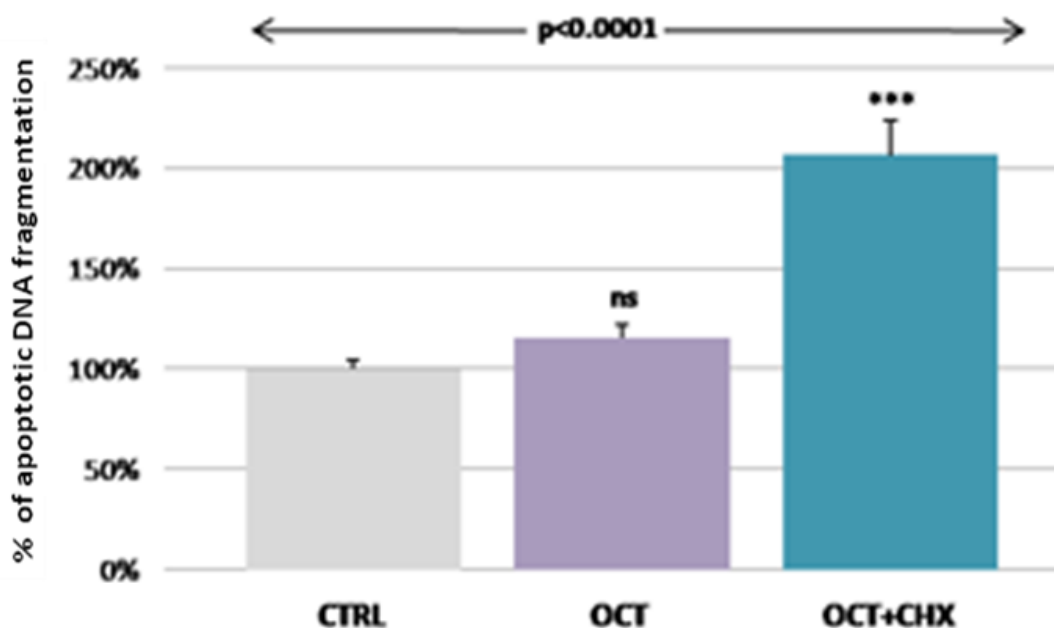
DNA κατάτμηση (fragmentation)

Η απόπτωση ανιχνεύθηκε μέσω ποσοτικού προσδιορισμού των συνδεδεμένων με ιστόνη DNA θραυσμάτων (μονο- και ολιγονουκλεοσώματα) έξω από το κυτταρόπλασμα των αποπτωτικών κυττάρων. Τόσο η οκτρεοτίδη όσο και ο TNF-alpha προκάλεσαν μη στατιστικά σημαντική ανίχνευση αποπτωτικών DNA θραυσμάτων, μετά από 24ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με κάθε ουσία χωριστά ($115,2\pm 6,95\%$ and $115,2\pm 8,17\%$, αντίστοιχα) (Εικόνα 8).

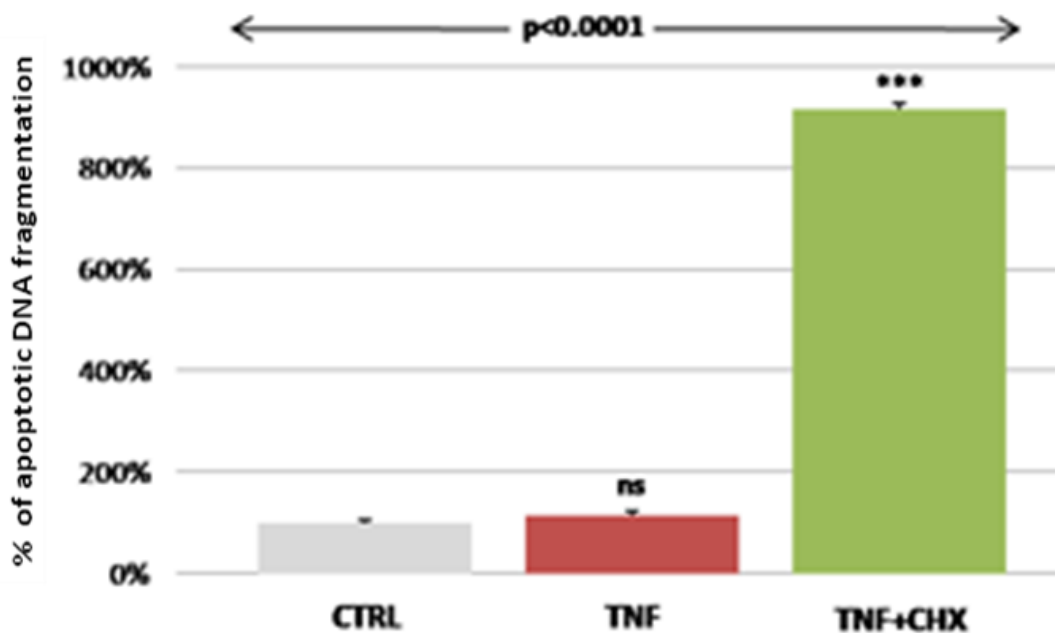


Εικόνα 8. Η 24-ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με οκτρεοτίδη ή TNF-alpha, οδήγησε σε μη στατιστικά σημαντική αύξηση των ανιχνευόμενων αποπτωτικών DNA θραυσμάτων (n=8). (NS: non significant)

Όταν τα κύτταρα επώστηκαν με τον μεταφραστικό αναστολέα, την κυκλοεξιμίδη (CHX), και με οκτρεοτίδη ή TNF- α , παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των ανιχνευόμενων αποπτωτικών DNA θραυσμάτων ($206,3 \pm 17,43\%$ και $914 \pm 14,5\%$, αντίστοιχα) ($p < 0.001$) (Εικόνα 9 και 10).



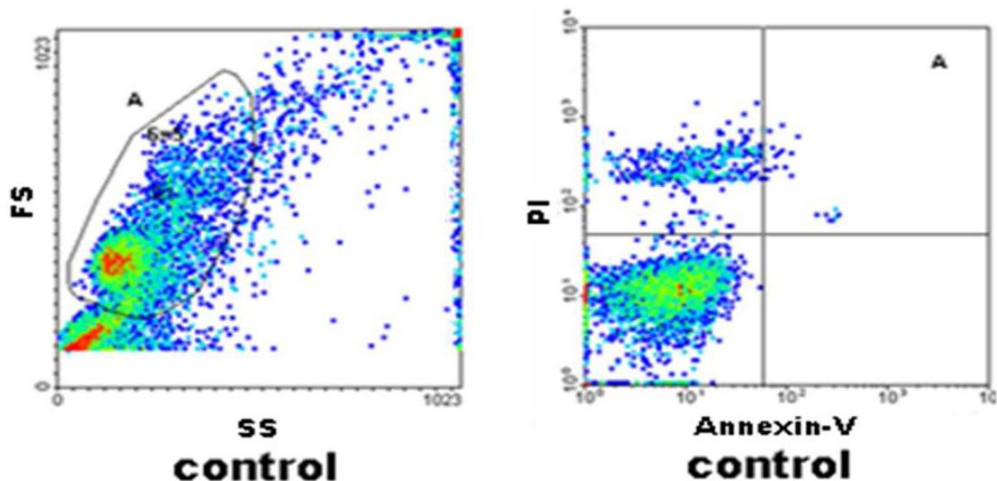
Εικόνα 9. Η 24-ωρη επώση HepG2 κυττάρων με οκτρεοτίδη οδήγησε σε μη στατιστικά σημαντική αύξηση των ανιχνευόμενων αποπτωτικών DNA θραυσμάτων, ενώ η ταυτόχρονη επίδραση με 20 μ g/ml CHX, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση αυτών (n=8). (NS: non significant, *** $p < 0.001$)



Εικόνα 10. Η 24-ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με TNF-alpha οδήγησε σε μη στατιστικά σημαντική αύξηση των ανιχνευόμενων αποπτωτικών DNA θραυσμάτων, ενώ η ταυτόχρονη επίδραση με 20μg/ml CHX, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση αυτών (n=8). (NS: non significant, ***p<0.001)

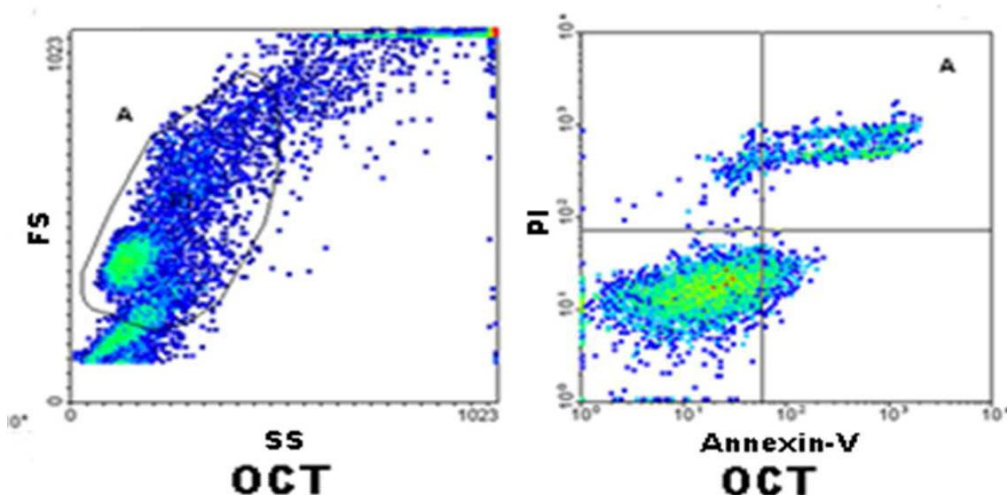
Κυτταρομετρία ροής (διπλή χρώση Annexin-V/PI)

Όλες οι συγκρίσεις έγιναν με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από επεξεργασία HepG2 κυττάρων χωρίς επίδραση, με το ίδιο προπαρασκευαστικό και κυτταρομετρικό πρωτόκολλο (0,5±0,3% και 2±0,3% για την πρόιμη και την όψιμα απόπτωση, αντίστοιχα) (Εικόνα 11).



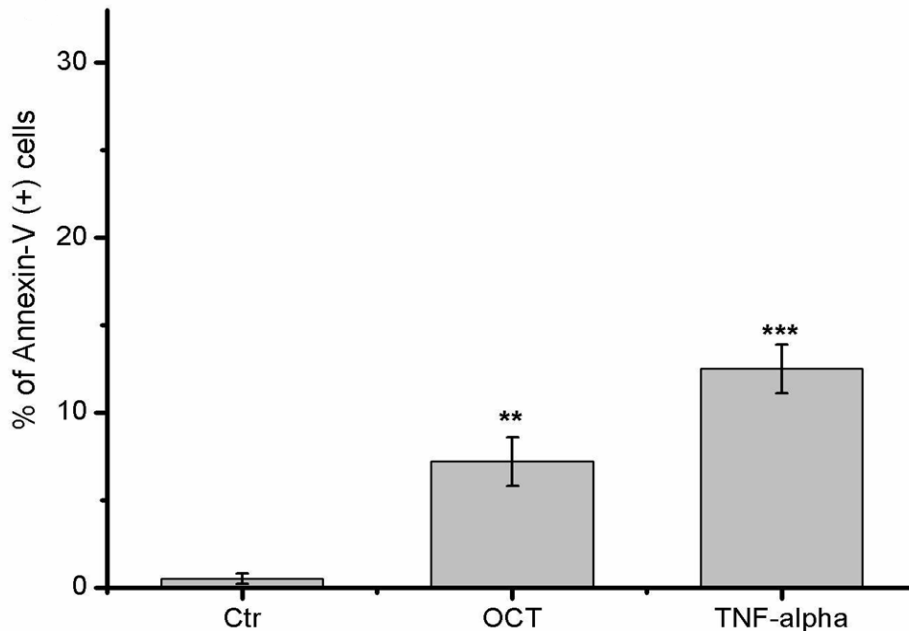
Εικόνα 11. Η επεξεργασία HepG2 κυττάρων χωρίς επίδραση οδήγησε στην ανίχνευση πολύ χαμηλού ποσοστού πρώιμων (μόνο Annexin-V θετικά, δεξιό κάτω τεταρτημόριο) και όψιμων αποπτωτικών κυττάρων (Annexin-V και PI θετικά, δεξιό άνω τεταρτημόριο). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών χρησιμοποιήθηκαν ως control για όλες τις επακόλουθες μετρήσεις και συγκρίσεις.

Η οκτρεοτίδη προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση στα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα ($7,2 \pm 1,4\%$, $p < 0.01$, μόνο Annexin-V θετικά) και πολύ περισσότερο στα όψιμα αποπτωτικά ($15,3 \pm 2,7\%$ $p < 0.001$, Annexin-V/PI διπλά θετικά) (Εικόνα 12 και 13).



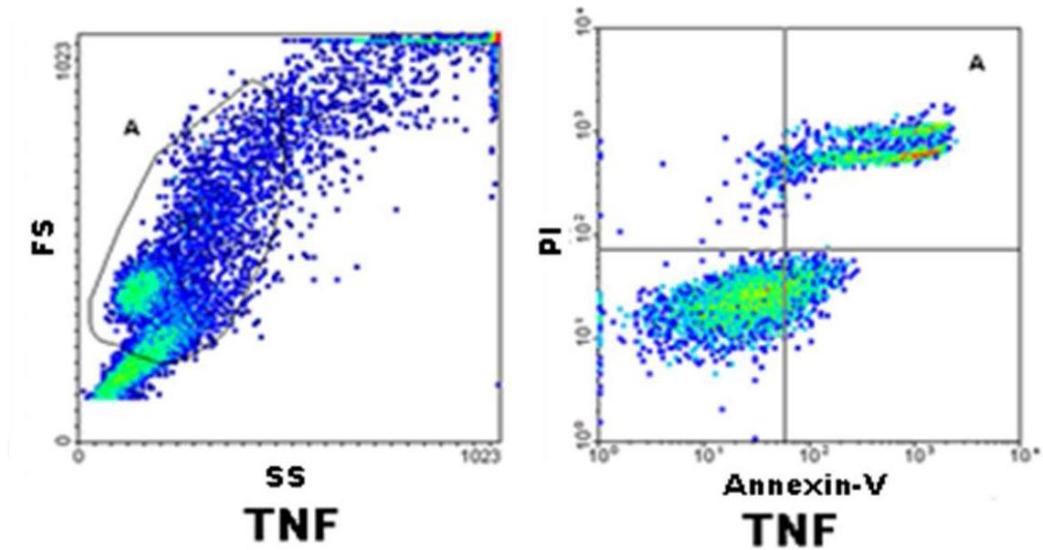
Εικόνα 12. Η οκτρεοτίδη αύξησε στατιστικά σημαντικά τόσο τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (μόνο Annexin-V θετικά, δεξιό κάτω τεταρτημόριο), όσο και τα όψιμα αποπτωτικά (Annexin-V και PI θετικά, δεξιό άνω τεταρτημόριο). Κάθε δείγμα έχει

αναλυθεί με την ίδια κυτταρομετρική στρατηγική, επιλέγοντας το gate A προς ανάλυση με τη διπλή χρώση, έτσι ώστε να αποκλειστούν συγκρίματα και μη ειδική πρόσδεση της Annexin-V.



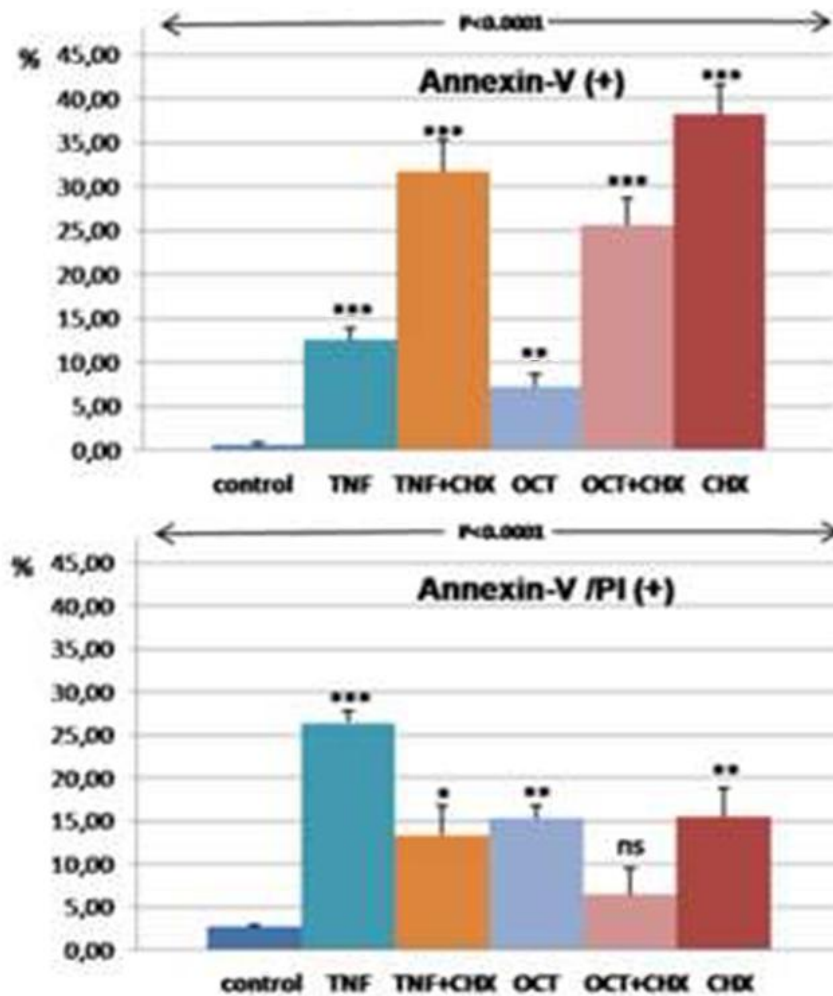
Εικόνα 13. Απεικονίζεται η αποπτωτική επίδραση της οκτρεοτίδης και του TNF-alpha, όπως ανιχνεύθηκε με την κυτταρομετρία ροής. Στατιστικά σημαντική αύξηση των πρώιμων (όσο και των όψιμων αποπτωτικών κυττάρων), προκλήθηκε και από τους δύο παράγοντες. Το control αναφέρεται στα αντίστοιχα ευρήματα, από τη μελέτη HepG2 κυττάρων χωρίς επίδραση, με την ίδια κυτταρομετρική στρατηγική. Το διάγραμμα αντιπροσωπεύει 8 διαφορετικά πειράματα ± S.E.M. (**p<0.01, ***p<0.001)

Ο TNF-alpha αύξησε στατιστικά σημαντικά τόσο τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (12,5±1,4%, p<0.001) όσο και τα όψιμα αποπτωτικά (26,4±4%, p<0.001) (Εικόνα 13 και 14). Όλες οι συγκρίσεις έγιναν με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από επεξεργασία HepG2 κυττάρων χωρίς επίδραση, με το ίδιο προπαρασκευαστικό και κυτταρομετρικό πρωτόκολλο (0,5±0,3% και 2±0,3% για την πρώιμη και την όψιμη απόπτωση, αντίστοιχα).

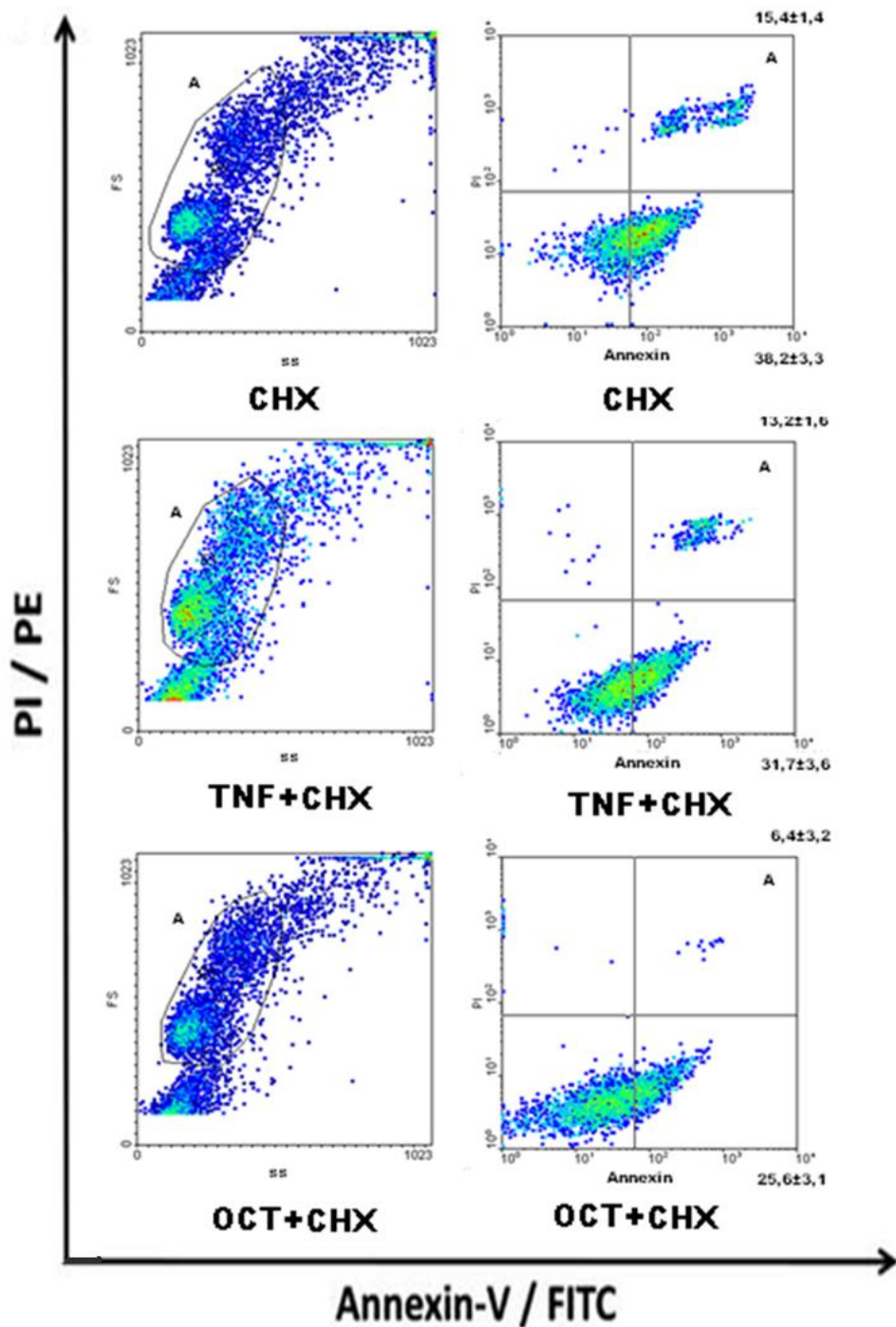


Εικόνα 14. Ο TNF-alpha αύξησε στατιστικά σημαντικά τόσο τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (μόνο Annexin-V θετικά, δεξιό κάτω τεταρτημόριο), όσο και τα όψιμα αποπτωτικά (Annexin-V και PI θετικά, δεξιό άνω τεταρτημόριο).

Η 24-ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με 20μg/ml CHX οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση των όψιμων αποπτωτικών κυττάρων (15,4±1,4%), αλλά κυρίως των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (38,2±3,3%) (Εικόνα 15 και 16).



Εικόνα 15. Η απόπτωση φάνηκε να ενισχύεται σημαντικά κατά την ταυτόχρονη επώαση HepG2 κυττάρων με CHX και οκτρεοτίδη ή TNF-alpha, σε σχέση με την μεμονωμένη επίδραση οκτρεοτίδης ή TNF-alpha. Η ταυτόχρονη επίδραση TNF-alpha με CHX αύξησε στατιστικά σημαντικά την πρόιμη (31,7±3,6%) όσο και την όψιμη απόπτωση (13,2±1,6%). Η ταυτόχρονη επίδραση οκτρεοτίδης με CHX αύξησε στατιστικά σημαντικά την πρόιμη (25,6±3,1%) και μη στατιστικά σημαντικά την όψιμη απόπτωση (6,4±3,2%). Το control αναφέρεται στα αντίστοιχα ευρήματα, από τη μελέτη HepG2 κυττάρων χωρίς επίδραση (0,5±0,3% και 2±0,3% για την πρόιμη και την όψιμα απόπτωση, αντίστοιχα). Το διάγραμμα αντιπροσωπεύει 8 διαφορετικά πειράματα ± S.E.M. (ns:non significant, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)



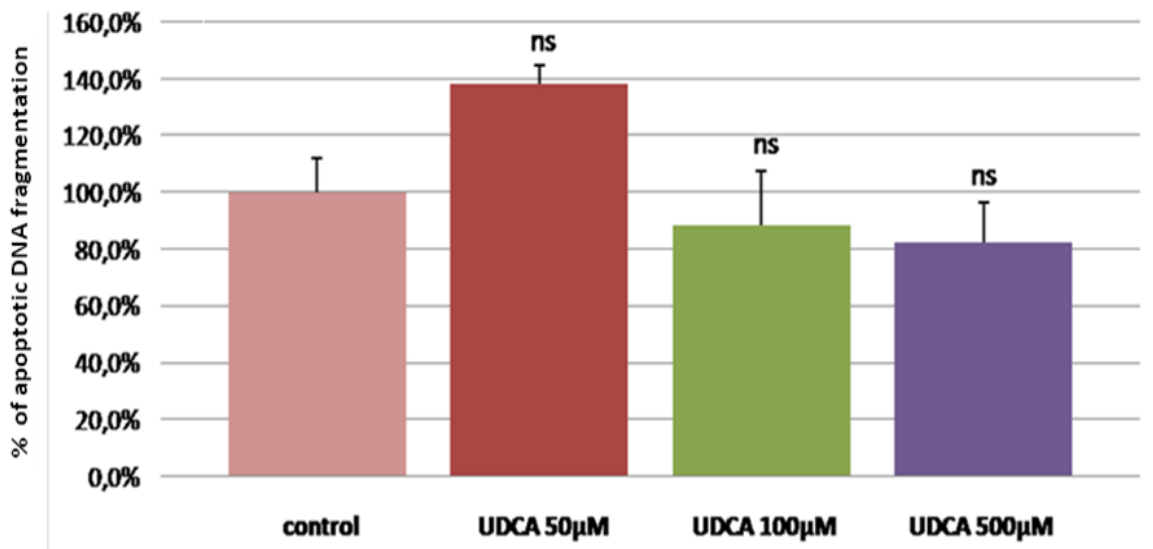
Εικόνα 16. Απεικονίζεται κυτταρομετρικά η ταυτόχρονη επώαση HepG2 κυττάρων με οκτρεοτίδη ή TNF-alpha, και CHX. Η ταυτόχρονη επίδραση TNF-alpha με CHX αύξησε στατιστικά σημαντικά την πρόιμη (μόνο Annexin-V θετικά, δεξιό κάτω τεταρτημόριο) όσο και την όσιμη απόπτωση (Annexin-V και PI θετικά, δεξιό άνω τεταρτημόριο). Η ταυτόχρονη επίδραση οκτρεοτίδης με CHX αύξησε στατιστικά σημαντικά την πρόιμη (μόνο Annexin-V θετικά, δεξιό κάτω τεταρτημόριο) και μη

στατιστικά σημαντικά την όψιμη απόπτωση (Annexin-V και PI θετικά, δεξιό άνω τεταρτημόριο). Όλες οι συγκρίσεις έγιναν με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από επεξεργασία HepG2 κυττάρων χωρίς επίδραση, με το ίδιο προπαρασκευαστικό και κυτταρομετρικό πρωτόκολλο.

2.5.2.2 Ο ρόλος του UDCA στην απόπτωση των HepG2 κυττάρων

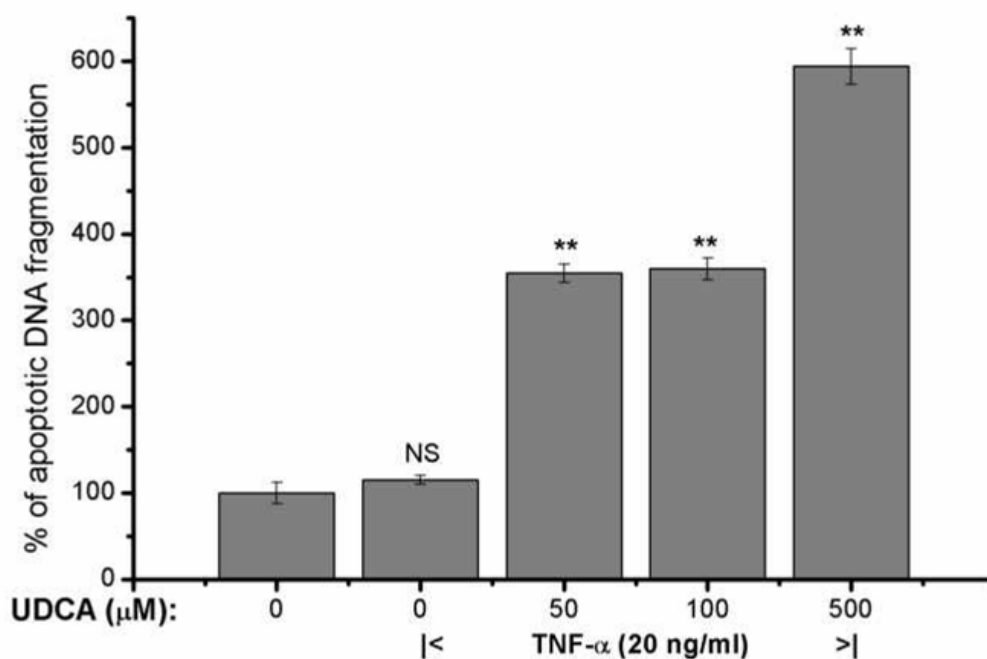
DNA κατάτμηση (fragmentation)

Μη στατιστικά σημαντική αύξηση των αποπτωτικών DNA θραυσμάτων παρατηρήθηκε, μετά από 24-ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με 50μM UDCA ($138.3 \pm 6.2\%$, συγκριτικά με $100 \pm 4.28\%$ του control), ενώ με τις συγκεντρώσεις των 100μM και 500μM UDCA, παρατηρήθηκε μείωση ($88.3 \pm 12.1\%$ και $82.5 \pm 13.1\%$, αντίστοιχα) (Εικόνα 17). Τα αποτελέσματα αυτά απλά δεν έφτασαν το στατιστικά σημαντικό επίπεδο ($p=0.062$, στη σύγκριση με τα controls).



Εικόνα 17. Μετά από 24-ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με UDCA, η ανίχνευση αποπτωτικών DNA θραυσμάτων, αποκάλυψε δοσοεξαρτώμενες, αλλά μη στατιστικά σημαντικές μεταβολές. Στη συγκέντρωση των 50μM, το UDCA φάνηκε να επάγει απόπτωση, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε μερική μείωση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 8 διαφορετικών πειραμάτων \pm S.E.M. (ns: non significant)

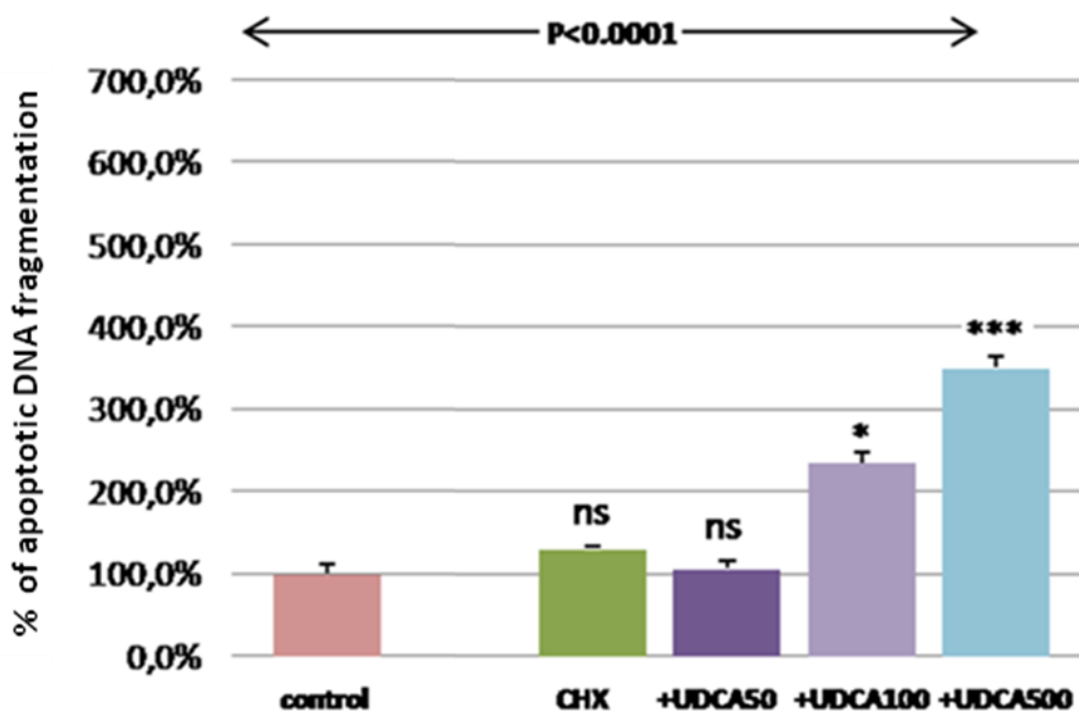
Παρά το ότι ο TNF- α μόνος οδήγησε σε μη στατιστική αύξηση των αποπτωτικών DNA θραυσμάτων ($115.2 \pm 8.17\%$), η ταυτόχρονη επίδραση με UDCA οδήγησε σε στατιστικά σημαντική δοσοεξαρτώμενη επαγωγή απόπτωσης ($354.5 \pm 10.4\%$, $359.7 \pm 12.8\%$ και $594.1 \pm 20.6\%$, με 50 μ M, 100 μ M και 500 μ M UDCA, αντίστοιχα) (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Απεικονίζεται η ανίχνευση αποπτωτικών DNA θραυσμάτων, μετά από 24-ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με TNF- α , μόνο ή σε συνδυασμό με 50 μ M, 100 μ M και 500 μ M UDCA. Η ταυτόχρονη επίδραση TNF- α και UDCA οδήγησε σε δοσοεξαρτώμενη επαγωγή απόπτωσης. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν 8 διαφορετικά πειράματα \pm S.E.M. (NS: non significant, ** $P < 0.01$, σε σύγκριση με κύτταρα χωρίς επίδραση).

Μελετήθηκε παράλληλα η επίδραση της κυκλοεξιμίδης στην πιθανή UDCA-επαγόμενη απόπτωση. Η μεμονωμένη επίδραση με CHX οδήγησε σε μη στατιστικά σημαντική αύξηση των αποπτωτικών DNA θραυσμάτων ($130.1 \pm 4.1\%$), συγκριτικά με κύτταρα χωρίς επίδραση. Το UDCA φάνηκε να επάγει δοσοεξαρτώμενη αύξηση στην CHX-επαγόμενη

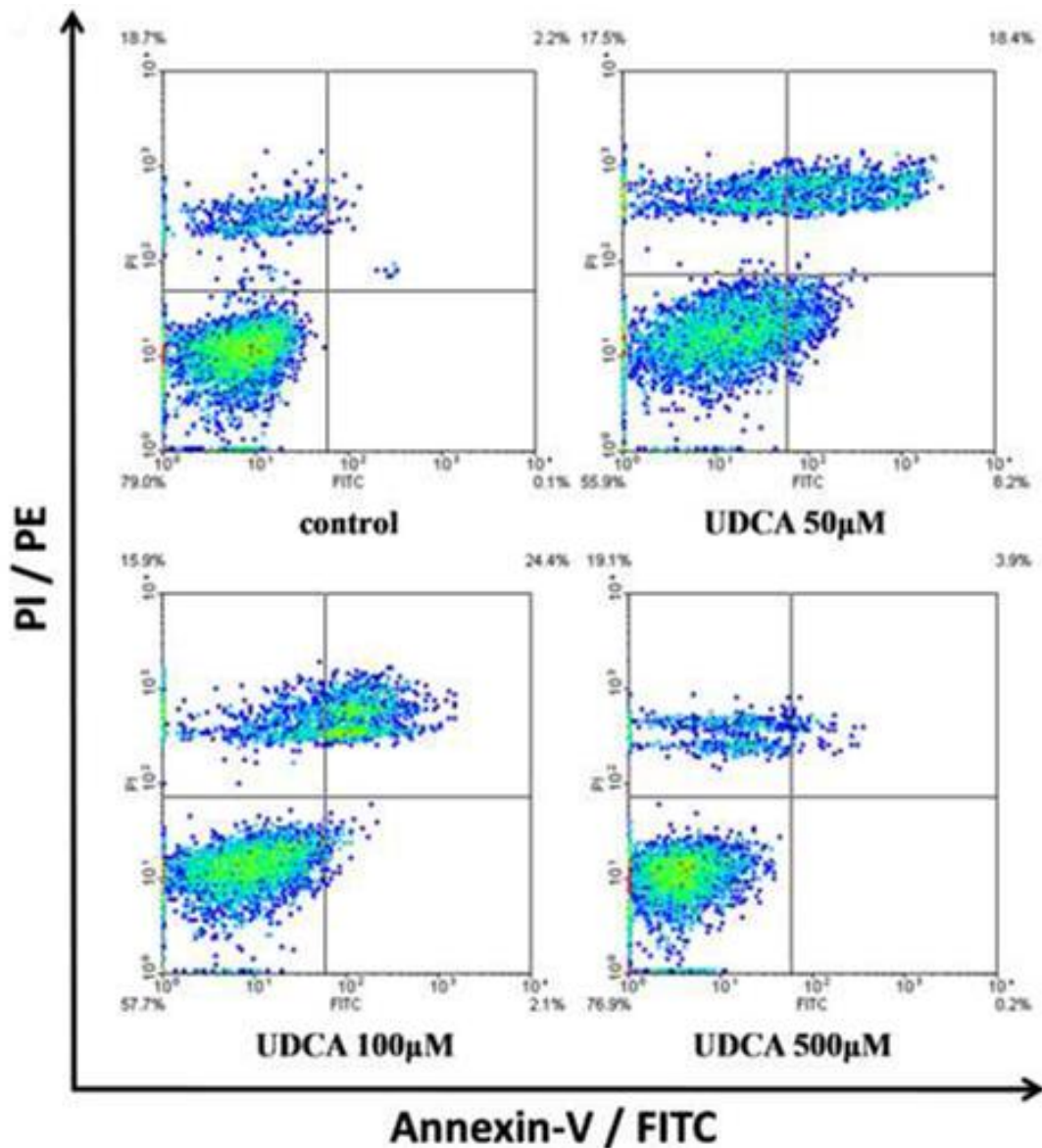
εμφάνιση αποπτωτικών DNA θραυσμάτων. Στη συγκέντρωση των 50μM, δεν παρατηρήθηκε αύξηση (106.6±8.3%), συγκριτικά με κύτταρα που δεν είχαν υποστεί καμία επίδραση (100±4,28%), ενώ στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις των 100μM (234.9±12.4%) και 500μM (351.1±14.3%) (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Η ανίχνευση αποπτωτικών DNA θραυσμάτων έδειξε ότι η ταυτόχρονη επίδραση UDCA και CHX οδήγησε σε δόσοεξαρτώμενη επαγωγή απόπτωσης. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν 8 διαφορετικά πειράματα ± S.E.M. (ns:non significant, *p<0.05, ***p<0.001)

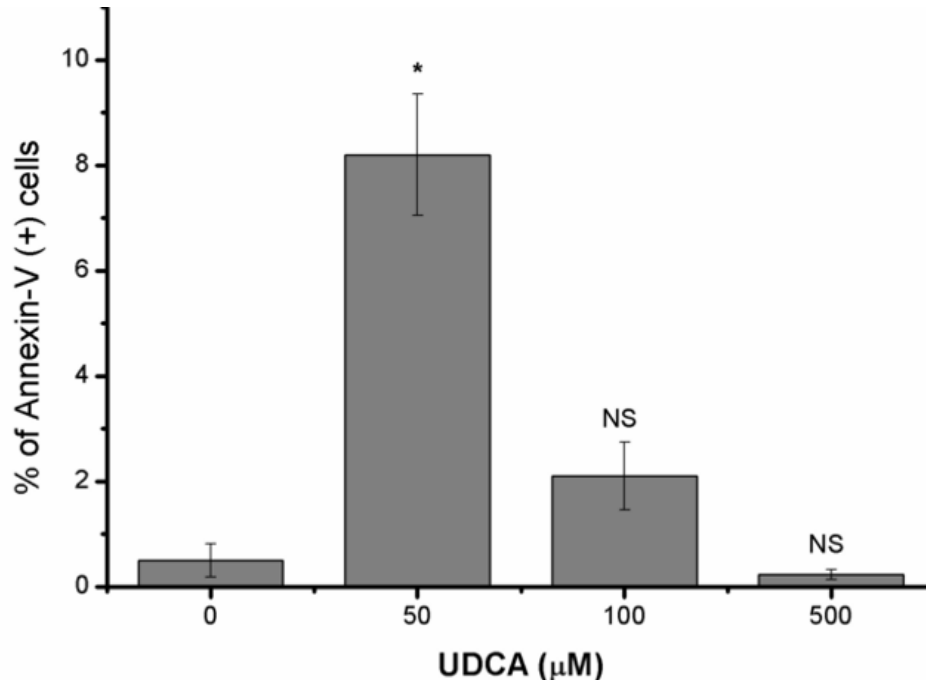
Κυτταρομετρία ροής (διπλή χρώση Annexin-V/PI)

Το UDCA στη συγκέντρωση των 50μM οδήγησε σε στατιστικά σημαντική επαγωγή πρόωμης απόπτωσης (8.2±2.1%), συγκριτικά με κύτταρα που δεν είχαν υποστεί καμία επίδραση (0.5±0.3%). Αντίθετα, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στο ποσοστό ανίχνευσης πρόωμων αποπτωτικών κυττάρων (2.1±0.9% και 0.23±0.01%, για UDCA 100μM και 500μM, αντίστοιχα) (κάτω δεξιά τεταρτημόρια) (Εικόνα 20).



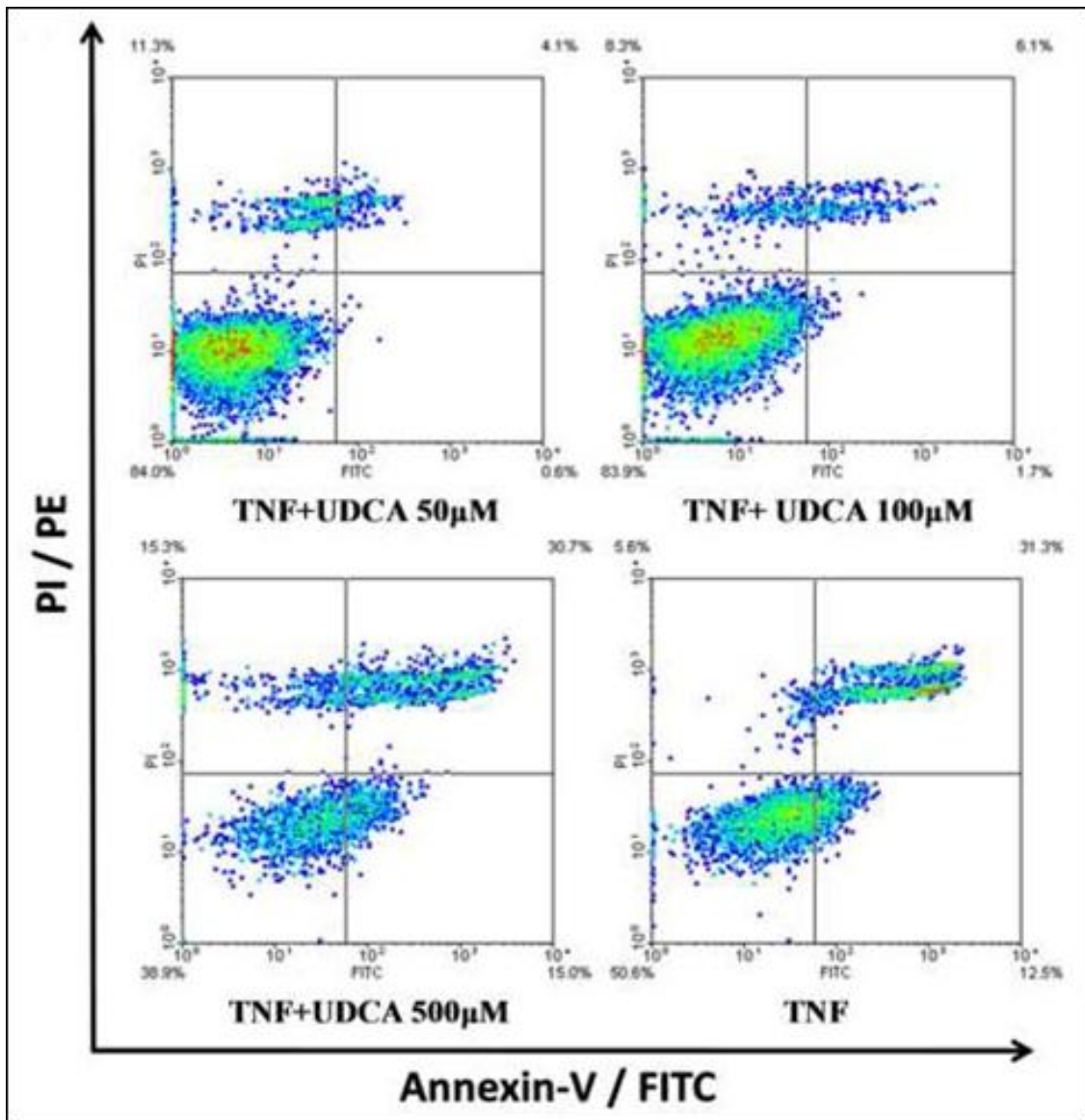
Εικόνα 20. α. Το UDCA σε συγκέντρωση 50µM αύξησε στατιστικά σημαντικά τόσο τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (μόνο Annexin-V θετικά, δεξιό κάτω τεταρτημόριο), όσο και τα όψιμα αποπτωτικά (Annexin-V και PI θετικά, δεξιό άνω τεταρτημόριο). Στη συγκέντρωση των 100µM UDCA, αν και τα όψιμα αποπτωτικά κύτταρα εμφανίστηκαν αυξημένα, τα πρώιμα αποπτωτικά εμφανίστηκαν σημαντικά μειωμένα. Στη συγκέντρωση των 500µM UDCA, τόσο τα όψιμα όσο και τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα εμφανίστηκαν σημαντικά μειωμένα. Το control αναφέρεται στα αντίστοιχα

ευρήματα, από τη μελέτη HepG2 κυττάρων χωρίς επίδραση, με την ίδια κυτταρομετρική στρατηγική.

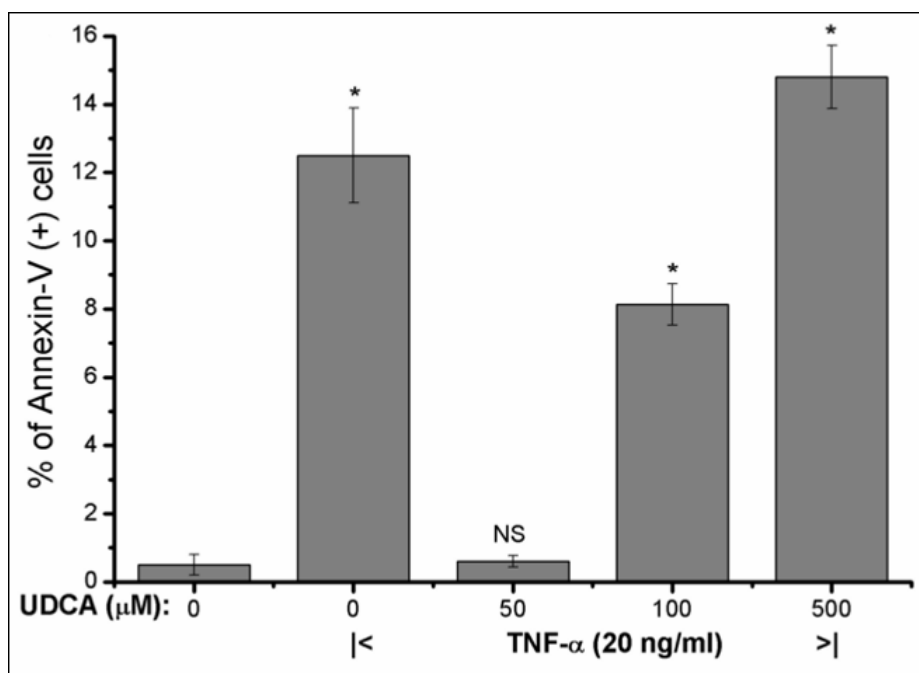


Εικόνα 20. β. Επώαση HepG2 κυττάρων με UDCA είχε ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντική αύξηση των πρώιμων και των όψιμων αποπτωτικών κυττάρων, μόνο στη συγκέντρωση των 50μM. Στη συγκέντρωση των 100μM, αυξήθηκαν μόνο τα όψιμα αποπτωτικά κύτταρα. (NS:non significant, *P<0.05, συγκριτικά με κύτταρα που δεν είχαν υποστεί καμία επίδραση)

Τελείως διαφορετική ήταν η εικόνα που παρατηρήθηκε μετά από ταυτόχρονη επώαση HepG2 κυττάρων με UDCA και TNF-alpha. Δοσοεξαρτώμενη αύξηση τόσο των πρώιμων όσο και των όψιμων αποπτωτικών κυττάρων παρατηρήθηκε. Η μεμονωμένη επίδραση με TNF-alpha αύξησε στατιστικά σημαντικά τόσο τα πρώιμα ($12.5 \pm 1.45\%$), όσο και τα όψιμα αποπτωτικά κύτταρα. Το UDCA σε συγκέντρωση 50μM φάνηκε να προστατεύει από την TNF-alpha επαγόμενη απόπτωση ($0.6 \pm 0.1\%$), λιγότερο δε στη συγκέντρωση των 100μM ($8.13 \pm 1.12\%$), ενώ δεν είχε καμία επίδραση στα 500μM ($14.8 \pm 1.8\%$) (Εικόνα 21).

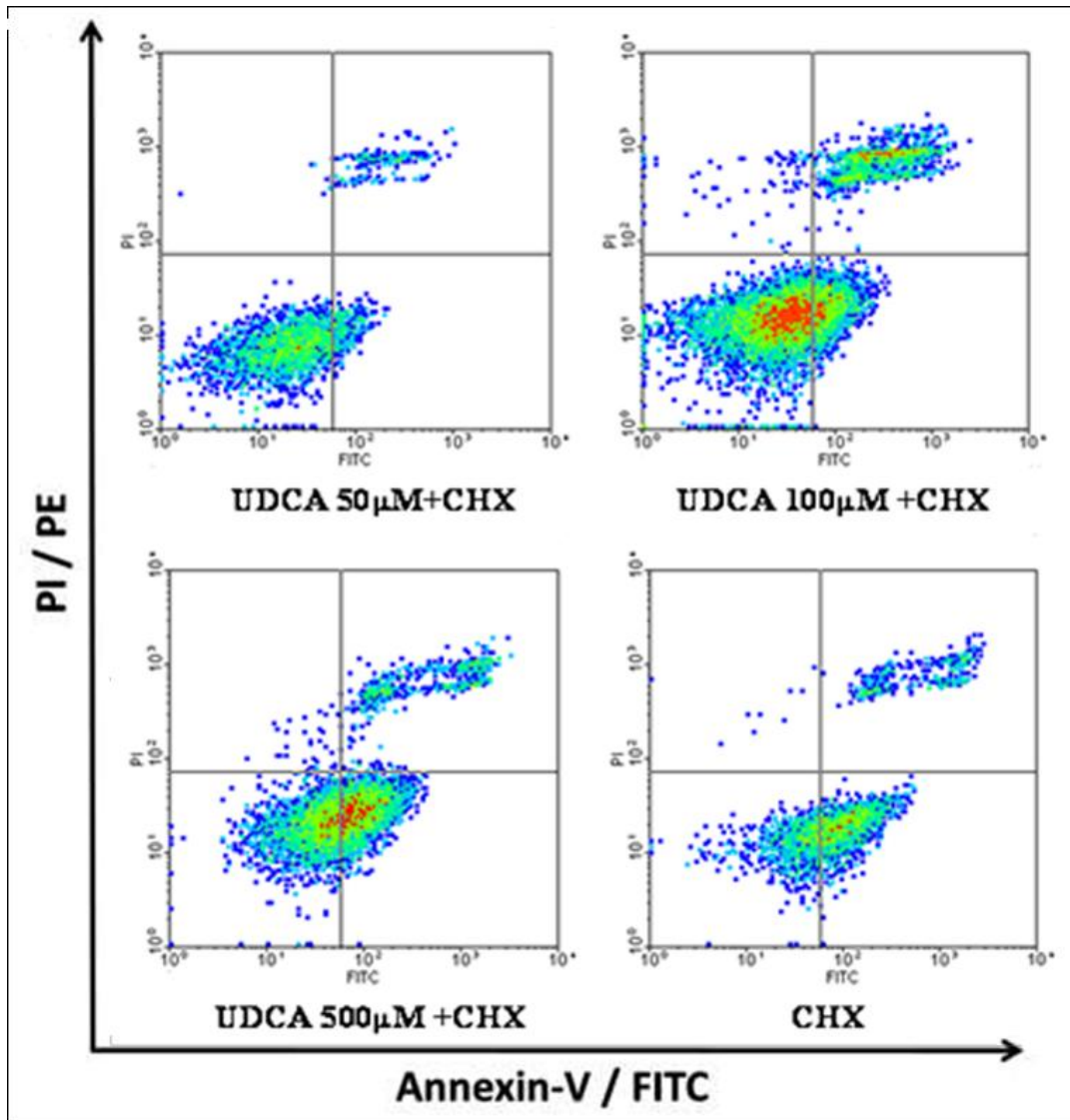


Εικόνα 21. α. Η επίδραση με TNF-alpha αύξησε σημαντικά τόσο τα πρώιμα, όσο και τα όψιμα αποπτωτικά κύτταρα. Η ταυτόχρονη επίδραση TNF-alpha και UDCA σε συγκέντρωση 50µM, οδήγησε σε μειωμένο βαθμό εμφάνισης τόσο πρώιμων (μόνο Annexin-V θετικά, δεξιό κάτω τεταρτημόριο) όσο και όψιμων αποπτωτικών κυττάρων (Annexin-V και PI θετικά, δεξιό άνω τεταρτημόριο). Στη συγκέντρωση των 100µM το UDCA φάνηκε να προστατεύει λιγότερο από την TNF-alpha επαγόμενη απόπτωση, ενώ στη συγκέντρωση των 500µM UDCA δε φάνηκε να υπάρχει καμία επίδραση.



Εικόνα 21. β. Απεικονίζεται η ανίχνευση των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (Annexin-V θετικών), μετά από 24-ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με TNF-alpha, μόνο ή σε συνδυασμό με 50μM, 100μM και 500μM UDCA. Στην ταυτόχρονη επίδραση TNF-alpha και UDCA, το UDCA φάνηκε να προστατεύει τα κύτταρα με αντίστροφα δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν 8 διαφορετικά πειράματα ± S.E.M. (NS: non significant, *P<0.05, σε σύγκριση με κύτταρα χωρίς επίδραση)

Προεπώαση HepG2 κυττάρων με CHX οδήγησε σε ενίσχυση της πρώιμης απόπτωσης (38.23±5.6%). Το UDCA σε συγκέντρωση 50μM φάνηκε πάλι να προστατεύει από την CHX-επαγόμενη απόπτωση (9.8±2.3%, non-significant), αλλά λιγότερο στις συγκεντρώσεις των 100μM και 500μM (17,33±5.2% και 30.5±5.1%), συγκριτικά με τα control (0.5±0.3%). Αξιοσημείωτο ήταν το ότι στην ενδιάμεση συγκέντρωση UDCA των 100μM, παρατηρήθηκε αυξημένο ποσοστό όψιμων αποπτωτικών κυττάρων (Εικόνα 22).

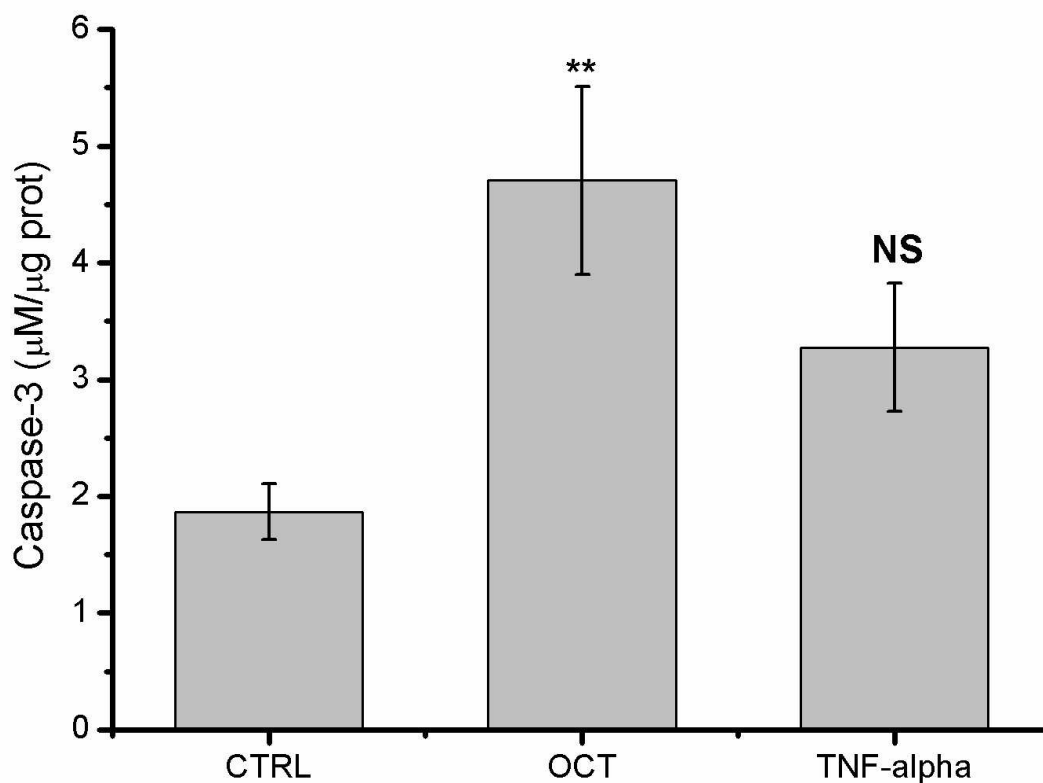


Εικόνα 22. Στατιστικά σημαντική αύξηση των πρόιμων αποπτωτικών κυττάρων (Annexin-V⁺) παρατηρήθηκε μετά από επώαση HepG2 κυττάρων με 20 μ g/ml CHX. Το UDCA στις συγκεντρώσεις 50 μ M, 100 μ M και 500 μ M UDCA φάνηκε να προστατεύει από την CHX-επαγόμενη απόπτωση με αντίστροφα δοσοεξαρτώμενο τρόπο.

2.5.3 Δραστικότητα κασπασών

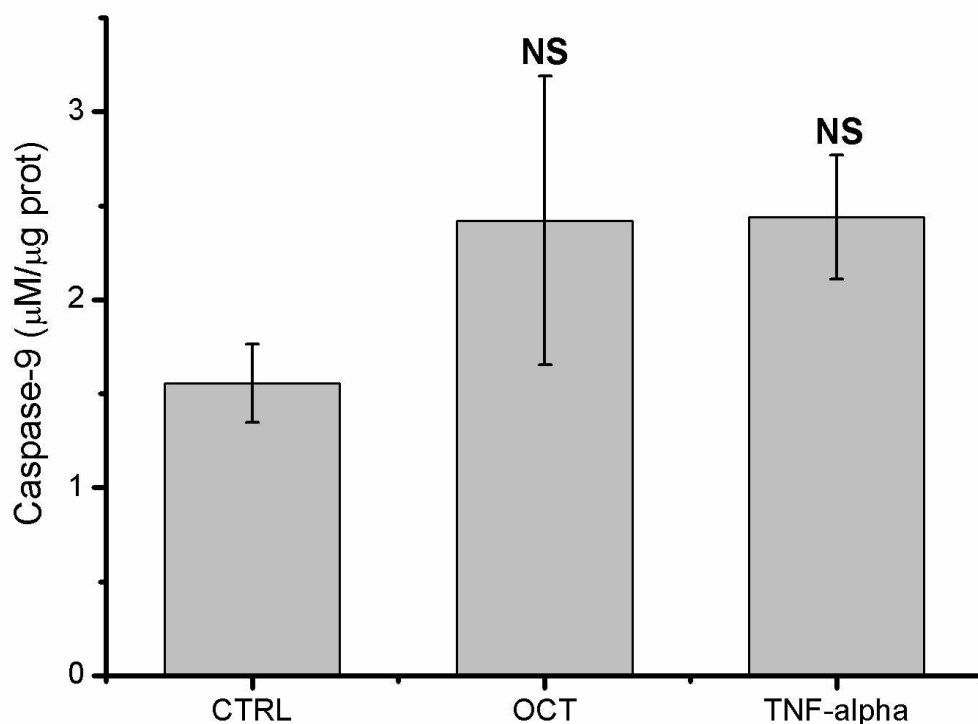
2.5.3.1 Οκτρεοτίδη

Η δραστικότητα της κασπάσης-3 αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά μετά από 24ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με οκτρεοτίδη ($4,71 \pm 0,81 \mu\text{M}/\mu\text{g}$, $p < 0.01$), ενώ μεμονωμένη επίδραση με TNF-alpha, οδήγησε σε μη στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστικότητάς της ($3,28 \pm 0,55 \mu\text{M}/\mu\text{g}$), συγκριτικά με κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε καμία επίδραση ($1,87 \pm 0,24 \mu\text{M}/\mu\text{g}$) (Εικόνα 23).



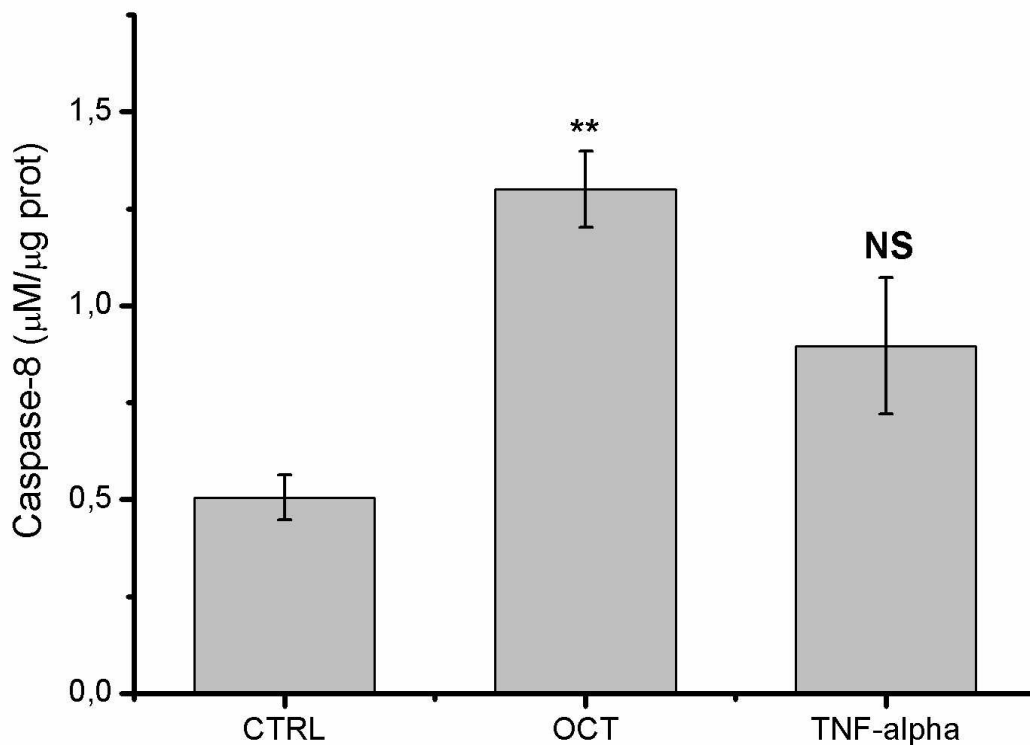
Εικόνα 23. Απεικονίζεται η δραστικότητα της κασπάσης-3, μετά από μεμονωμένη επίδραση οκτρεοτίδης 10^{-8} M και TNF-alpha 20ng/ml, συγκριτικά με κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε καμία επίδραση. (NS:non significant, ** $p < 0.01$)

Μικρή, αν και μη στατιστικά σημαντική, αύξηση της δραστικότητας της κασπάσης-9 παρατηρήθηκε μετά από μεμονωμένη επίδραση TNF-alpha ($2,44 \pm 0,33 \mu\text{M}/\mu\text{g}$) ή οκτρεοτίδης ($2,42 \pm 0,77 \mu\text{M}/\mu\text{g}$) σε HepG2 κύτταρα, πάντα συγκριτικά με κύτταρα που δεν υποβλήθησαν σε καμία επίδραση ($1,56 \pm 0,21 \mu\text{M}/\mu\text{g}$) (Εικόνα 24)



Εικόνα 24. Απεικονίζεται η δραστικότητα της κασπάσης-9, μετά από μεμονωμένη επίδραση οκτρεοτίδης 10^{-8} M και TNF-alpha 20ng/ml, συγκριτικά με κύτταρα που δεν υποβλήθησαν σε καμία επίδραση. (NS:non significant)

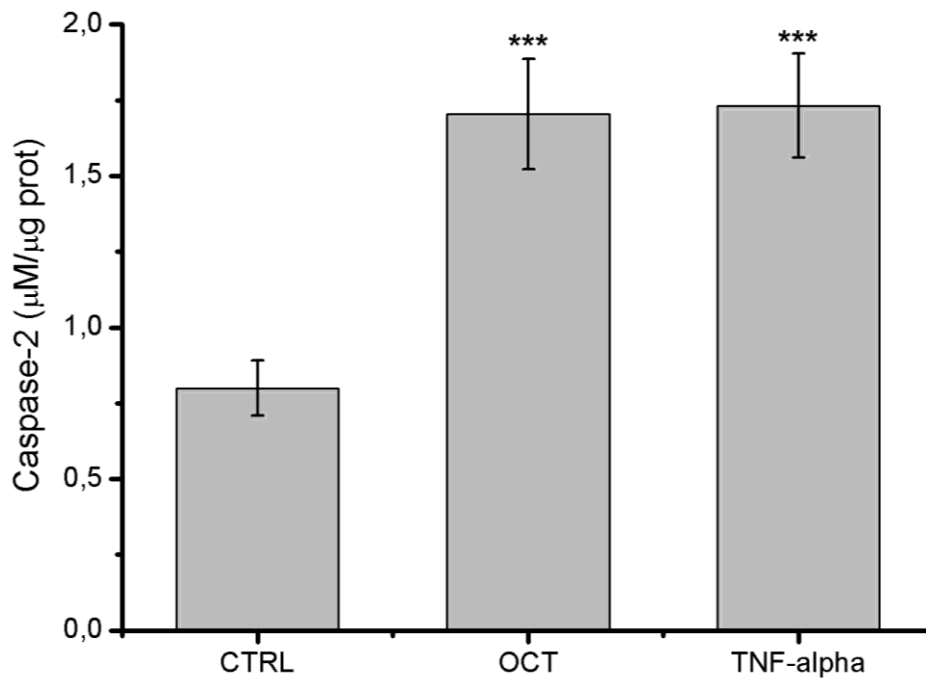
Μεμονωμένη επίδραση με TNF-alpha οδήγησε σε μη στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστικότητας της κασπάσης-8 ($0,9 \pm 0,18 \mu\text{M}/\mu\text{g}$), συγκριτικά με τα control κύτταρα ($0,51 \pm 0,06 \mu\text{M}/\mu\text{g}$) (Εικόνα 25). Παράλληλα, μεμονωμένη επίδραση με οκτρεοτίδη οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξησή της ($1,3 \pm 0,1 \mu\text{M}/\mu\text{g}$, $p < 0,01$) (Εικόνα 25).



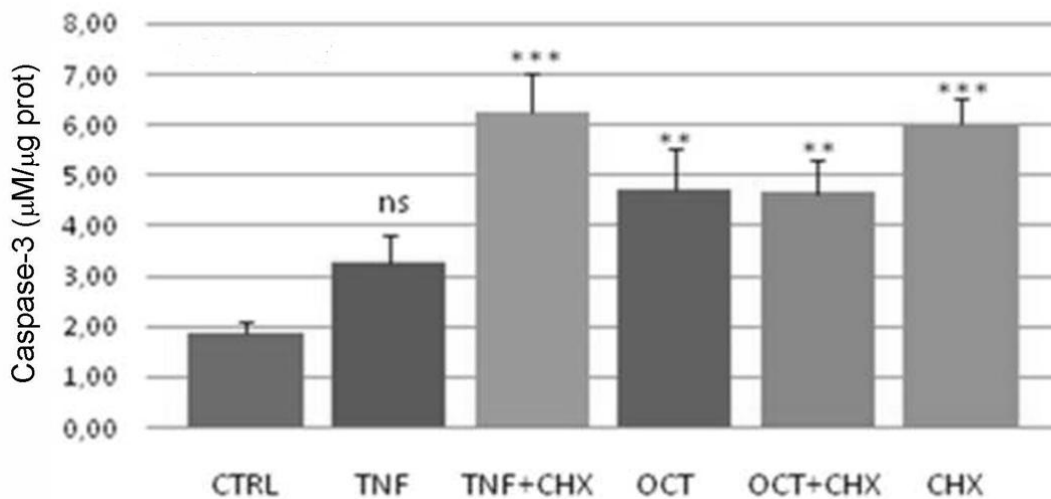
Εικόνα 25. Απεικονίζεται η δραστηριότητα της κασπάσης-8, μετά από μεμονωμένη επίδραση οκτρεοτίδης 10^{-8} M και TNF-alpha 20ng/ml, συγκριτικά με κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε καμία επίδραση. (NS:non significant, ** $p<0.01$)

Τόσο ο TNF-alpha όσο και η οκτρεοτίδη προκάλεσαν στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-2 ($1,73\pm 0,17\mu\text{M}/\mu\text{g}$ και $1,7\pm 0,18\mu\text{M}/\mu\text{g}$, αντίστοιχα, $p<0.001$), συγκριτικά με τα control κύτταρα ($0,8\pm 0,09\mu\text{M}/\mu\text{g}$) (Εικόνα 26).

Η δραστηριότητα της κασπάσης-3 αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά, μετά από επώαση HepG2 κυττάρων με CHX μεμονωμένα ($6\pm 0,52\mu\text{M}/\mu\text{g}$), συγκριτικά με κύτταρα controls ($1,87\pm 0,24\mu\text{M}/\mu\text{g}$). Η ταυτόχρονη επίδραση CHX και TNF-alpha, οδήγησε σε αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-3 ($6,26\pm 0,76\mu\text{M}/\mu\text{g}$), ενώ η ταυτόχρονη επίδραση CHX και οκτρεοτίδης δεν είχε κάποιο επιπρόσθετο αποτέλεσμα ($4,65\pm 0,66\mu\text{M}/\mu\text{g}$) (Εικόνα 27).

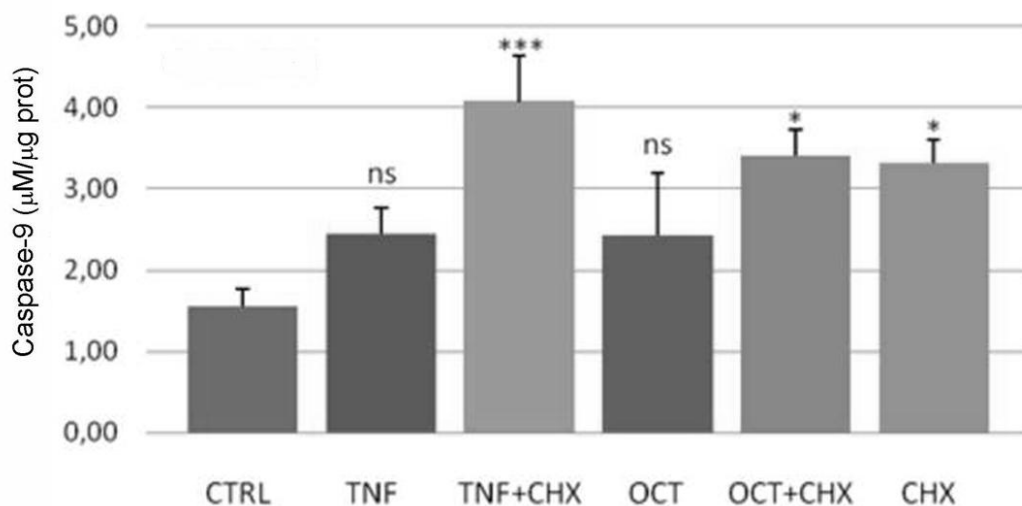


Εικόνα 26. Απεικονίζεται η δραστηριότητα της κασπάσης-2, μετά από μεμονωμένη επίδραση οκτρεοτίδης 10^{-8} M και TNF-alpha 20ng/ml, συγκριτικά με κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε καμία επίδραση. (***) $p < 0.001$)



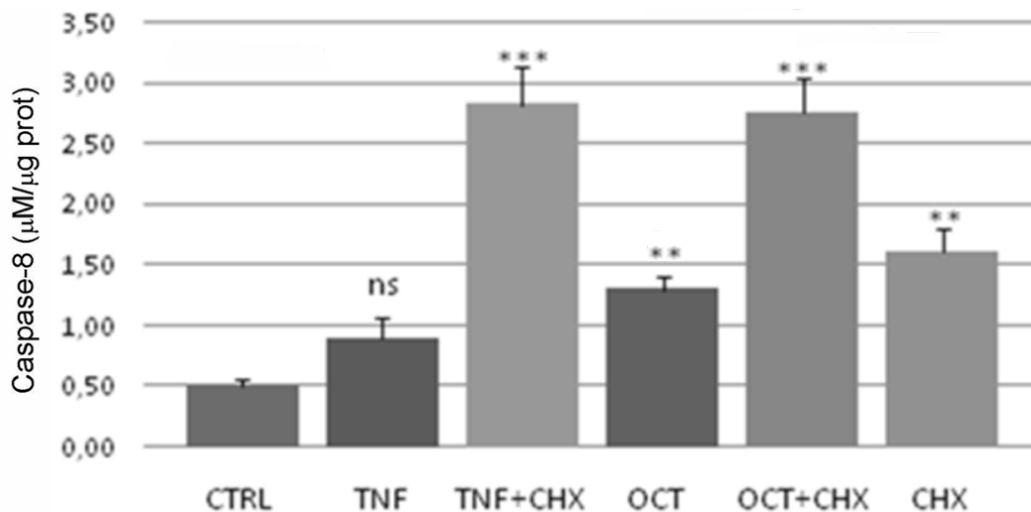
Εικόνα 27. Απεικονίζεται η δραστηριότητα της κασπάσης-3, μετά από μεμονωμένη επίδραση οκτρεοτίδης 10^{-8} M και TNF-alpha 20ng/ml, μεμονωμένα, αλλά και σε συνδυασμό με 20μg/ml CHX, συγκριτικά με κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε καμία επίδραση. (ns: non significant, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Η μεμονωμένη επίδραση με CHX ($3,31 \pm 0,29 \mu\text{M}/\mu\text{g}$), καθώς και ο συνδυασμός της με TNF-alpha ($4,07 \pm 0,57 \mu\text{M}/\mu\text{g}$) ή οκτρεοτίδη ($3,4 \pm 0,33 \mu\text{M}/\mu\text{g}$), οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-9, συγκριτικά με κύτταρα controls ($1,56 \pm 0,21 \mu\text{M}/\mu\text{g}$) (Εικόνα 28).



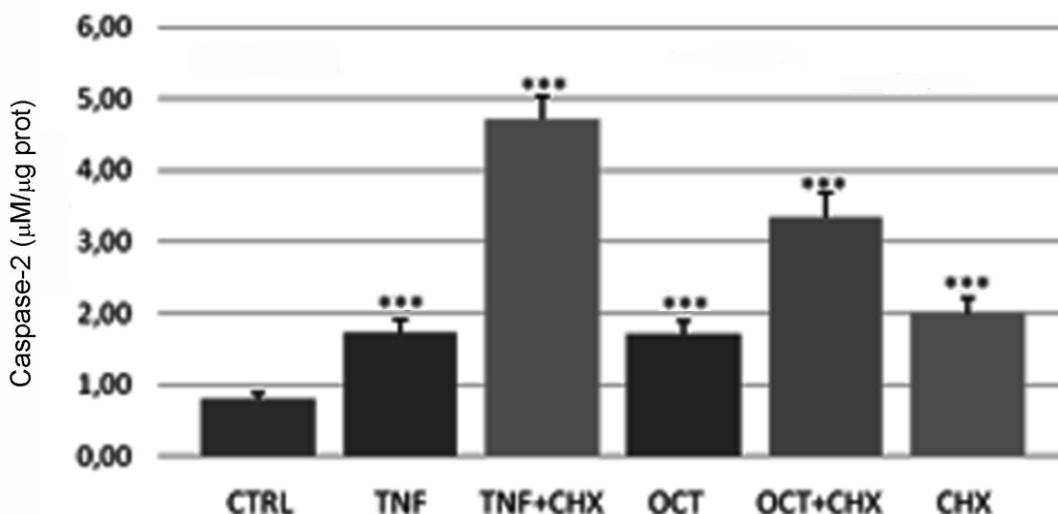
Εικόνα 28. Απεικονίζεται η δραστηριότητα της κασπάσης-9, μετά από μεμονωμένη επίδραση οκτρεοτίδης 10^{-8} M και TNF-alpha 20ng/ml, μεμονωμένα, αλλά και σε συνδυασμό με 20μg/ml CHX, συγκριτικά με κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε καμία επίδραση. (ns: non significant, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)

Τόσο η μεμονωμένη επίδραση με CHX ($1,61 \pm 0,2 \mu\text{M}/\mu\text{g}$), όσο και ο συνδυασμός της με TNF-alpha ($2,82 \pm 0,31 \mu\text{M}/\mu\text{g}$) ή οκτρεοτίδη ($2,75 \pm 0,29 \mu\text{M}/\mu\text{g}$), οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-8, συγκριτικά με κύτταρα controls ($0,51 \pm 0,06 \mu\text{M}/\mu\text{g}$) (Εικόνα 29).



Εικόνα 29. Απεικονίζεται η δραστηριότητα της κασπάσης-8, μετά από μεμονωμένη επίδραση οκτρεοτίδης 10^{-8} M και TNF-alpha 20ng/ml, μεμονωμένα, αλλά και σε συνδυασμό με 20μg/ml CHX, συγκριτικά με κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε καμία επίδραση. (ns: non significant, **p<0.01, ***p<0.001)

Παρόμοια με την κασπάση-8, τόσο η μεμονωμένη επίδραση με CHX ($2 \pm 0,22 \mu\text{M}/\mu\text{g}$), όσο και ο συνδυασμός της με TNF-alpha ($4,71 \pm 0,33 \mu\text{M}/\mu\text{g}$) ή οκτρεοτίδη ($3,35 \pm 0,34 \mu\text{M}/\mu\text{g}$), οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-2, συγκριτικά με κύτταρα controls ($0,8 \pm 0,09 \mu\text{M}/\mu\text{g}$) (Εικόνα 30).

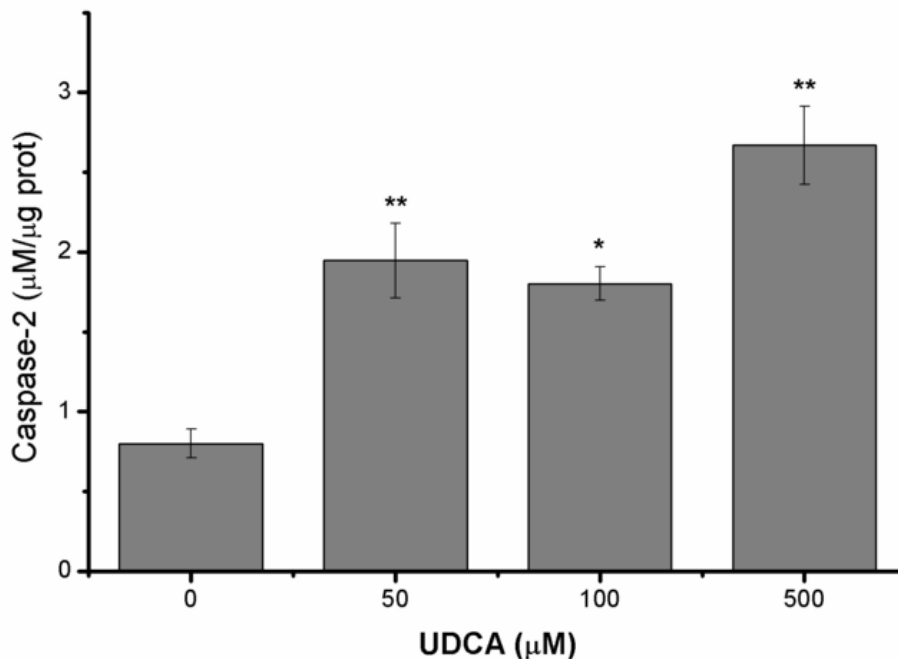


Εικόνα 30. Απεικονίζεται η δραστηριότητα της κασπάσης-2, μετά από μεμονωμένη επίδραση οκτρεοτίδης 10^{-8} M και TNF-alpha 20ng/ml, μεμονωμένα, αλλά και σε

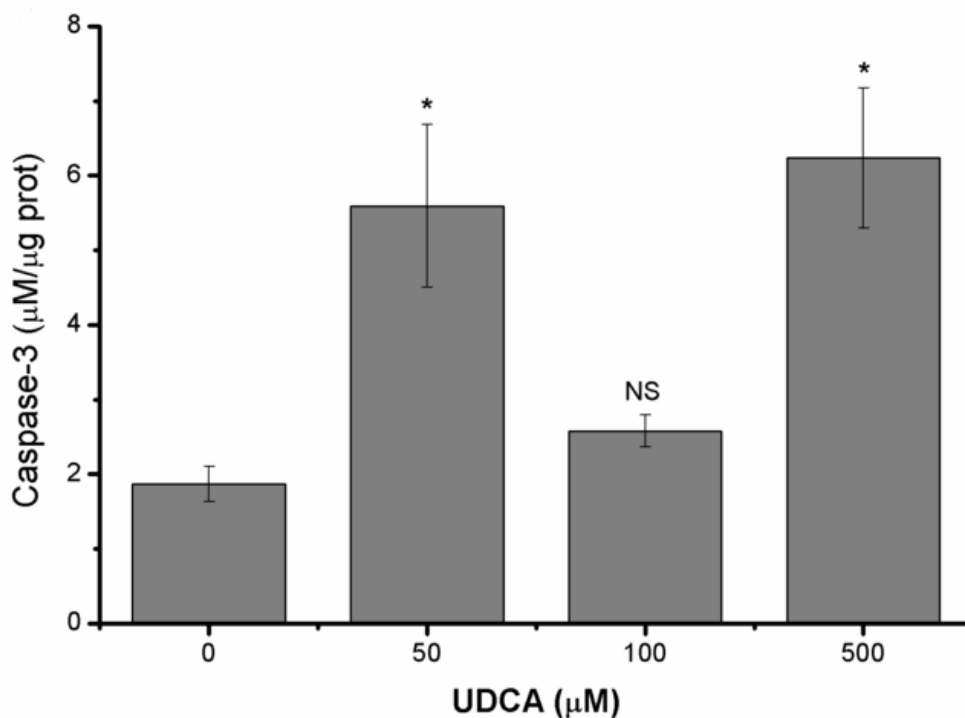
συνδυασμό με 20μg/ml CHX, συγκριτικά με κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε καμία επίδραση. (***) $p < 0.001$)

2.5.3.2 UDCA

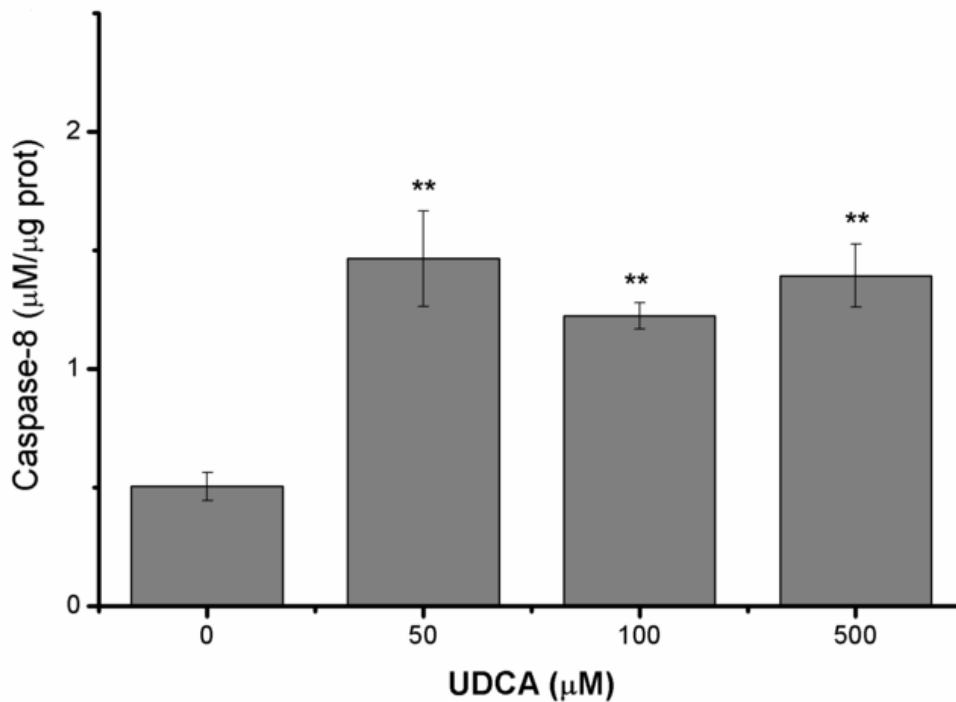
Στη συγκέντρωση των 50μM, το UDCA οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-3 ($5.59 \pm 1.09 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$), της κασπάσης-8 ($1.47 \pm 0.2 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$) και της κασπάσης-2 ($1.95 \pm 0.23 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$), συγκριτικά με κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε καμία επίδραση (1.87 ± 0.24 , 0.51 ± 0.06 και $0.8 \pm 0.09 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$, αντίστοιχα). Στη συγκέντρωση των 100μM, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-8 ($1.22 \pm 0.06 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$) και της κασπάσης-2 ($1.8 \pm 0.11 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$), ενώ στην υψηλότερη συγκέντρωση των 500μM, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας όλων των κασπασών (6.24 ± 0.94 , 4.58 ± 0.38 , 1.39 ± 0.13 και $2.67 \pm 0.24 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$, για τις κασπάσες -3, -9, -8 και -2, αντίστοιχα). Το UDCA σε συγκέντρωση 50μM αύξησε μη στατιστικά σημαντικά την δραστηριότητα της κασπάσης-9 ($2.25 \pm 0.23 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$), συγκριτικά με control κύτταρα ($1.56 \pm 0.21 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$), ενώ σε συγκέντρωση 100μM, αύξησε μη στατιστικά σημαντικά την δραστηριότητα της κασπάσης-3 ($2.58 \pm 0.21 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$) και της κασπάσης-9 ($2.09 \pm 0.29 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$) (Εικόνα 31-34).



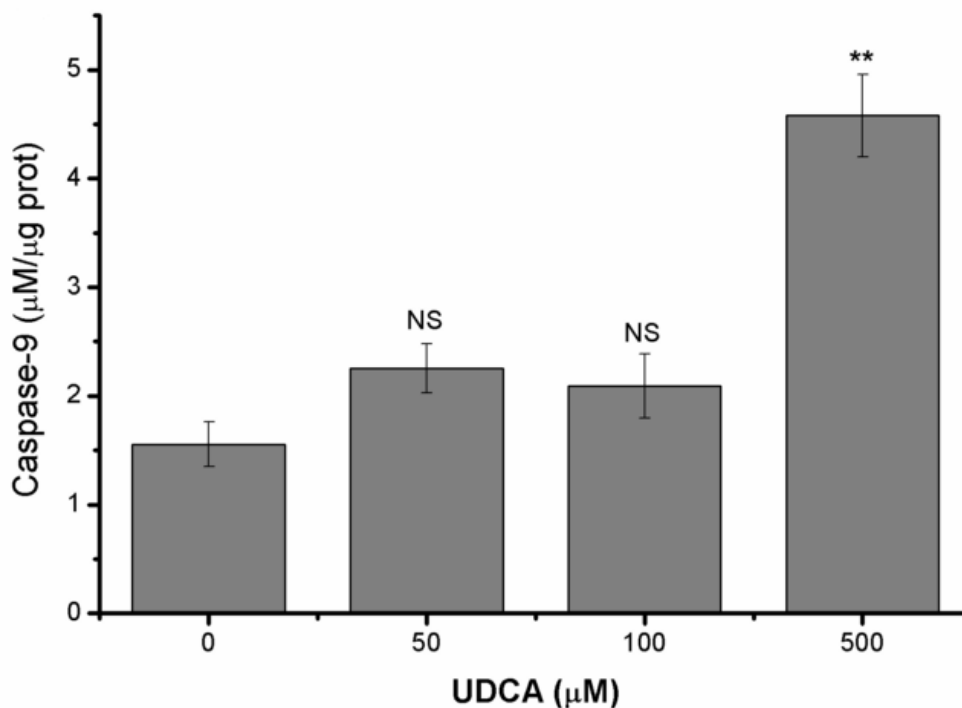
Εικόνα 31. Απεικονίζεται η δραστηριότητα της κασπάσης-2, μετά από επίδραση UDCA σε συγκέντρωση 50μM, 100μM και 500μM. Η σύγκριση έγινε με κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε καμία επίδραση. (*p<0.05, **p<0.01)



Εικόνα 32. Απεικονίζεται η δραστηριότητα της κασπάσης-3, μετά από επίδραση UDCA σε συγκέντρωση 50μM, 100μM και 500μM. Η σύγκριση έγινε με κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε καμία επίδραση. (NS:non significant, *p<0.05)



Εικόνα 33. Απεικονίζεται η δραστηριότητα της κασπάσης-8, μετά από επίδραση UDCA σε συγκέντρωση 50μM, 100μM και 500μM. Η σύγκριση έγινε με κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε καμία επίδραση. (**p<0.01)



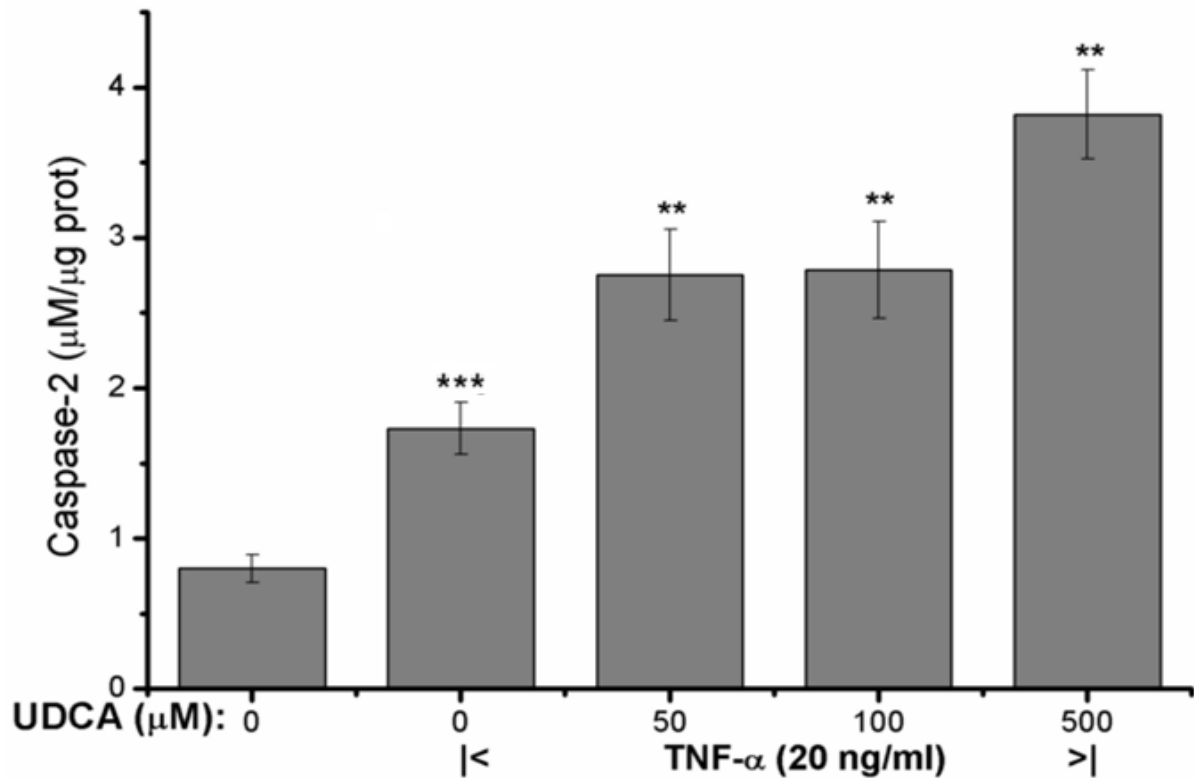
Εικόνα 34. Απεικονίζεται η δραστηριότητα της κασπάσης-9, μετά από επίδραση UDCA σε συγκέντρωση 50μM, 100μM και 500μM. Η σύγκριση έγινε με κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε καμία επίδραση. (NS:non significant, **p<0.01)

Επίδραση UDCA με TNF-alpha

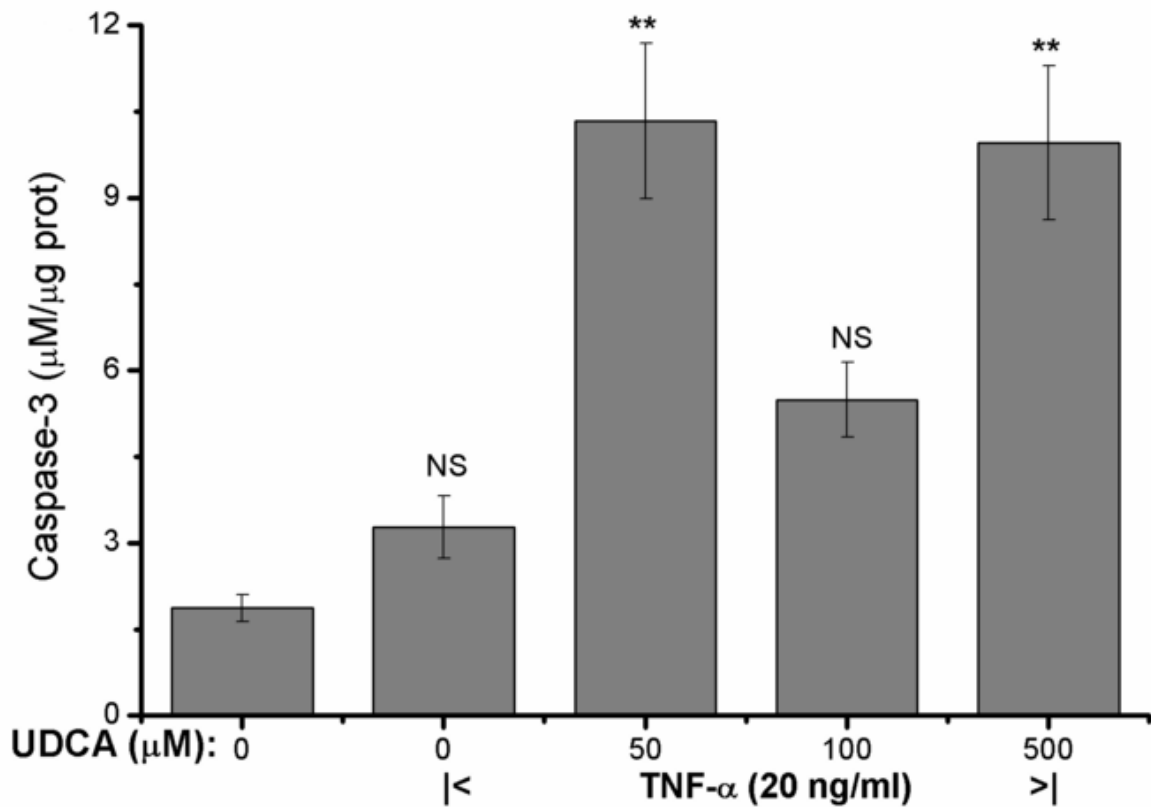
Επώαση HepG2 κυττάρων με TNF-alpha οδήγησε σε μη στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας όλων των κασπασών, εκτός της κασπάσης-2, όπου η αύξηση ήταν στατιστικά σημαντική ($3,28 \pm 0.55$, 2.44 ± 0.33 , 0.9 ± 0.18 και $1.73 \pm 0.17 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$, για τις κασπάσες -3, -9, -8 και -2, αντίστοιχα), συγκριτικά με κύτταρα controls.

Στα πειράματα ταυτόχρονης επίδρασης TNF-alpha και UDCA, η δραστηριότητα της κασπάσης-8 και της κασπάσης-2 ήταν αυξημένη σε όλες τις συγκεντρώσεις UDCA. Αντίθετα, η δραστηριότητα της κασπάσης-3 και της κασπάσης-9 (μιτοχονδριακό μονοπάτι) αυξήθηκε μόνο στη χαμηλή (50 μM) και στην υψηλή (500 μM) συγκέντρωση UDCA (Εικόνα 35-38).

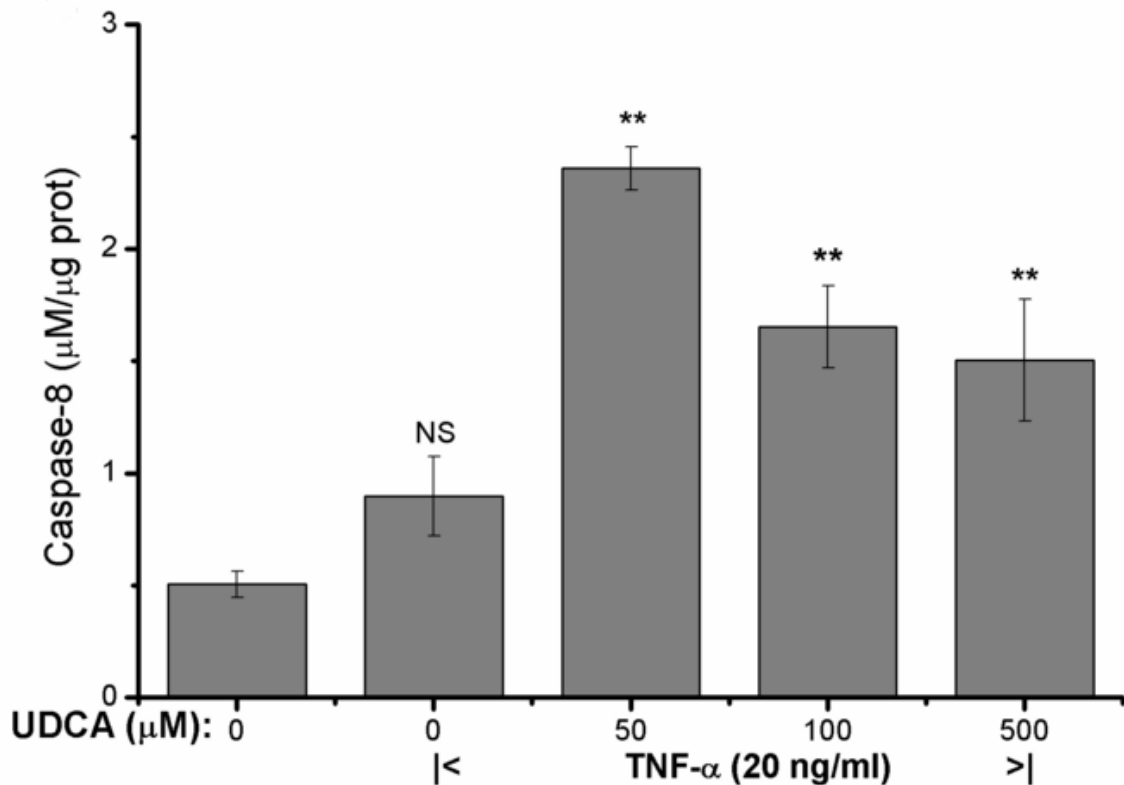
Στη συγκέντρωση των 50 μM , το UDCA οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-3 ($10.33 \pm 1.35 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$), της κασπάσης-8 ($2.36 \pm 0.1 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$), της κασπάσης-2 ($2.75 \pm 0.3 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$) και της κασπάσης-9 ($3.54 \pm 0.3 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$), ενώ στη συγκέντρωση των 100 μM , παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-8 ($1.65 \pm 0.18 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$) και της κασπάσης-2 ($2.79 \pm 0.32 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$). Στην υψηλότερη συγκέντρωση των 500 μM , παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας όλων των κασπασών (9.96 ± 1.34 , 7.89 ± 0.88 , 1.5 ± 0.27 και $3.82 \pm 0.29 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$, για τις κασπάσες -3, -9, -8 και -2, αντίστοιχα). Στη συγκέντρωση των 100 μM το UDCA αύξησε μεν, αλλά μη στατιστικά σημαντικά, τη δραστηριότητα της κασπάσης-3 ($5.49 \pm 0.65 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$) και της κασπάσης-9 ($2.76 \pm 0.26 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$) (Εικόνα 35-38).



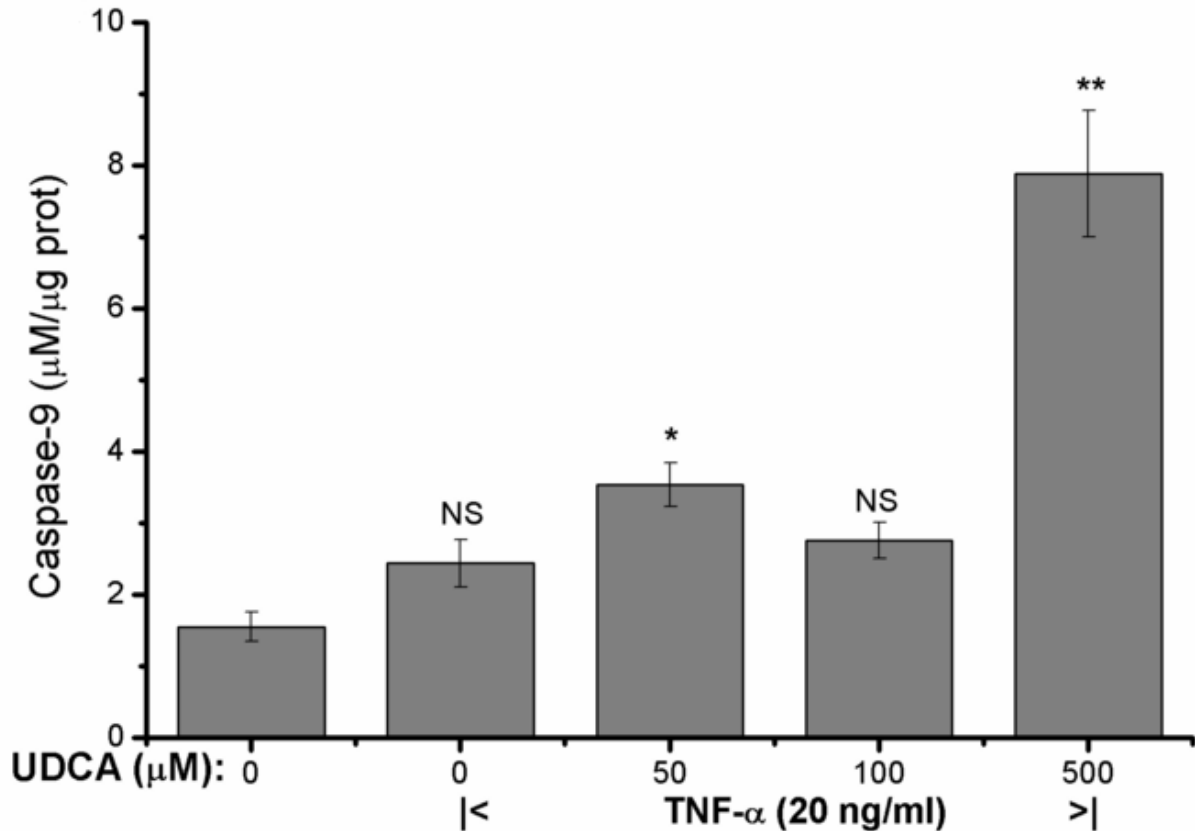
Εικόνα 35. Απεικονίζεται η δραστικότητα της κασπάσης-2, μετά από 24-ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με TNF-alpha 20ng/ml, μόνο ή σε συνδυασμό με 50μM, 100μM και 500μM UDCA. Τόσο ο TNF-alpha μόνος όσο και η επίδραση TNF-alpha και UDCA 50μM, 100μM ή 500μM, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστικότητας της κασπάσης-2. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν 8 διαφορετικά πειράματα ± S.E.M. (** P<0.01, *** p<0.001, σε σύγκριση με κύτταρα χωρίς επίδραση).



Εικόνα 36. Απεικονίζεται η δραστηριότητα της κασπάσης-3, μετά από 24-ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με TNF-alpha 20ng/ml, μόνο ή σε συνδυασμό με 50μM, 100μM και 500μM UDCA. Ο TNF-alpha μόνος οδήγησε σε μη στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-3. Η ταυτόχρονη επίδραση TNF-alpha και UDCA 50μM ή 500μM, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητάς της. Η ταυτόχρονη, όμως, επίδραση TNF-alpha και UDCA 100μM οδήγησε σε μη στατιστικά σημαντική αύξηση της αντίστοιχης δραστηριότητας. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν 8 διαφορετικά πειράματα ± S.E.M. (NS:non significant, ** P<0.01, σε σύγκριση με κύτταρα χωρίς επίδραση).



Εικόνα 37. Απεικονίζεται η δραστηριότητα της κασπάσης-8, μετά από 24-ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με TNF-alpha 20ng/ml, μόνο ή σε συνδυασμό με 50μM, 100μM και 500μM UDCA. Ο TNF-alpha μόνος οδήγησε σε μη στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-8. Η ταυτόχρονη επίδραση TNF-alpha και UDCA 50μM, 100μM ή 500μM, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητάς της. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν 8 διαφορετικά πειράματα ± S.E.M. (NS:non significant, ** P<0.01, σε σύγκριση με κύτταρα χωρίς επίδραση).



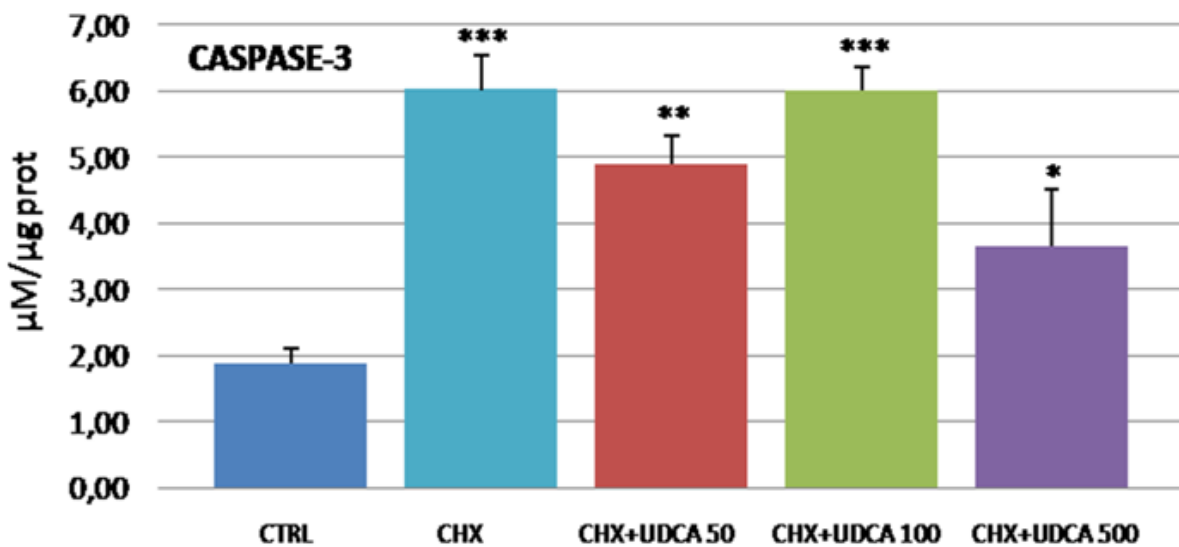
Εικόνα 38. Απεικονίζεται η δραστικότητα της κασπάσης-9, μετά από 24-ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με TNF-alpha 20ng/ml, μόνο ή σε συνδυασμό με 50μM, 100μM και 500μM UDCA. Ο TNF-alpha μόνος οδήγησε σε μη στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστικότητας της κασπάσης-9. Η ταυτόχρονη επίδραση TNF-alpha και UDCA 50μM ή 500μM, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστικότητάς της. Η ταυτόχρονη, όμως, επίδραση TNF-alpha και UDCA 100μM οδήγησε σε μη στατιστικά σημαντική αύξηση της αντίστοιχης δραστικότητας. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν 8 διαφορετικά πειράματα ± S.E.M. (NS:non significant, *p<0.05, ** P<0.01, σε σύγκριση με κύτταρα χωρίς επίδραση).

Επίδραση UDCA με CHX

Επώαση HepG2 κυττάρων με CHX μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με διαφορετικές συγκεντρώσεις UDCA, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστικότητας όλων των κασπασών. Δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στην

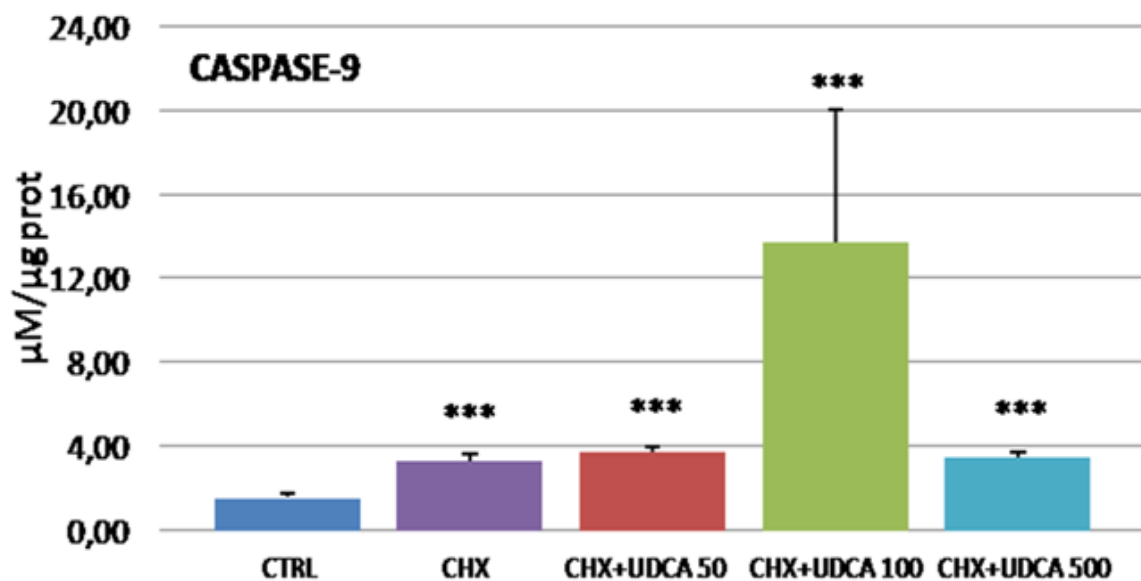
δραστικότητα όλων των κασπασών στις ταυτόχρονες επιδράσεις με UDCA συγκριτικά με τη μεμονωμένη επίδραση με CHX.

Τα αποτελέσματα για την κασπάση-3 είχαν ως εξής: 6 ± 0.52 , 4.88 ± 0.42 , 5.99 ± 0.37 και $3.65 \pm 0.85 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$, για τις επιδράσεις με CHX, CHX+UDCA 50 μM , CHX+UDCA 100 μM και CHX+UDCA 500 μM , αντίστοιχα (Εικόνα 39).



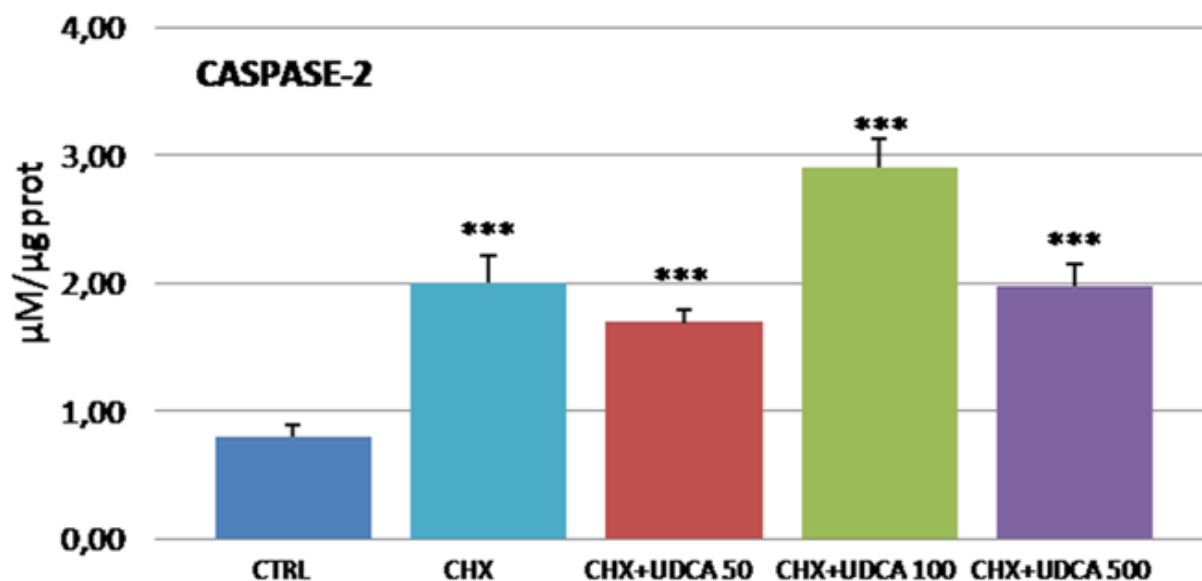
Εικόνα 39. Απεικονίζεται η δραστικότητα της κασπάσης-3, μετά από 24-ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με CHX 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, μόνη ή σε συνδυασμό με 50 μM , 100 μM και 500 μM UDCA. Τόσο η CHX μεμονωμένα όσο και η ταυτόχρονη επίδραση CHX με UDCA 50 μM , 100 μM ή 500 μM , οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστικότητας της κασπάσης-3. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν 8 διαφορετικά πειράματα \pm S.E.M. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $P < 0.001$, σε σύγκριση με κύτταρα χωρίς επίδραση)

Τα αποτελέσματα για την κασπάση-9 είχαν ως εξής: 3.31 ± 0.29 , 3.72 ± 0.29 , 13.74 ± 6.31 και $3.49 \pm 0.22 \mu\text{M}\mu\text{g}^{-1}$, για τις επιδράσεις με CHX, CHX+UDCA 50 μM , CHX+UDCA 100 μM και CHX+UDCA 500 μM , αντίστοιχα (Εικόνα 40).



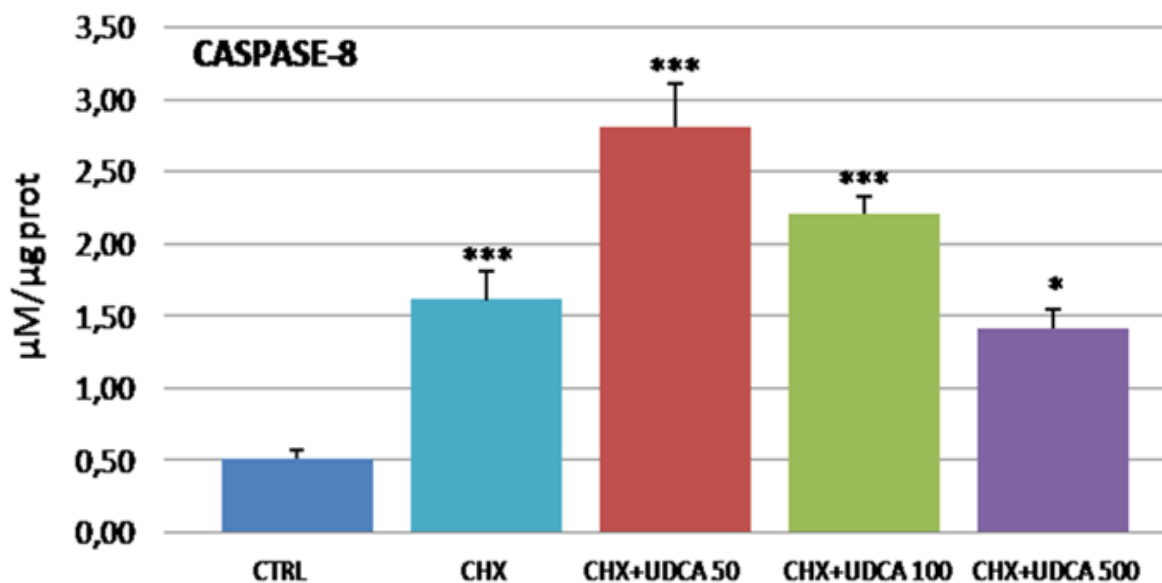
Εικόνα 40. Απεικονίζεται η δραστηριότητα της κασπάσης-9, μετά από 24-ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με CHX 20μg/ml, μόνη ή σε συνδυασμό με 50μM, 100μM και 500μM UDCA. Τόσο η CHX μεμονωμένα όσο και η ταυτόχρονη επίδραση CHX με UDCA 50μM, 100μM ή 500μM, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-9. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν 8 διαφορετικά πειράματα ± S.E.M. (***) P<0.001, σε σύγκριση με κύτταρα χωρίς επίδραση)

Τα αποτελέσματα για την κασπάση-2 είχαν ως εξής: 2±0.22, 1.69±0.1, 2.9±0.23 and 1.98±0.17μMμg-1, για τις επιδράσεις με CHX, CHX+UDCA 50μM, CHX+UDCA 100μM και CHX+UDCA 500μM, αντίστοιχα (Εικόνα 41).



Εικόνα 41. Απεικονίζεται η δραστηριότητα της κασπάσης-2, μετά από 24-ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με CHX 20μg/ml, μόνη ή σε συνδυασμό με 50μM, 100μM και 500μM UDCA. Τόσο η CHX μεμονωμένα όσο και η ταυτόχρονη επίδραση CHX με UDCA 50μM, 100μM ή 500μM, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-2. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν 8 διαφορετικά πειράματα ± S.E.M. (***) P<0.001, σε σύγκριση με κύτταρα χωρίς επίδραση)

Τέλος, στην κασπάση-8 παρατηρήθηκε μία δοσοεξαρτώμενη μείωση της δραστηριότητάς της, με την σταδιακή αύξηση των συγκεντρώσεων UDCA, στις ταυτόχρονες επιδράσεις με CHX. Τα αποτελέσματα για την κασπάση-8 είχαν ως εξής: 1.61 ± 0.2 , 2.8 ± 0.34 , 2.2 ± 0.13 and $1.4 \pm 0.15 \mu\text{M} \mu\text{g}^{-1}$, για τις επιδράσεις με CHX, CHX+UDCA 50μM, CHX+UDCA 100μM και CHX+UDCA 500μM, αντίστοιχα (Εικόνα 42).



Εικόνα 42. Απεικονίζεται η δραστηριότητα της κασπάσης-8, μετά από 24-ωρη επώαση HepG2 κυττάρων με CHX 20μg/ml, μόνη ή σε συνδυασμό με 50μM, 100μM και 500μM UDCA. Τόσο η CHX μεμονωμένα όσο και η ταυτόχρονη επίδραση CHX με UDCA 50μM, 100μM ή 500μM, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-8. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μία δοσοεξαρτώμενη μείωση της δραστηριότητάς της, κατά την παράλληλη αύξηση των συγκεντρώσεων UDCA που χρησιμοποιήθηκαν. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν 8 διαφορετικά πειράματα ± S.E.M. (* $p < 0.05$, *** $P < 0.001$, σε σύγκριση με κύτταρα χωρίς επίδραση)

2.6 Συζήτηση

Η απόπτωση (ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, όπως αλλιώς αποκαλείται) είναι ένας μηχανισμός κυτταρικής αυτοκαταστροφής, που εμπλέκεται σε μία μεγάλη γκάμα βιολογικών φαινομένων. Εκτεταμένη ή ανεπαρκής απόπτωση οδηγεί σε ποικιλία ασθενειών που συσχετίζονται με ισχαιμία, νευροεκφύλιση, αυτοανοσία και ιογενείς λοιμώξεις, αλλά και στην ανάπτυξη και υποτροπή των όγκων (Hengartner and Horvitz, 1994). Αποτελεί μία περίπλοκη διαδικασία που χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση κασπασών, συμπύκνωση χρωματίνης και εκφύλιση DNA με σχηματισμό νουκλεοσωμάτων (Kerr et al., 1972; Samali et al., 1999b; Wyllie et al., 1980). Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες περιέχουσες κυστεΐνες, με ειδικότητα πρωτεολυτική σε κατάλοιπα ασπαρτικού. Ανάλογα με την ειδικότητα των υποστρωμάτων τους, διακρίνονται σε 3 διακριτές ομάδες. Στην ομάδα I (YVADάσες) συμπεριλαμβάνονται οι κασπάσες -1, -4 και -5, που αναμειγνύονται στην παραγωγή κυτταροκινών και στην φλεγμονή. Η ομάδα II (DEVDάσες), όπως οι κασπάσες -3 και -7, είναι οι κύριες εκτελεστικές κασπάσες και ενεργοποιούνται με πρωτεολυτική κατάτμηση από κασπάσες της ομάδας III (IETDάσες) (π.χ. -8, -9 ή -10), νωρίς κατά την έναρξη της απόπτωσης (εναρκτήριοι κασπάσες) (Nicholson and Thornberry, 1997). Μεταξύ των κασπασών, η κασπάση-2 φαίνεται να έχει ξεχωριστό, καθοριστικό ρόλο στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Φαίνεται να συμμετέχει είτε ως εναρκτήριοι είτε ως εκτελεστική κασπάση (Troy and Shelanski, 2003). Τα περισσότερα γεγονότα, αν όχι όλα, που εμφανίζονται κατά την απόπτωση, φαίνεται να απαιτούν ένα πρωτεολυτικό βήμα μεσολαβούμενο από κασπάσες (Samali et al., 1999a).

Υπάρχουν πολλά κυτταρικά μονοπάτια που ενεργοποιούν το μηχανισμό της απόπτωσης, δύο από τα οποία, το εξωκυττάριο και το ενδοκυττάριο, έχουν χαρακτηριστεί καλύτερα (Thornberry and Lazebnik, 1998). Στο εξωκυττάριο μονοπάτι συμμετέχει η TNF-σχετιζόμενη υπεροικογένεια των μεμβρανικών υποδοχέων (όπως ο TNF υποδοχέας, ο CD95/Fas υποδοχέας και ο TRAIL). Οι υποδοχείς θανάτου, TNF receptor-1 (TNFR1) και Fas (CD95) συνδέονται ενδοκυττάρια με συνδεδετικές πρωτεΐνες, οι οποίες στη συνέχεια συνδέονται με κασπάσες και τις ενεργοποιούν (Ashkenazi and Dixit, 1998). Μετά τη σύνδεση του Fas ligand (Fas L) με το Fas ή του TNF με το TNFR1, τροποποιούνται οι υποδοχείς και συνδέονται με τη FADD (Fas-associated death domain) ή την TRADD (TNF-receptor associated death domain), αντίστοιχα. Η FADD συνδέεται με την

προκασπάση-8, η οποία αυτομετατρέπεται σε κασπάση-8 μετά πρωτεολυτική κατάτμηση. Το σύμπλεγμα Fas, FADD και προκασπάση-8 αναφέρεται ως death inducing signal complex (DISC). Αντίστοιχα, η TRADD λειτουργεί ως πλατφόρμα για ανασύνταξη ενός αριθμού μορίων, συμπεριλαμβάνοντας τα FADD, TNFR-associated factor-2 (TRAF2) και τη receptor interacting protein (RIP). Η FADD μπορεί τότε και συνδέεται με την προκασπάση-8 σηματοδοτώντας την απόπτωση. Στον εξωκυττάριο μηχανισμό, ενεργοποιητές των υποδοχέων κυτταρικού θανάτου (CD95, TNF-R κ.ά.) οδηγούν σε άμεση ενεργοποίηση εκτελεστικών κασπασών ή σε ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου μονοπατιού, μέσω μετακίνησης του παράγοντα tBid στα μιτοχόνδρια. Το ενεργοποιημένο από την κασπάση-8 εναπομείναν τμήμα του Bid (truncated Bid, tBid), αναστέλλει την αντιαποπτωτική δράση του Bcl-2, επάγοντας κυτταρικό θάνατο μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού (Budd, 2002;Kim et al., 2000;Li et al., 1998).

Στο ενδοκυττάριο μονοπάτι, κυριαρχεί ο ρόλος του μιτοχονδρίου, ως κυτταρικό οργανίδιο που ρυθμίζεται από τη δράση προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μελών της Bcl-2 υπερικογένειας. Η ελεγχόμενη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια (έλεγχος από το Bcl2) είναι κρίσιμη στην έναρξη και την ενίσχυση του προγράμματος θανάτου (Green and Reed, 1998;Reed et al., 1998). Το κυτόχρωμα c συσχετίζεται μετά με δύο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, τις apaf-1 και προκασπάση-9. Στην παρουσία ATP, δημιουργείται η ενεργός κασπάση-9. Το σύμπλεγμα αυτό, γνωστό ως apoptosome, είναι κάτι ανάλογο του DISC. Η κασπάση-9, τότε, ενεργοποιεί την προκασπάση-3 και την προκασπάση-7, οδηγώντας στην εκτελεστική φάση της απόπτωσης. Η κασπάση-3 μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει την κασπάση-8 και να αυτοενισχύσει τις οδούς σηματοδότησης θανάτου ή μπορεί να διασπάσει το Bcl-2, απομακρύνοντας την προστασία αυτού έναντι της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c και της μεταβολής της μεμβρανικής διαπερατότητας (MPT) (Slee et al., 1999). Τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν, επίσης, στον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από τους death receptors και από εσωτερικές "πυροδοτήσεις", όπως οι τοξίνες και το οξειδωτικό stress (Sun et al., 1999).

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) είναι η πέμπτη συχνότερη κακοήθεια παγκοσμίως και υπολογίζεται ότι προκαλεί περί το μισό εκατομμύριο θανάτους ετησίως (El-Serag, 2002). Υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην επίπτωση του ΗΚΚ ανάλογα με την ηλικία, το φύλο, την φυλή και την γεωγραφική περιοχή, με την ηπατίτιδα C να αποτελεί καθοριστικό

αιτιολογικό για το ήμισυ τουλάχιστον της παρατηρούμενης αύξησης στην επίπτωση του ΗΚΚ (El-Serag, 2007). Το προσδόκιμο επιβίωσης εξακολουθεί να είναι δυσμενές (διάμεσος χρόνος επιβίωσης 8 μήνες) (El-Serag, 2007), ενώ η καλύτερη διαθέσιμη θεραπεία είναι η χειρουργική αφαίρεση.

Καθώς η αυξημένη απόπτωση αποτελεί θεραπευτικό μηχανισμό έναντι των κακοήθων κυττάρων, μελετήσαμε την απόπτωση των HepG2 κυττάρων ΗΚΚ (προερχόμενα από ανθρώπινο ηπατοβλάστωμα) μετά από επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της οκτρεοτίδης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση και στην ενεργοποίηση των κασπασών σε HepG2 κύτταρα ΗΚΚ, ενώ παράλληλα διερευνήθηκε η κυτταρο-ειδική επαγόμενη απόπτωση μετά από επίδραση με UDCA. Μετρήθηκε η δραστηριότητα των κασπάσων -8, -9, -3 και -2, μελετώντας παράλληλα τα αποπτωτικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, ενώ το μοντέλο της TNF- α επαγόμενης απόπτωσης επιλέχθηκε για να συγκριθεί με την επίδραση της οκτρεοτίδης και του UDCA στη βιολογική συμπεριφορά των κασπασών, μετά από τη χορήγησή τους σε HepG2 κύτταρα ΗΚΚ.

2.6.1 Οκτρεοτίδη

Κλινικές μελέτες μη-νευροενδοκρινικών νεοπλασιών έχουν δείξει ότι η οκτρεοτίδη μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη μίας ποικιλίας όγκων, όπως μαστού, στομάχου, παχέος εντέρου και ορθού (Susini and Buscail, 2006). Αυτό το αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα φαίνεται να μεσολαβείται είτε άμεσα, μέσω πρόσδεσης σε υποδοχείς σωματοστατίνης (sstrs) των καρκινικών κυττάρων, είτε έμμεσα, χωρίς την ανάμειξη των συγκεκριμένων υποδοχέων. Μερικοί εκ των έμμεσων αντιπολλαπλασιαστικών μηχανισμών που έχουν προταθεί είναι η καταστολή της σύνθεσης και της έκκρισης παραγόντων ανάπτυξης και ορμονών που καθοδηγούν την ανάπτυξη των όγκων, η αντι-αγγειογόνος επίδραση που μειώνει την αιματική ροή του όγκου και η ανοσορρυθμιστική επιρροή με την εμπλοκή φλεγμονωδών και ανοσολογικών μηχανισμών (Kvols and Woltering, 2006; Susini and Buscail, 2006; Weckbecker et al., 1996).

Η οκτρεοτίδη έχει χρησιμοποιηθεί κλινικά για τη θεραπεία του ΗΚΚ με διαφορεόμενα αποτελέσματα. Τόσο αυξημένη επιβίωση (Kouroumalis et al., 1998; Samonakis et al., 2002) όσο και ουδεμία επίδραση (Becker et al., 2007; Yuen et al., 2002) έχουν προηγουμένως αναφερθεί. Παρά το ότι οι αρνητικές μελέτες έχουν σχολιαστεί εκτενώς (Samonakis et al., 2008), οι μηχανισμοί δράσης της οκτρεοτίδης δεν έχουν διαλευκανθεί επαρκώς. Η απόπτωση φαίνεται να αποτελεί θεμελιώδη μηχανισμό.

Έχει αναφερθεί ότι η οκτρεοτίδη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει απόπτωση σε διάφορες κυτταρικές σειρές ΗΚΚ in vitro (Chen et al., 2001b; Diaconu et al., 1999; Liu et al., 2004; Ma et al., 2008; Raderer et al., 2000; Wang et al., 2001; Xie et al., 2005). Οι μηχανισμοί, όμως, επαγωγής της απόπτωσης δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώσαμε ότι η οκτρεοτίδη σε συγκέντρωση 10^{-8} Μ αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των HepG2 κυττάρων. Η αναστολή αυτή φάνηκε να είναι δόσοεξαρτώμενη έως τη συγκέντρωση των 10^{-8} Μ, όπως έχει παρόμοια περιγραφεί (Liu et al., 2004; Ma et al., 2008; Wang et al., 2001). Παρά ταύτα, υπήρξε μία αρχική αύξηση πολλαπλασιασμού στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις, ενώ στην υψηλότερη συγκέντρωση των 10^{-7} Μ δεν υπήρξε καμία σημαντική επίδραση. Σε αντίθεση με αυτά τα ευρήματα, υπάρχουν αναφορές ότι ο πολλαπλασιασμός κυττάρων ηπατοκυτταρικού καρκινώματος ή ηπατικών στελεχειαίων κυττάρων δεν επηρεάζεται από την οκτρεοτίδη (Reynaert et al., 2005; Reynaert et al., 2004). Στη μελέτη των Reynaert και συνεργατών (Reynaert et al., 2005), χρησιμοποιήθηκαν μικρότερες χρονικές περίοδοι καλλιέργειας, συγκριτικά με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, ενώ η ενεργοποίηση των sst υποδοχέων πραγματοποιήθηκε με ξεχωριστούς συνθετικούς αγωνιστές, οπότε η πιθανή επίδραση μίας συνακόλουθης ενεργοποίησης κάποιου υποδοχέα ίσως να μην έχει συνεκτιμηθεί. Παράλληλα, κλινικές μελέτες έχουν δείξει όφελος στο προσδόκιμο επιβίωσης σε ασθενείς με ανεγχείρητο ΗΚΚ και χορήγηση οκτρεοτίδης (Kouroumalis et al., 1998; Samonakis et al., 2002), ενώ και αρνητικές μελέτες έχουν δημοσιευθεί (Becker et al., 2007; Yuen et al., 2002). Στην παρούσα μελέτη, χαμηλότερες συγκεντρώσεις οκτρεοτίδης φαίνεται να αυξάνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και αυτό ίσως να αποτελεί έναν επιπρόσθετο λόγο για τα αποκλίνοντα αποτελέσματα τόσο σε κλινικές όσο και σε in vitro μελέτες επίδρασης της οκτρεοτίδης στο ΗΚΚ. Τα ευρήματά μας αποτελούν, παράλληλα, ένδειξη ότι μετρήσεις των επιπέδων οκτρεοτίδης στον ορό, τουλάχιστον σε κλινικές μελέτες, ίσως

να αποβούν χρήσιμες για τον έλεγχο και την εξακρίβωση της βέλτιστης θεραπευτικής συγκέντρωσης του φαρμάκου.

Η οκτρεοτίδη προσδένεται κυρίως στους υποδοχείς sst2, sst3 και sst5, με τιμές IC₅₀ 0.4–2.1 nM, 4.4–34.5 nM και 5.6–32 nM, αντίστοιχα (Patel, 1999). Η ταυτοποίηση της παρουσίας των sstr2, sstr3 και sstr5 σε HepG2 κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος τεκμηριώθηκε πρόσφατα (Liu et al., 2004; Notas et al., 2004), ενώ πρόσφατα, επίσης, προτάθηκε μία εκλεκτική έκφραση του sstr3 σε HepG2 κύτταρα σε σύγκριση με ηπατοκύτταρα (κύτταρα L-02). Τα αντιπολλαπλασιαστικά αποτελέσματα της οκτρεοτίδης πιστεύεται ότι μεσολαβούνται δια του sstr2 (Ferjoux et al., 2000) και του sstr5 (Ballare et al., 2001). Ακόμα και στην περίπτωση που δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική πρόσδεση σε sstr2 των κυτταρικών μεμβρανών, είναι πιθανό η οκτρεοτίδη να εσωτερικοποιείται είτε μαζί με τον sstr2 είτε μόνη, όπως αναφέρεται από τους Dournaud και συνεργάτες (Dournaud et al., 1998) και από τους Hornick και συνεργάτες (Hornick et al., 2000), αντίστοιχα. Πρόσφατα, επίσης, προτάθηκε μία απευαισθητοποίηση του sstr2, μετά από σύντομη χρονική περίοδο επώασης κυττάρων HKK με οκτρεοτίδη, που πιθανώς αναστρέφεται μετά από μακρά περίοδο επώασης (Hua et al., 2009). Έχουμε προηγουμένως αναφέρει IC₅₀ 1.25nM για την αντιπολλαπλασιαστική επίδραση της οκτρεοτίδης σε HepG2 κύτταρα (Notas et al., 2004), τιμή που βρίσκεται μεταξύ του εύρους της IC₅₀ για τον sstr2, αλλά είναι χαμηλότερη από την αναφερόμενη IC₅₀ για τον sstr5. Στην περίπτωση του sstr5, είναι πιθανό ότι δεν απαιτείται η ενεργοποίηση του συνόλου των υποδοχέων από τον συνδέτη, για να επιτευχθεί ένα βιολογικό αποτέλεσμα.

Η ανασταλτική επίδραση της οκτρεοτίδης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μπορεί να οφείλεται είτε σε κυτταρική νέκρωση είτε σε κυτταρική απόπτωση. Έχει προταθεί ότι η δια της οκτρεοτίδης μεσολαβούμενη απόπτωση σηματοδοτείται εκλεκτικά μέσω του sstr3 σε CHO-K1 κύτταρα και η έναρξη της απόπτωσης γίνεται με την επαγωγή του wt-p53, ενώ δεν επάγεται αναστολή του κυτταρικού κύκλου (Sharma et al., 1996).

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε το αποπτωτικό αποτέλεσμα της οκτρεοτίδης, ιδιαίτερα σε σχέση με την ενεργοποίηση κασπασών, συγκρίνοντας το αποτέλεσμα αυτό με αυτό της TNF-alpha μεσολαβούμενης απόπτωσης. Ο μηχανισμός της απόπτωσης περιλαμβάνει υποδοχείς κυτταρικού θανάτου, πρωτεΐνες προσαρμογείς και πρωτεολυτικά ένζυμα

(κασπάσες). Οι υποδοχείς κυτταρικού θανάτου ανήκουν στην γονιδιακή υπερικογένεια του tumor necrosis factor υποδοχέα. Το κυτταροπλασματικό τμήμα αυτών των πολυπεπτιδίων περιέχει μία αμινοξική ακολουθία ονομαζόμενη death domain, που προσδένεται σε πρωτεΐνες προσαρμογείς, οι οποίες στη συνέχεια μεταδίδουν το δια του υποδοχέα μεσολαβούμενο σήμα, με πρόσδεση και ενεργοποίηση κασπασών. Μεταξύ των υποδοχέων αυτών, ο TNF receptor-1 (TNFR1) και ο Fas (CD95) είναι οι πιο ευρέως χαρακτηριζόμενοι και εκφράζονται απρόσφορα στο ήπαρ (Karlowitz, 2000a; Liedtke et al., 2002).

Η επίδραση με TNF-alpha αποτελεί ένα επαρκώς μελετημένο μοντέλο επαγωγής απόπτωσης σε ποικιλία κυτταρικών σειρών, με επίδραση σε συγκεκριμένους υποδοχείς. Κάποιες, όμως, κυτταρικές σειρές απαιτούν μεταγραφική αναστολή για την TNF-alpha-επαγόμενη απόπτωση (Leist et al., 1994). Κύτταρα HKK που επώαστηκαν με TNF-alpha και CHX οδηγήθηκαν στην απόπτωση, με τη διαμεσολάβηση της Jun κινάσης (JNK) (Liedtke et al., 2002). Ο TNF-alpha πυροδοτεί διακριτά μονοπάτια στα κύτταρα του ήπατος μέσω του TNF receptor 1 (TNF-R1), με τη διαμεσολάβηση μορίων σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των κασπασών που οδηγούν σε απόπτωση, του nuclear factor-kappa B (NF-kappa B), και της ενεργοποιημένης JNK. Η TNF-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του NF-kappa B επάγει την μεταγραφή αντιαποπτωτικών γονιδίων που καθιστούν τα ηπατοκύτταρα ανθεκτικά έναντι στην TNF-επαγόμενη απόπτωση (Liedtke et al., 2002). Ο TNF-alpha σε συγκέντρωση 20 ng/ml οδήγησε στην απόπτωση κυττάρων HKK in vitro, που ενισχύθηκε από το σύστημα hypoxanthine-xanthine oxidase (HX/XO) και από την CHX, αλλά ελαττώθηκε από την superoxide dismutase (SOD). Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ότι η TNF-alpha-επαγόμενη απόπτωση ίσως να οφείλεται στο οξειδωτικό στρες (Li et al., 2001a). Η ανθρώπινη κυτταρική σειρά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, SMMC-7721, ήταν ανθεκτική στην κυτταροτοξικότητα του TNF-alpha και οδηγήθηκε άμεσα σε απόπτωση με την παρουσία TNF-alpha και CHX (Fang et al., 2001). Σε συμφωνία με αυτή τη μελέτη, η παρούσα μελέτη ανέδειξε τη συγκέντρωση των 20ng/ml TNF-alpha, ως ιδανική για αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και για τη διερεύνηση επαγωγής απόπτωσης.

Τα ευρήματά μας με κυτταρομετρία ροής έδειξαν ότι τόσο η οκτρεοτίδη όσο και ο TNF-alpha επάγουν σε σημαντικό βαθμό τόσο την πρόωμη όσο και την όψιμη απόπτωση HepG2

κυττάρων. Οι μετρήσεις των αποπτωτικών DNA θραυσμάτων έδειξαν, παράλληλα, μη στατιστικά σημαντική επαγωγή απόπτωσης. Αυτό πιθανώς αναδεικνύει την κυτταρομετρία ροής ως πιο ευαίσθητη μέθοδο ποσοτικοποίησης της απόπτωσης.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η οκτρεοτίδη επάγει απόπτωση δεν είναι πλήρως κατανοητός. Αλλαγές στην έκφραση των *sstr* λόγω αρνητικής ρύθμισης ή λόγω πιθανού ετεροδιμερισμού (Ayuk et al., 2002; Kouroumalis et al., 1998) ενός υποδοχέα, με ταυτόχρονες αλλαγές στην έκφραση ρυθμιστικών πρωτεϊνών που απαιτούνται για τη σωστή μεταφορά συγκεκριμένων υποτύπων *sstr*, θα μπορούσαν να επηρεάσουν το άμεσο αντικαρκινικό αποτέλεσμα της οκτρεοτίδης. Αυτό έχειδειχθεί σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες σε κυτταρικές σειρές καρκίνου πνεύμονα, ορθοκολικού καρκίνου και καρκίνου του παγκρέατος και γενικότερα σε μοντέλα που εκφράζουν *sstr2* (Froidevaux and Eberle, 2002; Weckbecker et al., 1993). Διαμέσω του *sstr2*, η οκτρεοτίδη προκαλεί θετική ρύθμιση στους TRAIL, DR4 και TNFR1, και αρνητική στο Bcl-2, οδηγώντας σε απόπτωση (Guillermat et al., 2003). Διαμέσω του *sstr3*, η οκτρεοτίδη προκαλεί θετική ρύθμιση του p53 (Sharma et al., 1996) ή επάγει την Bcl-2-σχετιζόμενη πρωτεΐνη Bax (Sharma et al., 1996; Sharma and Srikant, 1998) και την όξινη ενδονουκλεάση, επάγοντας απόπτωση. Παράλληλα με αυτούς τους μηχανισμούς, στην παρούσα μελέτη αναδείχθηκε μία άμεση επίδραση της οκτρεοτίδης στην ενεργοποίηση κασπασών.

Υπάρχουν λιγιστές αναφορές στην επίδραση της οκτρεοτίδης στην μεσολαβούμενη μέσω κασπασών απόπτωση, ενώ και αυτές περιορίζονται στη διερεύνηση της ενεργοποίησης της κασπάσης-3, ως μίας εκ των εκτελεστικών κασπασών, άρα και ως ένδειξη επαγωγής απόπτωσης. Ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και απόπτωση μετά από επίδραση οκτρεοτίδης, έχει ανιχνευθεί σε κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων πρωτογενούς φαιοχρωμοκυττώματος (Pasquali et al., 2008). Παράλληλα, απόπτωση επαγόμενη από την οκτρεοτίδη έχειδειχθεί σε ανθρώπινα σωματοτρόπα καρκινικά κύτταρα, ενεργοποιώντας τον *sstr2*. Η επίδραση αυτή, σε συνδυασμό με την κυτταροστατική δράση τόσο *sstr2* όσο και *sstr5* αναλόγων, φαίνεται να οδήγησε στη συρρίκνωση του όγκου που παρατηρήθηκε σε ασθενείς με ακρομεγαλία, στους οποίους χορηγήθηκαν ανάλογα σωματοστατίνης μακράς-δράσης (Ferrante et al., 2006). Επίσης, η οκτρεοτίδη έχει συσχετιστεί με αυξημένη έκφραση HO-1 (heme oxygenase-1) και αυξημένη δραστικότητα κασπάσης-3, καθώς και μειωμένη δραστικότητα MPO, ευρήματα που ίσως δικαιολογούν την προστατευτική της δράση

έναντι της προκαλούμενης από ακτινοβολία εντερικής βλάβης (Abbasoglu et al., 2006). Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι η σωματοστατίνη επάγει απόπτωση σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα (Lattuada et al., 2002). Είναι ενδιαφέρον, ακόμα, ότι μειωμένη έκφραση mRNA κασπάσης-3 σε κύτταρα Kupffer είναι ενδεικτική μίας πιθανής ευνοϊκής επίδρασης της οκτρεοτίδης στο ΗΚΚ, μέσω μίας αντιαποπτωτικής επίδρασης στα κύτταρα Kupffer (Xidakis et al., 2004).

Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται ένα αποπτωτικό μονοπάτι μέσω κασπασών, μετά από την επίδραση οκτρεοτίδης σε κύτταρα ΗΚΚ, πιθανώς μεσολαβούμενο από τον sstr3. Αντίθετα από την TNF-alpha μεσολαβούμενη απόπτωση, μετά από την επίδραση οκτρεοτίδης ενεργοποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά τρεις εκ των τεσσάρων κασπασών που μελετήθηκαν. Η ενεργοποίηση όλων των κασπασών ύστερα από επίδραση οκτρεοτίδης, είναι ενδεικτική της ενεργοποίησης ενός αποπτωτικού μονοπατιού, πιθανώς μεσολαβούμενου μέσω μιτοχονδρίων. Αντίθετα, τα ευρήματα από την TNF-alpha μεσολαβούμενη απόπτωση, συνηγορούν υπέρ της πιθανής ενεργοποίησης ενός διαφορετικού μονοπατιού.

Έχει αναφερθεί ότι το TNF-alpha-ενεργοποιούμενο μονοπάτι εμπλέκει την ενεργοποίηση της κασπάσης-8, που προωθεί την περαιτέρω διάσπαση και ενεργοποίηση ποικιλίας downstream κασπάσεων, συμπεριλαμβάνοντας τις κασπάσες -3, -6 και -7. Σε αυτές τις μικρότερες εκτελεστικές κασπάσες ελλείπουν οι αμινοτελικές ομοσυγγενείς περιοχές, όπως οι DDs, DEDs και CARDs (DeLong, 1998), αν και οδηγούν στην αποικοδόμηση ποικιλίας κυτταρικών συστατικών, όπως οι πυρηνικές λαμίνες (Kerr, 1971), οι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες fodrin και gelsolin (Wyllie, 1980) και ο αναστολέας της ενεργοποιούμενης από κασπάσες DNάσης (inhibitor of caspase- activated DNase, ICAD), οδηγώντας έτσι στην ενεργοποίηση της ενεργοποιούμενης από κασπάσες DNάσης και στην αποικοδόμηση του DNA (Alnemri et al., 1996;Orrenius et al., 1989;Zhivotovsky et al., 1997). Η κασπάση-8 μπορεί επίσης να οδηγήσει στην διάσπαση του Bcl-2 ομολόγου Bid, οδηγώντας στην απελευθέρωση του ενεργού τμήματος truncated Bid (tBid). Το tBid στη συνέχεια περιπλέκεται με το Bcl-2 και το αναστέλλει στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, οδηγώντας το κύτταρο στο θάνατο μέσω ενός μονοπατιού μιτοχονδρίων (Budd, 2002;Kim et al., 2000;Li et al., 1998). Παρά τα παραπάνω, η κασπάση-8, η κασπάση-3 και η κασπάση-9 αυξήθηκαν από τον TNF-alpha, αλλά όχι στατιστικά σημαντικά. Παράλληλα, η

δραστηριότητα της κασπάσης-2 αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά από την επίδραση του TNF-alpha, εύρημα το οποίο δεν αναφέρεται προηγουμένως. Το εύρημα αυτό ίσως σχετίζεται με ανεπαρκή διάσπαση του Bid, ώστε όλες οι κασπάσες να ενεργοποιηθούν σημαντικά (Wagner et al., 2004).

Όσον αφορά την επίδραση της οκτρεοτίδης σε κύτταρα HKK, στην παρούσα μελέτη προτείνεται η ενεργοποίηση αποπτωτικού μονοπατιού με τη μεσολάβηση κασπασών, ως αποτέλεσμα sstr3-μεσολαβούμενης δράσης, πιθανώς αυξάνοντας τα επίπεδα του wildtype-p53, χωρίς αναστολή του κυτταρικού κύκλου (G1-arrest, λόγω ενεργοποίησης του p21 cyclin-dependent kinase inhibitor), ή έμμεσα ρυθμίζοντας ενδοκυττάρια γεγονότα, όπως η αναστολή των καναλιών Ca^{++} (μέσω sstr5). Η ενεργοποίηση αντιαποπτωτικών παραγόντων, όπως η MAPK extracellular signal-regulated kinase (ERK), μέσω sstr3, ή Bcl-2 σχετιζόμενων πρωτεϊνών, φαίνεται να καθιστά τα κύτταρα HKK ανθεκτικά στην απόπτωση, αλλά ένας μεταφραστικός αναστολέας ενίσχυσε τα χαρακτηριστικά απόπτωσης, αυξάνοντας την DNA αποικοδόμηση και την ενεργοποίηση των κασπασών -3, -8, -2 και -9. Το αποτέλεσμα αυτό ίσως εξηγείται από αρνητική ρύθμιση του sstr5 και των sstr5-μεσολαβούμενων γεγονότων, οδηγώντας στην επικράτηση της sstr3 ενδοκυττάριας σηματοδότησης, καθώς ο sstr3 είναι ο υποδοχέας που εκφράζεται μόνο σε κύτταρα HKK, συγκριτικά με φυσιολογικά ηπατοκύτταρα (L-O2 κύτταρα).

Η κασπάση-2 αξίζει ιδιαίτερου σχολιασμού. Μεταξύ των κασπασών, η κασπάση-2 φαίνεται να παίζει καθοριστικό και ιδιαίτερο ρόλο στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Troy and Shelanski, 2003). Υπήρξε δυσκολία στην ένταξη της κασπάσης-2 είτε στις εκτελεστικές είτε στις εναρκτήριες κασπάσες. Εμπεριέχει ομόλογες ακολουθίες με τις εναρκτήριες κασπάσες (κασπάση-9 και CED-3), αλλά η ειδικότητα διάσπασης την κατατάσσει κοντίτερα στις εκτελεστικές (κασπάσες-3 και -7). Το κυτταροτοξικό στρες οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-2, η οποία φαίνεται να προωθεί την αύξηση της μιτοχονδριακής διαπερατότητας. Έτσι, τόσο η επαγόμενη από κυτταροκίνες όσο και η επαγόμενη από στρες απόπτωση, δρουν μέσω θεμελιωδών παρόμοιων μονοπατιών, όπου τα μιτοχόνδρια αποτελούν περισσότερο ενισχυτές της δραστηριότητας των κασπασών, παρά εναρκτήριους παράγοντες ενεργοποίησής τους (Lassus et al., 2002). Στην παρούσα μελέτη, η κασπάση-2 φάνηκε να ενεργοποιείται ανεξάρτητα από τη σημαντική (από την οκτρεοτίδη) ή την μη σημαντική (από τον TNF-alpha) ενεργοποίηση του, μέσω

μιτοχονδρίων, μονοπατιού σηματοδότησης. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε ενδοκυττάρια μεταβολές (όπως μεταβολές του ΡΗ ή ύπαρξη στρεσογόνων παραγόντων) είτε σε παλίνδρομη ενεργοποίηση από εκτελεστικές κασπάσες (όπως η κασπάση-3).

Έτσι, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αποτελούν ένδειξη ότι η οκτρεοτίδη οδηγεί τα HepG2 κύτταρα σε απόπτωση, μέσω ενδοκυττάριου μονοπατιού, όπου εμπλέκονται τα μιτοχόνδρια, εμπλέκοντας κατά ακολουθία τις κασπάσες -8, -2, -9 και -3, μολονότι απαιτούνται περαιτέρω πειράματα για να διαλευκανθεί ο ακριβής εναρκτήριο μηχανισμός ενεργοποίησης. Όσον αφορά τον TNF- α , αυτός φαίνεται να επάγει την ενεργοποίηση της κασπάσης-2, πιθανώς μέσω οξειδωτικού στρες, όπως έχει προηγουμένα προταθεί (Lassus et al., 2002). Η μη στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση του εξωκυττάριου αποπτωτικού μονοπατιού (μέσω κασπάσης-8) ή του ενδοκυττάριου αποπτωτικού μονοπατιού (μέσω κασπάσης-9), ίσως λόγω ανεπαρκούς διάσπασης του παράγοντα Bid, αποτελούν την πιθανή αιτία της αντίστασης στην απόπτωση με την επίδραση με TNF- α , που παρατηρήθηκε σε παλαιότερες μελέτες, καθώς και στην παρούσα μελέτη.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν την επαγωγή απόπτωσης σε HepG2 κύτταρα HKK με την επίδραση οκτρεοτίδης, με τη μεσολάβηση κασπασών, εύρημα που ενισχύθηκε με μεταφραστικό αναστολέα (την κυκλοεξιμίδη). Η κυκλοεξιμίδη αύξησε τη δραστηριότητα της κασπάσης-9 στην επαγόμενη από οκτρεοτίδη ή TNF- α απόπτωση, πιθανώς μπλοκάροντας αντιαποπτωτικούς παράγοντες, που φυσιολογικά δεν επιτρέπουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c από τα μιτοχόνδρια και την επακόλουθη ενεργοποίηση της κασπάσης-9. Παράλληλα, φάνηκε ότι και η δραστηριότητα της κασπάσης-2 ενισχύεται μέσω της προκαλούμενης από κυκλοεξιμίδη αναστολής. Παράγοντες που φαίνεται να αναστέλλονται από την κυκλοεξιμίδη, ίσως ενισχύουν διαφορετικά αποπτωτικά μονοπάτια μέσω κασπασών, με την παράλληλη συμμετοχή των μιτοχονδρίων.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν την επαγωγή απόπτωσης από οκτρεοτίδη, σε HepG2 κύτταρα HKK, με τη μεσολάβηση της ενεργοποίησης κασπασών, εμπλέκοντας τόσο το εξωκυττάριο, μέσω υποδοχέα, αποπτωτικό μονοπάτι, όσο και το ενδοκυττάριο, μέσω μιτοχονδρίων. Η συσχέτιση συγκεκριμένων, κασπασο-μεσολαβούμενων μονοπατιών, με την εκάστοτε έκφραση των sst υποδοχέων στα κύτταρα του HKK, απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση, ώστε να διαλευκανθούν

και να καθοριστούν οι ενδοκυττάριοι μηχανισμοί που οδηγούν στην αντι-πολλαπλασιαστική επίδραση της οκτρεοτίδης.

2.6.2 UDCA

Τα χολικά οξέα, συμπεριλαμβανομένου του UDCA, φαίνεται να "χορεύουν" μεταξύ μονοπατιών υποδοχέων κυτταρικού θανάτου και μονοπατιών κυτταρικής επιβίωσης. Η ισορροπία φαίνεται να εξαρτάται από τη δυναμική και την ακρίβεια δράσης των συνεργατών-υποδοχέων κυτταρικού θανάτου και των καταρρακτών των κινασών επιβίωσης (Guicciardi and Gores, 2002). Το ουρσοδεοξυχολικό οξύ (UDCA) χρησιμοποιείται παγκοσμίως για τη θεραπεία της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης και των χρόνιων χολοστατικών ηπατικών παθήσεων. Αποτελεί το βασικό θεραπευτικό μέσο για την αντιμετώπιση της PBC (Kaplan and Gershwin, 2005) και η εκτεταμένη χρήση του έχει πιθανώς αλλάξει τη φυσική εξέλιξη της νόσου (Lee and Kaplan, 2005). Είναι γνωστό ότι σε χολοστατικές καταστάσεις, τα ενδογενή χολικά οξέα συγκρατούνται εντός των ηπατοκυττάρων, οδηγώντας έτσι σε προοδευτική επιδείνωση της ηπατικής λειτουργίας. Τα ευεργετικά αποτελέσματα του UDCA στους δείκτες της ηπατικής λειτουργίας έχουν αποδοθεί στις φυσικοχημικές του ιδιότητες, καθώς είναι εξαιρετικά υδρόφιλο, άρα και μη τοξικό χολικό οξύ για τις βιολογικές μεμβράνες (Attili et al., 1986; Hofmann and Popper, 1987). Φαίνεται να έχει άμεση κυτταροπροστατευτική δράση και διαφορετικοί μοριακοί μηχανισμοί φαίνεται να ευθύνονται, όπως η ρύθμιση κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών και η προστασία των ηπατοκυττάρων έναντι της απόπτωσης (Raumgartner and Beuers, 2002). In vitro δεδομένα έχουν δείξει ότι το UDCA ευνοεί την απόπτωση.

Το UDCA, όπως και άλλα υδρόφοβα και κυτταροτοξικά χολικά οξέα, ενεργοποιούν μερικώς προαποπτωτικούς καταρράκτες, αλλά παράλληλα ενεργοποιούν ισχυρά το MAPK μονοπάτι επιβίωσης (Guicciardi and Gores, 2002). Η επίδραση UDCA σε Huh7 και Fao κύτταρα HKK, αύξησε την έκφραση του Bax στα μιτοχόνδρια και την απελευθέρωση κυτοχρώματος-c στο κυτταρόπλασμα, καθώς και τη δραστικότητα της κασπάσης-3, επάγοντας απόπτωση με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Η ίδια μελέτη αναφέρει ότι η θεραπεία με UDCA ίσως μειώνει την ηπατοκαρκινογένεση, επάγοντας την απόπτωση σε 'initiated hepatocytes', αλλά και αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Oyama et al.,

2002). Ένα νέο παράγωγο του UDCA (HS-1030) ανέστειλε σημαντικά την κυτταρική ανάπτυξη και οδήγησε στην απόπτωση κυττάρων HKK (Park et al., 1997). Επίσης, αναστολή των MAPK και PI3K μονοπατιών επιβίωσης φαίνεται να ενισχύουν την UDCA-επαγόμενη απόπτωση σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα τρωκτικών (Qiao et al., 2002). Πρόσφατα, αναφέρθηκε μία επιλεκτική επαγωγή απόπτωσης κυττάρων HKK HepG2 και BEL7402, μέσω ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και αύξησης του λόγου Bax προς bcl-2, αν και κανένα αποτέλεσμα δεν παρατηρήθηκε σε L-02 φυσιολογικά ηπατοκύτταρα (Liu et al., 2007). Σε κλινική μελέτη της σχετιζόμενης με ηπατίτιδα C κίρρωσης, οι Terao και συνεργάτες (2005) πρότειναν την χορήγηση UDCA ως πιθανό θεραπευτικό μέσο αποφυγής εμφάνισης HKK (Terao et al., 2005).

Παρά ταύτα, η επίδρασή του στην ηπατοκαρκινογένεση και ο ρόλος του στη θεραπεία του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Καθώς η αυξημένη απόπτωση αποτελεί προστατευτικό μηχανισμό έναντι των καρκινικών κυττάρων, μελετήσαμε την απόπτωση των HepG2 κυττάρων, με σκοπό την περαιτέρω διευκρίνιση της κυτταρο-ειδικής επαγωγής απόπτωσης από το UDCA. Διερευνήθηκε η επίδραση του UDCA στην απόπτωση και στην ενεργοποίηση των κασπασών, σε κύτταρα HKK, μόνο ή σε συνδυασμό με TNF-alpha, με ή χωρίς την παρουσία μεταφραστικού αναστολέα. Μετρήθηκε η δραστηριότητα των κασπασών -8, -9, -3 και -2 και τα αντίστοιχα φαινόμενα απόπτωσης, μετά από επίδραση UDCA σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, με σκοπό τη μελέτη συγκεκριμένων κασπασο-εξαρτώμενων μονοπατιών σηματοδότησης. Παράλληλα, έγινε σύγκριση με το επαρκώς μελετημένο μοντέλο της TNF-alpha-μεσολαβούμενης απόπτωσης, όπου ο TNF-alpha αποτελεί γνωστό συνδέτη και ενεργοποιητή του εξωκυττάρου, μέσω υποδοχέα, αποπτωτικού μονοπατιού.

Διερευνήθηκε τόσο η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όσο και η εμφάνιση απόπτωσης, μετά από επίδραση UDCA σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Επίσης διερευνήθηκαν οι μεταβολές στη δραστηριότητα των κασπασών -8 και -9, ως εναρκτήριες κασπάσες δύο διαφορετικών αποπτωτικών μονοπατιών, που μπορεί να αλληλεπιδρούν, του εξωκυττάρου μονοπατιού - μέσω υποδοχέα κυτταρικού θανάτου, και του ενδοκυττάρου ενεργοποιούμενου μονοπατιού - με τη μεσολάβηση των μιτοχονδρίων (Vaux and Strasser, 1996). Μετρήθηκε παράλληλα η δραστηριότητα της κασπάσης-2, ως εναρκτήριας ή εκτελεστικής κασπάσης. Το UDCA χρησιμοποιήθηκε σε ένα εύρος συγκεντρώσεων, με

στόχο να διερευνηθεί η συνολική επίδρασή του στην κυτταρική επιβίωση και στον κυτταρικό θάνατο των HepG2 κυττάρων ΗΚΚ.

Το UDCA σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις προκάλεσε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Από την άποψη ευρημάτων ενδεικτικών απόπτωσης, το αποτέλεσμα αυτό είναι συμβατό με αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην G0/G1 φάση, όπως έχει προηγουμένα προταθεί (Liu et al., 2007), όταν είχαν πάλι χρησιμοποιηθεί υψηλές συγκεντρώσεις UDCA.

Σύμφωνα με την εμπειρία της παρούσας μελέτης, η κυτταρομετρία ροής αποδείχθηκε πιο ευαίσθητη μέθοδος, συγκριτικά με τη μελέτη των αποπτωτικών DNA θραυσμάτων, για την ανίχνευση της επαγωγής απόπτωσης. Το UDCA φάνηκε να επάγει απόπτωση μόνο στη χαμηλή συγκέντρωση των 50μM, κάτι που φάνηκε με τον προσδιορισμό των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής, ενώ με τον προσδιορισμό των αποπτωτικών DNA θραυσμάτων φάνηκε να προκαλείται μία μη στατιστικά σημαντική αύξηση. Το ίδιο επιβεβαιώθηκε στην TNF-alpha και CHX-επαγόμενη απόπτωση, όπου η κυτταρομετρία ροής ανίχνευσε ένα υψηλό ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων, που δεν επαληθεύτηκε από τη μελέτη των αποπτωτικών DNA θραυσμάτων.

Στην ταυτόχρονη επώαση UDCA με, είτε TNF-alpha είτε CHX, η επίδραση με UDCA έδειξε μία διαφορετική και αποκλίνουσα εικόνα μεταξύ της μελέτης των αποπτωτικών DNA θραυσμάτων και της κυτταρομετρικής μελέτης επαγωγής απόπτωσης. Στις ταυτόχρονες επιδράσεις UDCA με TNF-alpha ή CHX, σε όλες τις συγκεντρώσεις UDCA προσδιορίστηκε μεγάλη αύξηση των αποπτωτικών DNA θραυσμάτων. Παρά ταύτα, στην κυτταρομετρία ροής το UDCA φαινομενικά προστάτευσε από την TNF-alpha ή CHX-επαγόμενη απόπτωση με έναν αντίστροφα δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Κοιτώντας τα διαγράμματα της κυτταρομετρίας ροής, είναι προφανές ότι στις συγκεντρώσεις των 50μM και 100μM, υπάρχει σαφής αύξηση των ζώντων κυττάρων (αριστερό κάτω τεταρτημόριο), κάτι που δεν παρατηρείται στη συγκέντρωση των 500μM. Η συγκεκριμένη ανακολουθία μεταξύ των δύο μεθόδων μελέτης της απόπτωσης, υποθέτουμε ότι οφείλεται σε αδυναμία της Annexin-V να προσκολληθεί στην PS, στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, πιθανώς λόγω μίας σταθεροποιητικής επίδρασης του UDCA στην κυτταρική μεμβράνη, μετά από την TNF-alpha ή CHX-επαγόμενη βλάβη (Guldutuna et al.,

1993;Heuman et al., 1996). Αυτό δεν συμβαίνει σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, όπου το νεκρωτικό αποτέλεσμα μπορεί να επικρατεί. Όταν το UDCA χρησιμοποιήθηκε μόνο του, η κυτταρομετρία ροής ήταν πάλι περισσότερη ευαίσθητη από τη μελέτη των αποπτωτικών DNA θραυσμάτων, στην ανίχνευση της αυξημένης απόπτωσης που προκλήθηκε από UDCA συγκέντρωσης 50μM.

Τα αποτελέσματα της μελέτης της δραστηριότητας των κασπασών προσφέρουν μία επιπρόσθετη οπτική γωνία επεξήγησης των αποτελεσμάτων. Το UDCA στη συγκέντρωση των 500μM, αύξησε τη δραστηριότητα και των τεσσάρων μελετηθέντων κασπασών, ενώ στη συγκέντρωση των 100μM, αύξησε στατιστικά σημαντικά τη δραστηριότητα μόνο των κασπάσων -8 and -2. Στη συγκέντρωση των 50μM αύξησε τη δραστηριότητα όλων των κασπάσων, αν και λιγότερο της κασπάσης-9, εύρημα ενδεικτικό της ενεργοποίησης ενός μονοπατιού ανεξάρτητου των μιτοχονδρίων (κασπάση-9-ανεξάρτητο). Παρά ταύτα, η ενεργοποίηση των κασπασών οδήγησε σε απόπτωση μόνο στην περίπτωση της επίδρασης με 50μM UDCA.

Τόσο ο TNF-alpha όσο και η CHX, επίσης αύξησαν τη δραστηριότητα όλων των κασπασών, αλλά πάλι κυτταρική απόπτωση ανιχνεύθηκε μόνο με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, αποτελώντας ένδειξη ότι η μέτρηση της δραστηριότητας των κασπασών (παράλληλα με την κυτταρομετρία ροής) είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος μελέτης της απόπτωσης. Όταν HepG2 κύτταρα επώαστηκαν ταυτόχρονα με UDCA και είτε TNF-alpha είτε CHX, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας όλων των κασπασών. Αντίθετα, όμως, από τη μελέτη της επίδρασης κάθε παράγοντα ξεχωριστά, στη συγκεκριμένη περίπτωση η μελέτη των αποπτωτικών DNA θραυσμάτων αποδείχθηκε πιο ικανή μέθοδος από την κυτταρομετρία ροής, στην ανίχνευση της αυξημένης απόπτωσης.

Η ταυτόχρονη επίδραση με TNF-alpha πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη του εξωκυττάρια ενεργοποιούμενου αποπτωτικού μονοπατιού, που συνήθως εμπλέκει κατά κύριο λόγο τις κασπάσες -8 και -3. Ο TNF-alpha επάγει απόπτωση σε ποικιλία κυτταρικών σειρών μέσω συγκεκριμένων υποδοχέων, ενώ άλλες κυτταρικές σειρές απαιτούν μεταγραφικούς αναστολείς (Leist et al., 1994). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, στην παρούσα μελέτη βρέθηκε μη στατιστικά σημαντική αύξηση όλων των κασπάσων, εκτός της κασπάσης-2,

όταν πραγματοποιήθηκε μεμονωμένη επίδραση με TNF-alpha. Η δραστικότητα της κασπάσης-2, αντίστοιχα, όχι μόνο αυξήθηκε, αλλά αυξήθηκε και στατιστικά σημαντικά.

Στις συνδυασμένες επιδράσεις, στη συγκέντρωση των 500μM πιθανολογείται η ενεργοποίηση αποπτωτικού μονοπατιού που εμπλέκει τη συμμετοχή των μιτοχονδρίων, λόγω της ισχυρής ενεργοποίησης της κασπάσης-9. Στην ενδιάμεση συγκέντρωση των 100μM, το UDCA φαίνεται να προωθεί την απόπτωση κυρίως μέσω της ενεργοποίησης των κασπάσεων -8 και -2 και πιθανώς ανεξάρτητα των μιτοχονδρίων, παρόμοια με την μεμονωμένη επίδραση UDCA, χωρίς την εμπλοκή της κασπάσης-9. Στη χαμηλότερη συγκέντρωση των 50μM, το UDCA φαίνεται να ενεργοποιεί το αποπτωτικό μονοπάτι του TNF-alpha, εμπλέκοντας τις κασπάσες -8 και -3.

Η μεμονωμένη επίδραση με CHX, αύξησε τη δραστικότητα όλων των μελετηθέντων κασπασών, με σύμφωνα ευρήματα και στις δύο μεθόδους ανίχνευσης της επαγωγής απόπτωσης. Αυτό ίσως εξηγείται από μία CHX-επαγόμενη αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης αντιαποπτωτικών παραγόντων. Το εύρημα αυτό χρήζει, προφανώς, περαιτέρω διερεύνησης. Η επίδραση CHX με UDCA στη χαμηλή συγκέντρωση των 50μM, φάνηκε να ευνοεί περισσότερο την δραστικότητα της κασπάσης-8, αποτελώντας ένδειξη ότι το UDCA σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενεργοποιεί το εξωκυττάρια ενεργοποιούμενο αποπτωτικό μονοπάτι. Όταν χρησιμοποιήθηκε UDCA συγκέντρωσης 100μM, η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης φάνηκε να ευνοεί το αποπτωτικό μονοπάτι όπου εμπλέκονται τα μιτοχόνδρια, καθώς παρουσιάστηκε αυξημένη δραστικότητα τόσο της κασπάσης-2 όσο και της κασπάσης-9. Ωστόσο, η δραστικότητα της κασπάσης-3, ως κύρια εκτελεστική κασπάση, φαίνεται να ενεργοποιείται σε παρόμοια επίπεδα με την μεμονωμένη επίδραση CHX, σε συμφωνία με τα κυτταρομετρικά ευρήματα.

Ανεξάρτητα του ενεργοποιούμενου κασπασο-μεσολαβούμενου αποπτωτικού μηχανισμού, οι παρατηρήσεις μας στο φαινόμενο της επαγωγής ή όχι απόπτωσης, μπορούν να εξηγηθούν από μία οξειδωτικά-επαγόμενη απενεργοποίηση των κασπασών σε όψιμη φάση, οδηγώντας τελικά στην κυτταρική νέκρωση (Vaux and Strasser, 1996). Εναλλακτικά, μία αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες, πιθανώς downstream των εκτελεστικών κασπασών, όπως με αναστολείς της απόπτωσης ή ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, θα μπορούσε να

ενισχύει την επαγωγή κυτταρικής νέκρωσης ή κυτταρικής επιβίωσης, παρά την επαγωγή απόπτωσης.

Συμπερασματικά, το UDCA φαίνεται να επάγει απόπτωση σε HepG2 κύτταρα HKK, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, παρά το ότι ενισχύεται η δραστηριότητα των κασπασών, η απόπτωση δεν ανιχνεύθηκε με τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν. Στην πραγματικότητα, επιφανειακά εξεταζόμενα τα αποτελέσματά μας, δείχνουν ότι, υψηλότερες συγκεντρώσεις UDCA φαίνεται να προστατεύουν τα κύτταρα HKK από την επαγωγή απόπτωσης. Επί της παρουσίας TNF- α , υποδεικνύεται μία πιθανή ενεργοποίηση της κασπάσης-2 σε υψηλότερες συγκεντρώσεις UDCA, επαγόμενη από οξειδωτικό στρες, με επακόλουθη ενεργοποίηση των κασπασών -9 και -3. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, το UDCA φαίνεται να ενισχύει το μιτοχόνδρια-ανεξάρτητο μονοπάτι του TNF- α , με τη συμμετοχή των κασπασών -8 και -3. Η παρουσία μεταφραστικού αναστολέα φαίνεται να εμπλέκει το εξωκυττάρια ενεργοποιούμενο αποπτωτικό μονοπάτι, σε χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις UDCA, και το μιτοχονδριακό μονοπάτι σε ενδιάμεσες συγκεντρώσεις.

Τα αποτελέσματά μας προσφέρουν μία εξήγηση για τα φαινομενικά αντιφατικά αποτελέσματα που προκύπτουν από την έως σήμερα υπάρχουσα βιβλιογραφία. Οι ευεργετικές επιδράσεις του UDCA στην PBC, που έχουν αποδοθεί στη μειωμένη απόπτωση των χολαγγειοκυττάρων (Que et al., 1999), ίσως στην πραγματικότητα είναι το αποτέλεσμα της προστασίας από αυξημένη απόπτωση, προκαλούμενης από εξωγενείς παράγοντες (όπως ο TNF- α), δρώντες επί των χολαγγειοκυττάρων. Από την άλλη μεριά, η αυξημένη απόπτωση που προκαλείται από χαμηλές συγκεντρώσεις UDCA, ίσως επεξηγεί αυτόματα το προστατευτικό αποτέλεσμα από το HKK (Tarao et al., 2005) και πιθανώς από τον καρκίνο του παχέος εντέρου, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένα από άλλους (Cheng et al., 1999). Επί τη βάση των δεδομένων αυτών, φαίνεται να αποτελεί θέμα υψίστης σημασίας ο προσδιορισμός της δοσολογίας του UDCA (και των επακόλουθων επιπέδων του στον ορό), ανάλογα με την επιθυμητή χρήση και δράση του φαρμάκου.

3. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) είναι η πέμπτη συχνότερη κακοήθεια παγκοσμίως και υπολογίζεται ότι προκαλεί περί το μισό εκατομμύριο θανάτους ετησίως. Η οκτρεοτίδη, ένα συνθετικό ανάλογο σωματοστατίνης, έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ανεγχείρητου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει βελτίωση στο προσδόκιμο επιβίωσης ασθενών με ανεγχείρητο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα που θεραπεύθηκαν με οκτρεοτίδη, αλλά έχουν δημοσιευθεί και αρνητικές μελέτες, οι οποίες και έχουν πρόσφατα σχολιαστεί. Σειρά μελετών έχει δείξει, ακόμα, ότι η οκτρεοτίδη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει απόπτωση σε κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος *in vitro*. Οι μηχανισμοί, ωστόσο, επαγωγής της απόπτωσης δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Παράλληλα, κλινικές παρατηρήσεις έχουν δείξει ότι το ουρσοδεοξυχολικό οξύ (UDCA) ίσως προστατεύει από την εμφάνιση ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε κίρρωτους ασθενείς. Η αυξημένη απόπτωση των καρκινικών κυττάρων αποτελεί έναν υποψήφιο μηχανισμό. Η μειωμένη απόπτωση των χολαγγειοκυττάρων έχει προταθεί ως πιθανός μηχανισμός για το ευεργετικό αποτέλεσμα του UDCA στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση.

Σκοπός: 1) Η διερεύνηση του ρόλου της οκτρεοτίδης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση και στην ενεργοποίηση κασπασών HepG2 κυττάρων ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. 2) Η διερεύνηση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων UDCA σε HepG2 κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, όσον αφορά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους, την απόπτωση και την ενεργοποίηση κασπασών.

Μεθοδολογία: Μελετήθηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η εμφάνιση απόπτωσης και η δραστηριότητα των κασπασών μετά από επίδραση οκτρεοτίδης σε HepG2 κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, σε σύγκριση με την επαγόμενη από TNF- α απόπτωση. Παράλληλα, στα ίδια κύτταρα μελετήθηκε η απόπτωση και η δραστηριότητα των κασπασών, μετά από επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων UDCA, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με TNF- α . Οι κασπάσες, των οποίων η δραστηριότητα μετρήθηκε, ήταν οι κασπάσες -3, -9, -8 και -2, ενώ η απόπτωση μελετήθηκε με την ανίχνευση των αποπτωτικών νουκλεοσωμάτων, μετά από τον DNA κατακερματισμό (DNA

fragmentation), καθώς και των αποπτωτικών κυττάρων, με την κυτταρομετρική μεθοδολογία χρήσης του συνδυασμού Annexin-V/PI.

Αποτελέσματα: Μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε τόσο με την επίδραση της οκτρεοτίδης όσο και με την επίδραση του TNF-alpha. Παρά ταύτα, αντίθετα με την δοσοεξαρτώμενη αναστολή που προκλήθηκε από τον TNF-alpha, η οκτρεοτίδη μείωσε σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μόνο στη συγκέντρωση 10^{-8} M. Η πρόιμη και η όψιμη απόπτωση αυξήθηκαν σημαντικά και με τους δύο παράγοντες, όπως παρατηρήθηκε στην κυτταρομετρία ροής. Η οκτρεοτίδη αύξησε σημαντικά τη δραστικότητα των κασπασών -3, -8 και -2. Ο TNF-alpha αύξησε σημαντικά μόνο τη δραστικότητα της κασπάσης-2. Το UDCA μείωσε σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση της απόπτωσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις και προστασία από την απόπτωση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Η TNF-alpha επαγόμενη αντίχνευση αποπτωτικών DNA θραυσμάτων ενισχύθηκε από το UDCA. Η κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι στην TNF-alpha επαγόμενη πρόιμη απόπτωση, το UDCA δρα προστατευτικά, καθώς αύξησε την κυτταρική επιβίωση σε ενδιάμεσες και χαμηλές συγκεντρώσεις. Διαφοροποιήσεις στη δραστικότητα των εναρκτήριων και εκτελεστικών κασπασών παρατηρήθηκαν, ανάλογα με τη συγκέντρωση UDCA που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά.

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν την επαγωγή ενός κασπασο-μεσολαβούμενου αποπτωτικού μονοπατιού από την επίδραση οκτρεοτίδης σε HepG2 κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, εμπλέκοντας τόσο το από υποδοχέα-μεσολαβούμενο εξωκυττάριο αποπτωτικό μονοπάτι, όσο και το μιτοχονδριακά-μεσολαβούμενο ενδοκυττάριο. Περαιτέρω διερεύνηση απαιτείται όσον αφορά την συσχέτιση συγκεκριμένων κασπασο-μεσολαβούμενων αποπτωτικών μονοπατιών, με την έκφραση των sst υποδοχέων στα κύτταρα του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, με σκοπό την διαλεύκανση και τον προσδιορισμό των ενδοκυττάρων μηχανισμών της ανασταλτικής δράσης της οκτρεοτίδης. Επίσης, τα αποτελέσματά μας αποτελούν ένδειξη ότι ίσως να είναι απαραίτητη η μέτρηση των επιπέδων οκτρεοτίδης στον ορό, τουλάχιστον στις κλινικές μελέτες, για τη βελτιστοποίηση των θεραπευτικών δόσεων του φαρμάκου. Παράλληλα, τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η ενεργοποίηση των κασπασών και η επαγωγή απόπτωσης, μετά από επίδραση UDCA σε HepG2 κύτταρα

ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, είναι δοδο-εξαρτώμενη, καθώς επίσης ότι η ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών δεν ισοδυναμεί πάντοτε με αυξημένη απόπτωση. Θα έπρεπε ίσως να παρακολουθούνται τα επίπεδα UDCA στον ορό, με σκοπό την εκάστοτε ρύθμιση της δοσολογίας του φαρμάκου, ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα.

SUMMARY

Background: Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common malignancy in the world and is estimated to cause approximately half a million deaths annually. Octreotide, a somatostatin analogue, has been used to treat inoperable hepatocellular carcinoma. Clinical trials have demonstrated a survival benefit of patients with inoperable HCC treated with octreotide, but also negative studies have been published and recently criticized. Several reports indicate, also, that octreotide inhibits the proliferation and induces apoptosis of HCC cells in vitro. The mechanisms of apoptosis induction however are not well understood. Moreover, clinical observations suggest that ursodeoxycholate (UDCA) may protect from hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. Increased apoptosis of malignant cells is a candidate mechanism. Decreased apoptosis of cholangiocytes has been proposed as a mechanism for the favourable effect of UDCA in primary biliary cirrhosis.

Aims: 1) To investigate the role of octreotide on cellular proliferation, apoptosis and caspases activities of HepG2 carcinoma cells. 2) To investigate the effects of different concentrations of UDCA on HepG2 cell proliferation, apoptosis and caspases activities.

Methods: We studied the occurrence of cellular proliferation, apoptosis and the possible internal caspase-mediated apoptosis pathway involved, after treatment of HepG2 carcinoma cells with octreotide, in comparison with the apoptosis caused by TNF-alpha. We, also, studied the apoptotic features and the caspases activities, after treatment of HepG2 cells with different concentrations of UDCA alone or in combination with TNF-alpha. Activities of caspase-3, caspase-9, caspase-8 and caspase-2 were studied, while apoptosis was investigated through detection of DNA fragmentation and through identification of apoptotic cells with the Annexin-V/PI flow cytometric method.

Results: Cellular proliferation was decreased, after treatment of HepG2 cells with octreotide or TNF-alpha alone but, in contrast to TNF-alpha, octreotide decreased proliferation only at concentration of 10⁻⁸M, while lower concentrations increased

proliferation. Early and late apoptosis were significantly increased with both substances. Octreotide significantly increased caspase-3, caspase-8 and caspase-2 activity. TNF-alpha significantly increased only caspase-2. UDCA significantly inhibits cell proliferation only at high concentrations, but increases apoptosis at low concentrations and protects from apoptosis at higher concentrations. TNF-alpha induced DNA fragmentation is potentiated by UDCA, but flow cytometry indicates protection from early apoptosis and increase in cell survival by low and intermediate UDCA concentrations. UDCA differentially activates initiator and effector caspases in different concentrations.

Conclusions: Our results support the induction of a caspase-mediated apoptotic pathway by octreotide in hepatocellular carcinoma cells, implicating both the receptor-mediated and the mitochondrial-apoptotic pathway. The correlation of specific apoptotic, caspase-mediated pathways, with the expression of sst receptors in HCC cells, need more investigation, to better define and clarify the intracellular mechanisms of the antiproliferative effects of octreotide. Also, our findings indicate that measurements of serum octreotide levels may be important, at least in clinical trials, to verify optimal therapeutic drug concentrations. Moreover, our data demonstrate that the effect of UDCA on caspase activation and apoptosis of HepG2 cells is concentration-dependent and activation of the caspase cascade is not always translated into increased apoptosis. Serum levels of UDCA should be possibly monitored and dosage of the drug adjusted according to the required effect.

2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

References Cited

- Abbasoglu, S. D., Y. Erbil, T. Eren, M. Giris, U. Barbaros, R. Yucel, V. Olgac, M. Uysal, and G. Toker, 2006, The effect of heme oxygenase-1 induction by octreotide on radiation enteritis: *Peptides*, v. 27, no. 6, p. 1570-1576.
- Acehan, D., X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang, and C. W. Akey, 2002, Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation: *Mol.Cell*, v. 9, no. 2, p. 423-432.
- Adams, J. M., 2003, Ways of dying: multiple pathways to apoptosis: *Genes Dev.*, v. 17, no. 20, p. 2481-2495.
- Adams, J. M., and S. Cory, 2001, Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family: *Trends Biochem.Sci.*, v. 26, no. 1, p. 61-66.
- Adams, R. L., I. P. Adams, S. W. Lindow, and S. L. Atkin, 2004, Inhibition of endothelial proliferation by the somatostatin analogue SOM230: *Clin.Endocrinol.(Oxf)*, v. 61, no. 4, p. 431-436.
- Adams, R. L., I. P. Adams, S. W. Lindow, W. Zhong, and S. L. Atkin, 2005, Somatostatin receptors 2 and 5 are preferentially expressed in proliferating endothelium: *Br.J.Cancer*, v. 92, no. 8, p. 1493-1498.
- Adnane, J., Z. Shao, and P. D. Robbins, 1995, The retinoblastoma susceptibility gene product represses transcription when directly bound to the promoter: *J.Biol.Chem.*, v. 270, no. 15, p. 8837-8843.
- Akare, S., S. Jean-Louis, W. Chen, D. J. Wood, A. A. Powell, and J. D. Martinez, 2006, Ursodeoxycholic acid modulates histone acetylation and induces differentiation and senescence: *Int.J.Cancer*, v. 119, no. 12, p. 2958-2969.
- Akazawa, Y., and G. J. Gores, 2007, Death receptor-mediated liver injury: *Semin.Liver Dis.*, v. 27, no. 4, p. 327-338.
- Alderson, M. R. et al., 1995, Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes: *J.Exp.Med.*, v. 181, no. 1, p. 71-77.
- Allavena, P., A. Sica, G. Solinas, C. Porta, and A. Mantovani, 2008, The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages: *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, v. 66, no. 1, p. 1-9.
- Allet, B., A. Hochmann, I. Martinou, A. Berger, M. Missotten, B. Antonsson, R. Sadoul, J. C. Martinou, and L. Bernasconi, 1996, Dissecting processing and apoptotic activity of a cysteine protease by mutant analysis: *J.Cell Biol.*, v. 135, no. 2, p. 479-486.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong, and J. Yuan, 1996, Human ICE/CED-3 protease nomenclature: *Cell*, v. 87, no. 2, p. 171.

Angulo, P., R. A. Jorgensen, J. C. Keach, E. R. Dickson, C. Smith, and K. D. Lindor, 2000, Oral budesonide in the treatment of patients with primary biliary cirrhosis with a suboptimal response to ursodeoxycholic acid: *Hepatology*, v. 31, no. 2, p. 318-323.

Aparicio, T., M. Ducreux, E. Baudin, J. C. Sabourin, B. T. De, E. Mitry, M. Schlumberger, and P. Rougier, 2001, Antitumour activity of somatostatin analogues in progressive metastatic neuroendocrine tumours: *Eur.J.Cancer*, v. 37, no. 8, p. 1014-1019.

Arafat, W. O. et al., 2000, An adenovirus encoding proapoptotic Bax induces apoptosis and enhances the radiation effect in human ovarian cancer: *Mol.Ther.*, v. 1, no. 6, p. 545-554.

Arena, S., A. Pattarozzi, A. Corsaro, G. Schettini, and T. Florio, 2005, Somatostatin receptor subtype-dependent regulation of nitric oxide release: involvement of different intracellular pathways: *Mol.Endocrinol.*, v. 19, no. 1, p. 255-267.

Arima, N., C. Y. Kao, T. Licht, R. Padmanabhan, Y. Sasaguri, and R. Padmanabhan, 2001, Modulation of cell growth by the hepatitis C virus nonstructural protein NS5A: *J.Biol.Chem.*, v. 276, no. 16, p. 12675-12684.

Arsura, M., and L. G. Cavin, 2005, Nuclear factor-kappaB and liver carcinogenesis: *Cancer Lett.*, v. 229, no. 2, p. 157-169.

Ashhab, Y., A. Alian, A. Polliack, A. Panet, and Y. D. Ben, 2001, Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern: *FEBS Lett.*, v. 495, no. 1-2, p. 56-60.

Ashkenazi, A., 2008, Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists: *Nat.Rev.Drug Discov.*, v. 7, no. 12, p. 1001-1012.

Ashkenazi, A., and V. M. Dixit, 1998, Death receptors: signaling and modulation: *Science*, v. 281, no. 5381, p. 1305-1308.

Askew, D. S., R. A. Ashmun, B. C. Simmons, and J. L. Cleveland, 1991, Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis: *Oncogene*, v. 6, no. 10, p. 1915-1922.

Attili, A. F., M. Angelico, A. Cantafora, D. Alvaro, and L. Capocaccia, 1986, Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids: *Med.Hypotheses*, v. 19, no. 1, p. 57-69.

Ayuk, J., S. E. Stewart, P. M. Stewart, and M. C. Sheppard, 2002, Long-term safety and efficacy of depot long-acting somatostatin analogs for the treatment of acromegaly: *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 87, no. 9, p. 4142-4146.

Azzaroli, F., W. Mehal, C. J. Soroka, L. Wang, J. Lee, N. Crispe, and J. L. Boyer, 2002, Ursodeoxycholic acid diminishes Fas-ligand-induced apoptosis in mouse hepatocytes: *Hepatology*, v. 36, no. 1, p. 49-54.

Bai, J., and A. I. Cederbaum, 2000, Overexpression of catalase in the mitochondrial or cytosolic compartment increases sensitivity of HepG2 cells to tumor necrosis factor- α -induced apoptosis: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 25, p. 19241-19249.

Baliga, B., and S. Kumar, 2003, Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow?: *Cell Death.Differ.*, v. 10, no. 1, p. 16-18.

Baliga, B. C., S. H. Read, and S. Kumar, 2004, The biochemical mechanism of caspase-2 activation: *Cell Death.Differ.*, v. 11, no. 11, p. 1234-1241.

Ballare, E. et al., 2001, Mutation of somatostatin receptor type 5 in an acromegalic patient resistant to somatostatin analog treatment: *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 86, no. 8, p. 3809-3814.

Bao, Q., and Y. Shi, 2007, Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases: *Cell Death.Differ.*, v. 14, no. 1, p. 56-65.

Barrie, R., E. A. Woltering, H. Hajarizadeh, C. Mueller, T. Ure, and W. S. Fletcher, 1993, Inhibition of angiogenesis by somatostatin and somatostatin-like compounds is structurally dependent: *J.Surg.Res.*, v. 55, no. 4, p. 446-450.

Bartlett, D. L., S. L. Charland, and M. H. Torosian, 1995, Reversal of tumor-associated hyperglucagonemia as treatment for cancer cachexia: *Surgery*, v. 118, no. 1, p. 87-97.

Basso, E., L. Fante, J. Fowlkes, V. Petronilli, M. A. Forte, and P. Bernardi, 2005, Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D: *J.Biol.Chem.*, v. 280, no. 19, p. 18558-18561.

Battezzati, P. M., M. Zuin, A. Crosignani, M. Allocca, P. Invernizzi, C. Selmi, E. Villa, and M. Podda, 2001, Ten-year combination treatment with colchicine and ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis: a double-blind, placebo-controlled trial on symptomatic patients: *Aliment.Pharmacol.Ther.*, v. 15, no. 9, p. 1427-1434.

Becker, G., H. P. Allgaier, M. Olschewski, A. Zahringer, and H. E. Blum, 2007, Long-acting octreotide versus placebo for treatment of advanced HCC: a randomized controlled double-blind study: *Hepatology*, v. 45, no. 1, p. 9-15.

Beerheide, W., Y. J. Tan, E. Teng, A. E. Ting, A. Jedpiyawongse, and P. Srivatanakul, 2000, Downregulation of proapoptotic proteins Bax and Bcl-X(S) in p53 overexpressing hepatocellular carcinomas: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 273, no. 1, p. 54-61.

Beg, A. A., and D. Baltimore, 1996, An essential role for NF-kappaB in preventing TNF- α -induced cell death: *Science*, v. 274, no. 5288, p. 782-784.

Ben-Shlomo, A., and S. Melmed, 2003, Clinical review 154: The role of pharmacotherapy in perioperative management of patients with acromegaly: *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 88, no. 3, p. 963-968.

Benali, N. et al., 2000, Inhibition of growth and metastatic progression of pancreatic carcinoma in hamster after somatostatin receptor subtype 2 (sst2) gene expression and administration of cytotoxic somatostatin analog AN-238: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 97, no. 16, p. 9180-9185.

Benz, C., S. Angermuller, U. Tox, P. Kloters-Plachky, H. D. Riedel, P. Sauer, W. Stremmel, and A. Stiehl, 1998, Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile-acid-induced apoptosis and cytolysis in rat hepatocytes: J.Hepatol., v. 28, no. 1, p. 99-106.

Bereiter-Hahn, J., and M. Voth, 1994, Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria: Microsc.Res.Tech., v. 27, no. 3, p. 198-219.

Bergamini, A. et al., 1997, Bile acids with differing hydrophilic-hydrophobic properties do not influence cytokine production by human monocytes and murine Kupffer cells: Hepatology, v. 25, no. 4, p. 927-933.

Bergeron, L. et al., 1998, Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice: Genes Dev., v. 12, no. 9, p. 1304-1314.

Berridge, M. J., P. Lipp, and M. D. Bootman, 2000, The versatility and universality of calcium signalling: Nat.Rev.Mol.Cell Biol., v. 1, no. 1, p. 11-21.

Beuers, U., M. Bilzer, A. Chittattu, G. A. Kullak-Ublick, D. Keppler, G. Paumgartner, and F. Dombrowski, 2001, Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver: Hepatology, v. 33, no. 5, p. 1206-1216.

Beuers, U., J. L. Boyer, and G. Paumgartner, 1998, Ursodeoxycholic acid in cholestasis: potential mechanisms of action and therapeutic applications: Hepatology, v. 28, no. 6, p. 1449-1453.

Beuers, U., M. H. Nathanson, C. M. Isales, and J. L. Boyer, 1993, Tauroursodeoxycholic acid stimulates hepatocellular exocytosis and mobilizes extracellular Ca⁺⁺ mechanisms defective in cholestasis: J.Clin.Invest, v. 92, no. 6, p. 2984-2993.

Beuers, U. et al., 1992, Ursodeoxycholic acid for treatment of primary sclerosing cholangitis: a placebo-controlled trial: Hepatology, v. 16, no. 3, p. 707-714.

Beuers, U. et al., 1996, Tauroursodeoxycholic acid activates protein kinase C in isolated rat hepatocytes: Gastroenterology, v. 110, no. 5, p. 1553-1563.

Beutler, B., and A. Cerami, 1986, Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin: Nature, v. 320, no. 6063, p. 584-588.

Bhathena, S. J., J. Louie, G. P. Schechter, R. S. Redman, L. Wahl, and L. Recant, 1981, Identification of human mononuclear leukocytes bearing receptors for somatostatin and glucagon: Diabetes, v. 30, no. 2, p. 127-131.

Blaker, M., M. Schmitz, A. Gocht, S. Burghardt, M. Schulz, D. C. Broring, A. Pace, H. Greten, and W. A. De, 2004, Differential expression of somatostatin receptor subtypes in hepatocellular carcinomas: J.Hepatol., v. 41, no. 1, p. 112-118.

Blanchard, H., L. Kodandapani, P. R. Mittl, S. D. Marco, J. F. Krebs, J. C. Wu, K. J. Tomaselli, and M. G. Grutter, 1999, The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis: Structure., v. 7, no. 9, p. 1125-1133.

Boatright, K. M. et al., 2003, A unified model for apical caspase activation: Mol.Cell, v. 11, no. 2, p. 529-541.

Boldin, M. P., E. E. Varfolomeev, Z. Pancer, I. L. Mett, J. H. Camonis, and D. Wallach, 1995, A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain: J.Biol.Chem., v. 270, no. 14, p. 7795-7798.

Bonfoco, E., E. Li, F. Kolbinger, and N. R. Cooper, 2001, Characterization of a novel proapoptotic caspase-2- and caspase-9-binding protein: J.Biol.Chem., v. 276, no. 31, p. 29242-29250.

Bonni, A., A. Brunet, A. E. West, S. R. Datta, M. A. Takasu, and M. E. Greenberg, 1999, Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms: Science, v. 286, no. 5443, p. 1358-1362.

Bosch, F. X., J. Ribes, M. Diaz, and R. Cleries, 2004, Primary liver cancer: worldwide incidence and trends: Gastroenterology, v. 127, no. 5 Suppl 1, p. S5-S16.

Bossy-Wetzell, E., and D. R. Green, 1999, Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors: J.Biol.Chem., v. 274, no. 25, p. 17484-17490.

Bouchard, C., P. Staller, and M. Eilers, 1998, Control of cell proliferation by Myc: Trends Cell Biol., v. 8, no. 5, p. 202-206.

Bousquet, C., J. Guillermet, F. Vernejoul, H. Lahlou, L. Buscail, and C. Susini, 2004, Somatostatin receptors and regulation of cell proliferation: Dig.Liver Dis., v. 36 Suppl 1, p. S2-S7.

Bousquet, C., E. Puente, L. Buscail, N. Vaysse, and C. Susini, 2001, Antiproliferative effect of somatostatin and analogs: Chemotherapy, v. 47 Suppl 2, p. 30-39.

Boxer, L. M., and C. V. Dang, 2001, Translocations involving c-myc and c-myc function: Oncogene, v. 20, no. 40, p. 5595-5610.

Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: Anal.Biochem., v. 72, p. 248-254.

Branda, M., and J. R. Wands, 2006, Signal transduction cascades and hepatitis B and C related hepatocellular carcinoma: Hepatology, v. 43, no. 5, p. 891-902.

- Breckenridge, D. G., M. Stojanovic, R. C. Marcellus, and G. C. Shore, 2003, Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol: *J.Cell Biol.*, v. 160, no. 7, p. 1115-1127.
- Breuhahn, K., T. Longrich, and P. Schirmacher, 2006, Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma: *Oncogene*, v. 25, no. 27, p. 3787-3800.
- Bruno, J. F., Y. Xu, and M. Berelowitz, 1994, Somatostatin regulates somatostatin receptor subtype mRNA expression in GH3 cells: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 202, no. 3, p. 1738-1743.
- Bruns, C., I. Lewis, U. Briner, G. Meno-Tetang, and G. Weckbecker, 2002, **SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile:** *Eur.J.Endocrinol.*, v. 146, no. 5, p. 707-716.
- Bruns, C., F. Raulf, D. Hoyer, J. Schloos, H. Lubbert, and G. Weckbecker, 1996, Binding properties of somatostatin receptor subtypes: *Metabolism*, v. 45, no. 8 Suppl 1, p. 17-20.
- Buckbinder, L., and R. P. Robinson, 2002, The glucocorticoid receptor: molecular mechanism and new therapeutic opportunities: *Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy*, v. 1, no. 2, p. 127-136.
- Budd, R. C., 2002, Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis: *J.Clin.Invest*, v. 109, no. 4, p. 437-441.
- Bump, N. J. et al., 1995, Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35: *Science*, v. 269, no. 5232, p. 1885-1888.
- Burroughs, A., D. Hochhauser, and T. Meyer, 2004, Systemic treatment and liver transplantation for hepatocellular carcinoma: two ends of the therapeutic spectrum: *Lancet Oncol.*, v. 5, no. 7, p. 409-418.
- Buscail, L. et al., 1996, Loss of sst2 somatostatin receptor gene expression in human pancreatic and colorectal cancer: *Cancer Res.*, v. 56, no. 8, p. 1823-1827.
- Butt, A. J., N. L. Harvey, G. Parasivam, and S. Kumar, 1998, Dimerization and autoprocessing of the Nedd2 (caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxyl-terminal regions: *J.Biol.Chem.*, v. 273, no. 12, p. 6763-6768.
- Cai, J., J. Yang, and D. P. Jones, 1998, Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1366, no. 1-2, p. 139-149.
- Caja, L., C. Ortiz, E. Bertran, M. M. Murillo, M. J. Miro-Obradors, E. Palacios, and I. Fabregat, 2007, Differential intracellular signalling induced by TGF-beta in rat adult hepatocytes and hepatoma cells: implications in liver carcinogenesis: *Cell Signal.*, v. 19, no. 4, p. 683-694.

Calmus, Y., P. Gane, P. Rouger, and R. Poupon, 1990, Hepatic expression of class I and class II major histocompatibility complex molecules in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid: *Hepatology*, v. 11, no. 1, p. 12-15.

Carr, B. I., I. Hayashi, E. L. Branum, and H. L. Moses, 1986, Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type beta transforming growth factor: *Cancer Res.*, v. 46, no. 5, p. 2330-2334.

Cattaneo, M. G., J. E. Taylor, M. D. Culler, E. Nisoli, and L. M. Vicentini, 2000, Selective stimulation of somatostatin receptor subtypes: differential effects on Ras/MAP kinase pathway and cell proliferation in human neuroblastoma cells: *FEBS Lett.*, v. 481, no. 3, p. 271-276.

Cereghetti, G. M., and L. Scorrano, 2006, The many shapes of mitochondrial death: *Oncogene*, v. 25, no. 34, p. 4717-4724.

Certo, M., G. M. Del, V, M. Nishino, G. Wei, S. Korsmeyer, S. A. Armstrong, and A. Letai, 2006, Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members: *Cancer Cell*, v. 9, no. 5, p. 351-365.

Cerveny, K. L., Y. Tamura, Z. Zhang, R. E. Jensen, and H. Sesaki, 2007, Regulation of mitochondrial fusion and division: *Trends Cell Biol.*, v. 17, no. 11, p. 563-569.

Chai, J., E. Shiozaki, S. M. Srinivasula, Q. Wu, P. Datta, E. S. Alnemri, and Y. Shi, 2001a, Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP: *Cell*, v. 104, no. 5, p. 769-780.

Chai, J., Q. Wu, E. Shiozaki, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, and Y. Shi, 2001b, Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding: *Cell*, v. 107, no. 3, p. 399-407.

Chan, B. C. et al., 2008, BRE is an antiapoptotic protein in vivo and overexpressed in human hepatocellular carcinoma: *Oncogene*, v. 27, no. 9, p. 1208-1217.

Chan, D. C., 2006a, Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development: *Cell*, v. 125, no. 7, p. 1241-1252.

Chan, D. C., 2006b, Mitochondrial fusion and fission in mammals: *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, v. 22, p. 79-99.

Chang, D. W., Z. Xing, V. L. Capacio, M. E. Peter, and X. Yang, 2003, Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation: *EMBO J.*, v. 22, no. 16, p. 4132-4142.

Chang, D. W., Z. Xing, Y. Pan, A. Algeciras-Schimmich, B. C. Barnhart, S. Yaish-Ohad, M. E. Peter, and X. Yang, 2002, c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis: *EMBO J.*, v. 21, no. 14, p. 3704-3714.

Chawla, A., J. J. Repa, R. M. Evans, and D. J. Mangelsdorf, 2001, Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files: *Science*, v. 294, no. 5548, p. 1866-1870.

Chen, G. G., P. B. Lai, P. K. Chan, E. C. Chak, J. H. Yip, R. L. Ho, B. C. Leung, and W. Y. Lau, 2001a, Decreased expression of Bid in human hepatocellular carcinoma is related to hepatitis B virus X protein: *Eur.J.Cancer*, v. 37, no. 13, p. 1695-1702.

Chen, X., Z. Liu, and Z. Ai, 2001b, Antineoplastic mechanism of Octreotide action in human hepatoma: *Chin Med.J.(Engl.)*, v. 114, no. 11, p. 1167-1170.

Chen, X. P., S. Q. He, H. P. Wang, Y. Z. Zhao, and W. G. Zhang, 2003, Expression of TNF-related apoptosis-inducing Ligand receptors and antitumor tumor effects of TNF-related apoptosis-inducing Ligand in human hepatocellular carcinoma: *World J.Gastroenterol.*, v. 9, no. 11, p. 2433-2440.

Cheng, Y., H. D. Tauschel, A. Nilsson, and R. D. Duan, 1999, Ursodeoxycholic acid increases the activities of alkaline sphingomyelinase and caspase-3 in the rat colon: *Scand.J.Gastroenterol.*, v. 34, no. 9, p. 915-920.

Cheung, E. C., H. M. McBride, and R. S. Slack, 2007, Mitochondrial dynamics in the regulation of neuronal cell death: *Apoptosis.*, v. 12, no. 5, p. 979-992.

Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari, and V. M. Dixit, 1995, FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis: *Cell*, v. 81, no. 4, p. 505-512.

Chou, J. J., H. Matsuo, H. Duan, and G. Wagner, 1998, Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment: *Cell*, v. 94, no. 2, p. 171-180.

Chu, Z. L., T. A. McKinsey, L. Liu, J. J. Gentry, M. H. Malim, and D. W. Ballard, 1997, Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 94, no. 19, p. 10057-10062.

Chun, H. J. et al., 2002, Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency: *Nature*, v. 419, no. 6905, p. 395-399.

Cifone, M. G., M. R. De, P. Roncaioli, M. R. Rippo, M. Azuma, L. L. Lanier, A. Santoni, and R. Testi, 1994, Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase: *J.Exp.Med.*, v. 180, no. 4, p. 1547-1552.

Clark, E. A., and J. S. Brugge, 1995, Integrins and signal transduction pathways: the road taken: *Science*, v. 268, no. 5208, p. 233-239.

Clarke, A. R., C. A. Purdie, D. J. Harrison, R. G. Morris, C. C. Bird, M. L. Hooper, and A. H. Wyllie, 1993, Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways: *Nature*, v. 362, no. 6423, p. 849-852.

Clarke, P. G., and S. Clarke, 1995, Historic apoptosis: *Nature*, v. 378, no. 6554, p. 230.

Cohen, G. M., 1997, Caspases: the executioners of apoptosis: *Biochem.J.*, v. 326 (Pt 1), p. 1-16.

Combes, B. et al., 1995, A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: *Hepatology*, v. 22, no. 3, p. 759-766.

Compton, S. J., and C. G. Jones, 1985, Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay: *Anal.Biochem.*, v. 151, no. 2, p. 369-374.

Corbetta, S., E. Ballare, G. Mantovani, A. Lania, M. Losa, A. M. Di Blasio, and A. Spada, 2001, Somatostatin receptor subtype 2 and 5 in human GH-secreting pituitary adenomas: analysis of gene sequence and mRNA expression: *Eur.J.Clin.Invest*, v. 31, no. 3, p. 208-214.

Corpechot, C., F. Carrat, A. M. Bonnard, R. E. Poupon, and R. Poupon, 2000, The effect of ursodeoxycholic acid therapy on liver fibrosis progression in primary biliary cirrhosis: *Hepatology*, v. 32, no. 6, p. 1196-1199.

Cozzi, R. et al., 2003, Four-year treatment with octreotide-long-acting repeatable in 110 acromegalic patients: predictive value of short-term results?: *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 88, no. 7, p. 3090-3098.

Cribbs, J. T., and S. Strack, 2007, Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death: *EMBO Rep.*, v. 8, no. 10, p. 939-944.

Crompton, M., 1999, The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death: *Biochem.J.*, v. 341 (Pt 2), p. 233-249.

Crosignani, A., M. Podda, P. M. Battezzati, E. Bertolini, M. Zuin, D. Watson, and K. D. Setchell, 1991, Changes in bile acid composition in patients with primary biliary cirrhosis induced by ursodeoxycholic acid administration: *Hepatology*, v. 14, no. 6, p. 1000-1007.

Cross, F., J. Roberts, and H. Weintraub, 1989, Simple and complex cell cycles: *Annu.Rev.Cell Biol.*, v. 5, p. 341-396.

Dalm, V. A., L. J. Hofland, D. Ferone, R. Croxen, S. W. Lamberts, and P. M. van Hagen, 2003, The role of somatostatin and somatostatin analogs in the pathophysiology of the human immune system: *J.Endocrinol.Invest*, v. 26, no. 8 Suppl, p. 94-102.

Danchenko, E., H. Petermann, A. Chirkin, and R. Dargel, 2001, Effect of bile acids on the proliferative activity and apoptosis of rat hepatocytes: *Exp.Toxicol.Pathol.*, v. 53, no. 2-3, p. 227-233.

Danesi, R., C. Agen, U. Benelli, A. D. Paolo, D. Nardini, G. Bocci, F. Basolo, A. Campagni, and M. D. Tacca, 1997, Inhibition of experimental angiogenesis by the somatostatin analogue octreotide acetate (SMS 201-995): *Clin.Cancer Res.*, v. 3, no. 2, p. 265-272.

Danial, N. N., and S. J. Korsmeyer, 2004, Cell death: critical control points: *Cell*, v. 116, no. 2, p. 205-219.

Dasgupta, P., 2004, Somatostatin analogues: multiple roles in cellular proliferation, neoplasia, and angiogenesis: Pharmacol.Ther., v. 102, no. 1, p. 61-85.

Davies, N., H. Kynaston, J. Yates, D. M. Nott, S. A. Jenkins, and B. A. Taylor, 1993, Reticuloendothelial stimulation: levamisole compared: Dis.Colon Rectum, v. 36, no. 11, p. 1054-1058.

Davies, N., H. Kynaston, J. Yates, D. M. Nott, J. Nash, B. A. Taylor, and S. A. Jenkins, 1995a, Octreotide inhibits the growth and development of three types of experimental liver metastases: Br.J.Surg., v. 82, no. 6, p. 840-843.

Davies, N., H. Kynaston, J. Yates, B. A. Taylor, and S. A. Jenkins, 1995b, Octreotide, the reticuloendothelial system, and experimental liver tumour: Gut, v. 36, no. 4, p. 610-614.

Davies, N., J. Yates, H. Kynaston, B. A. Taylor, and S. A. Jenkins, 1997, Effects of octreotide on liver regeneration and tumour growth in the regenerating liver: J.Gastroenterol.Hepatol., v. 12, no. 1, p. 47-53.

De Toni, E. N. et al., 2007, P60-c-src suppresses apoptosis through inhibition of caspase 8 activation in hepatoma cells, but not in primary hepatocytes: J.Hepatol., v. 46, no. 4, p. 682-691.

Delesque, N., L. Buscail, J. P. Esteve, N. Saint-Laurent, C. Muller, G. Weckbecker, C. Bruns, N. Vaysse, and C. Susini, 1997, sst2 somatostatin receptor expression reverses tumorigenicity of human pancreatic cancer cells: Cancer Res., v. 57, no. 5, p. 956-962.

DeLong, M. J., 1998, Apoptosis: a modulator of cellular homeostasis and disease states: Ann.N.Y.Acad.Sci., v. 842, p. 82-90.

Deming, D. A., A. L. Stella, K. D. Holen, G. Ku, and E. M. O'Reilly, 2005, A dramatic response to long-acting octreotide in metastatic hepatocellular carcinoma: Clin.Adv.Hematol.Oncol., v. 3, no. 6, p. 468-472.

Desaintes, C., S. Goyat, S. Garbay, M. Yaniv, and F. Thierry, 1999, Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells: Oncogene, v. 18, no. 32, p. 4538-4545.

Deveraux, Q. L., and J. C. Reed, 1999, IAP family proteins--suppressors of apoptosis: Genes Dev., v. 13, no. 3, p. 239-252.

Diaconu, C. C., M. Szathmari, G. Keri, and A. Venetianer, 1999, Apoptosis is induced in both drug-sensitive and multidrug-resistant hepatoma cells by somatostatin analogue TT-232: Br.J.Cancer, v. 80, no. 8, p. 1197-1203.

Dimitroulopoulos, D. et al., 2007, Long acting octreotide in the treatment of advanced hepatocellular cancer and overexpression of somatostatin receptors: randomized placebo-controlled trial: World J.Gastroenterol., v. 13, no. 23, p. 3164-3170.

Donovan, M., and T. G. Cotter, 2004, Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1644, no. 2-3, p. 133-147.

Dournaud, P., H. Boudin, A. Schonbrunn, G. S. Tannenbaum, and A. Beaudet, 1998, Interrelationships between somatostatin sst2A receptors and somatostatin-containing axons in rat brain: evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous somatostatin: *J.Neurosci.*, v. 18, no. 3, p. 1056-1071.

Droin, N., M. Beauchemin, E. Solary, and R. Bertrand, 2000, Identification of a caspase-2 isoform that behaves as an endogenous inhibitor of the caspase cascade: *Cancer Res.*, v. 60, no. 24, p. 7039-7047.

Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang, 2000, Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition: *Cell*, v. 102, no. 1, p. 33-42.

Du, J. et al., 2009, Hepatitis B virus core protein inhibits TRAIL-induced apoptosis of hepatocytes by blocking DR5 expression: *Cell Death.Differ.*, v. 16, no. 2, p. 219-229.

Duan, H., and V. M. Dixit, 1997, RAIDD is a new 'death' adaptor molecule: *Nature*, v. 385, no. 6611, p. 86-89.

Duan, X. X., J. S. Ou, Y. Li, J. J. Su, C. Ou, C. Yang, H. F. Yue, and K. C. Ban, 2005, Dynamic expression of apoptosis-related genes during development of laboratory hepatocellular carcinoma and its relation to apoptosis: *World J.Gastroenterol.*, v. 11, no. 30, p. 4740-4744.

Duke, R. C., and J. J. Cohen, 1986, IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells: *Lymphokine Res.*, v. 5, no. 4, p. 289-299.

Dumitriu, I. E., P. Baruah, A. A. Manfredi, M. E. Bianchi, and P. Rovere-Querini, 2005, HMGB1: guiding immunity from within: *Trends Immunol.*, v. 26, no. 7, p. 381-387.

Eberstadt, M., B. Huang, Z. Chen, R. P. Meadows, S. C. Ng, L. Zheng, M. J. Lenardo, and S. W. Fesik, 1998, NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain: *Nature*, v. 392, no. 6679, p. 941-945.

Ekert, P. G., J. Silke, C. J. Hawkins, A. M. Verhagen, and D. L. Vaux, 2001, DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9: *J.Cell Biol.*, v. 152, no. 3, p. 483-490.

el-Deiry, W. S. et al., 1993, WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression: *Cell*, v. 75, no. 4, p. 817-825.

El-Serag, H. B., 2002, Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view: *J.Clin.Gastroenterol.*, v. 35, no. 5 Suppl 2, p. S72-S78.

El-Serag, H. B., 2007, Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA: *Hepatol.Res.*, v. 37 Suppl 2, p. S88-S94.

Elliott, D. E., J. Li, A. M. Blum, A. Metwali, Y. C. Patel, and J. V. Weinstock, 1999, SSTR2A is the dominant somatostatin receptor subtype expressed by inflammatory cells, is widely expressed and directly regulates T cell IFN-gamma release: *Eur.J.Immunol.*, v. 29, no. 8, p. 2454-2463.

Ellis, H. M., and H. R. Horvitz, 1986, Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*: *Cell*, v. 44, no. 6, p. 817-829.

Ellis, R. E., J. Y. Yuan, and H. R. Horvitz, 1991, Mechanisms and functions of cell death: *Annu.Rev.Cell Biol.*, v. 7, p. 663-698.

Elmore, S., 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death: *Toxicol.Pathol.*, v. 35, no. 4, p. 495-516.

Endres, M., S. Namura, M. Shimizu-Sasamata, C. Waeber, L. Zhang, T. Gomez-Isla, B. T. Hyman, and M. A. Moskowitz, 1998, Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family: *J.Cereb.Blood Flow Metab.*, v. 18, no. 3, p. 238-247.

Eriksson, L. S. et al., 1997, Ursodeoxycholic acid treatment in patients with primary biliary cirrhosis. A Swedish multicentre, double-blind, randomized controlled study: *Scand.J.Gastroenterol.*, v. 32, no. 2, p. 179-186.

Erlandsen, S. E., V. Fykse, H. L. Waldum, and A. K. Sandvik, 2007, Octreotide induces apoptosis in the oxyntic mucosa: *Mol.Cell Endocrinol.*, v. 264, no. 1-2, p. 188-196.

Estrov, Z., R. A. Black, P. R. Sleath, D. Harris, Q. Van, R. LaPushin, E. H. Estey, and M. Talpaz, 1995, Effect of interleukin-1 beta converting enzyme inhibitor on acute myelogenous leukemia progenitor proliferation: *Blood*, v. 86, no. 12, p. 4594-4602.

Evan, G. I., A. H. Wyllie, C. S. Gilbert, T. D. Littlewood, H. Land, M. Brooks, C. M. Waters, L. Z. Penn, and D. C. Hancock, 1992, Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein: *Cell*, v. 69, no. 1, p. 119-128.

Fabregat, I., C. Roncero, and M. Fernandez, 2007, Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer: *Liver Int.*, v. 27, no. 2, p. 155-162.

Fang, Y., L. Wang, J. Jin, and X. Zha, 2001, Focal adhesion kinase affects the sensitivity of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 to tumor necrosis factor-alpha/cycloheximide-induced apoptosis by regulating protein kinase B levels: *Eur.J.Biochem.*, v. 268, no. 16, p. 4513-4519.

Farazi, P. A., J. Glickman, J. Horner, and R. A. Depinho, 2006, Cooperative interactions of p53 mutation, telomere dysfunction, and chronic liver damage in hepatocellular carcinoma progression: *Cancer Res.*, v. 66, no. 9, p. 4766-4773.

Farrow, S. N., and R. Brown, 1996, New members of the Bcl-2 family and their protein partners: *Curr.Opin.Genet.Dev.*, v. 6, no. 1, p. 45-49.

Fattovich, G., T. Stroffolini, I. Zagni, and F. Donato, 2004, Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors: *Gastroenterology*, v. 127, no. 5 Suppl 1, p. S35-S50.

Faubion, W. A., and G. J. Gores, 1999, Death receptors in liver biology and pathobiology: *Hepatology*, v. 29, no. 1, p. 1-4.

Faubion, W. A., M. E. Guicciardi, H. Miyoshi, S. F. Bronk, P. J. Roberts, P. A. Svingen, S. H. Kaufmann, and G. J. Gores, 1999, Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas: *J.Clin.Invest*, v. 103, no. 1, p. 137-145.

Ferjoux, G., C. Bousquet, P. Cordelier, N. Benali, F. Lopez, P. Rochaix, L. Buscail, and C. Susini, 2000, Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation: *J.Physiol Paris*, v. 94, no. 3-4, p. 205-210.

Fernandez, P. L., P. Jares, M. J. Rey, E. Campo, and A. Cardesa, 1998, Cell cycle regulators and their abnormalities in breast cancer: *Mol.Pathol.*, v. 51, no. 6, p. 305-309.

Ferone, D., P. M. van Hagen, C. Semino, V. A. Dalm, A. Barreca, A. Colao, S. W. Lamberts, F. Minuto, and L. J. Hofland, 2004, Somatostatin receptor distribution and function in immune system: *Dig.Liver Dis.*, v. 36 Suppl 1, p. S68-S77.

Ferrante, E. et al., 2006, Octreotide promotes apoptosis in human somatotroph tumor cells by activating somatostatin receptor type 2: *Endocr.Relat Cancer*, v. 13, no. 3, p. 955-962.

Fesik, S. W., 2000, Insights into programmed cell death through structural biology: *Cell*, v. 103, no. 2, p. 273-282.

Fickert, P. et al., 2001, Effects of ursodeoxycholic and cholic acid feeding on hepatocellular transporter expression in mouse liver: *Gastroenterology*, v. 121, no. 1, p. 170-183.

Fimognari, C., M. Nusse, R. Cesari, G. Cantelli-Forti, and P. Hrelia, 2001, Micronuclei induction, cell cycle delay and apoptosis as markers of cellular stress caused by ursodeoxycholic acid in human lymphocytes: *Mutat.Res.*, v. 495, no. 1-2, p. 1-9.

Findley, H. W., L. Gu, A. M. Yeager, and M. Zhou, 1997, Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia: *Blood*, v. 89, no. 8, p. 2986-2993.

Fiorucci, S., A. Mencarelli, B. Palazzetti, S. P. Del, A. Morelli, and L. J. Ignarro, 2001, An NO derivative of ursodeoxycholic acid protects against Fas-mediated liver injury by inhibiting caspase activity: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 98, no. 5, p. 2652-2657.

Fischer, H., U. Koenig, L. Eckhart, and E. Tschachler, 2002, Human caspase 12 has acquired deleterious mutations: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 293, no. 2, p. 722-726.

Fjallskog, M. L., E. Ludvigsen, M. Stridsberg, K. Oberg, B. Eriksson, and E. T. Janson, 2003, Expression of somatostatin receptor subtypes 1 to 5 in tumor tissue and intratumoral vessels in malignant endocrine pancreatic tumors: *Med.Oncol.*, v. 20, no. 1, p. 59-67.

Florio, T. et al., 2003, Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities: *Endocrinology*, v. 144, no. 4, p. 1574-1584.

Freda, P. U., 2002, Somatostatin analogs in acromegaly: *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 87, no. 7, p. 3013-3018.

Frisch, S. M., and R. A. Screaton, 2001, Anoikis mechanisms: *Curr.Opin.Cell Biol.*, v. 13, no. 5, p. 555-562.

Frizelle, F. A., 1995, Octreotide inhibits the growth and development of three types of experimental liver metastasis: *Br.J.Surg.*, v. 82, no. 11, p. 1577.

Froidevaux, S., and A. N. Eberle, 2002, Somatostatin analogs and radiopeptides in cancer therapy: *Biopolymers*, v. 66, no. 3, p. 161-183.

Froidevaux, S., E. Hintermann, M. Torok, H. R. Macke, C. Beglinger, and A. N. Eberle, 1999, Differential regulation of somatostatin receptor type 2 (sst 2) expression in AR4-2J tumor cells implanted into mice during octreotide treatment: *Cancer Res.*, v. 59, no. 15, p. 3652-3657.

Fuentes-Prior, P., and G. S. Salvesen, 2004, The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition: *Biochem.J.*, v. 384, no. Pt 2, p. 201-232.

Fulda, S., 2009, Tumor resistance to apoptosis: *Int.J.Cancer*, v. 124, no. 3, p. 511-515.

Fulda, S., W. Wick, M. Weller, and K. M. Debatin, 2002, Smac agonists sensitize for Apo2L/T: *Nat.Med.*, v. 8, no. 8, p. 808-815.

Garland, J., J. R. Buscombe, C. Bouvier, P. Bouloux, M. H. Chapman, A. C. Chow, N. Reynolds, and M. E. Caplin, 2003, Sandostatin LAR (long-acting octreotide acetate) for malignant carcinoid syndrome: a 3-year experience: *Aliment.Pharmacol.Ther.*, v. 17, no. 3, p. 437-444.

Gartung, C., M. Ananthanarayanan, M. A. Rahman, S. Schuele, S. Nundy, C. J. Soroka, A. Stolz, F. J. Suchy, and J. L. Boyer, 1996, Down-regulation of expression and function of the rat liver Na⁺/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis: *Gastroenterology*, v. 110, no. 1, p. 199-209.

Gaur, U., and B. B. Aggarwal, 2003, Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily: *Biochem.Pharmacol.*, v. 66, no. 8, p. 1403-1408.

Germain, M., J. P. Mathai, H. M. McBride, and G. C. Shore, 2005, Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis: *EMBO J.*, v. 24, no. 8, p. 1546-1556.

Giacomello, M., I. Drago, P. Pizzo, and T. Pozzan, 2007, Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of cell life and death: *Cell Death.Differ.*, v. 14, no. 7, p. 1267-1274.

Glover, C. J. et al., 2003, A high-throughput screen for identification of molecular mimics of Smac/DIABLO utilizing a fluorescence polarization assay: *Anal.Biochem.*, v. 320, no. 2, p. 157-169.

Gogvadze, V., and B. Zhivotovsky, 2007, Alteration of mitochondrial function and cell sensitization to death: *J.Bioenerg.Biomembr.*, v. 39, no. 1, p. 23-30.

Golks, A., D. Brenner, C. Fritsch, P. H. Krammer, and I. N. Lavrik, 2005, c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis: *J.Biol.Chem.*, v. 280, no. 15, p. 14507-14513.

Gong, Y., Z. Huang, E. Christensen, and C. Glud, 2007, Ursodeoxycholic acid for patients with primary biliary cirrhosis: an updated systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials using Bayesian approach as sensitivity analyses: *Am.J.Gastroenterol.*, v. 102, no. 8, p. 1799-1807.

Gonzalez-Barcena, D., A. V. Schally, M. Vadillo-Buenfil, A. Cortez-Morales, L. Hernandez, V. I. Cardenas-Cornejo, and A. M. Comaru-Schally, 2003, Response of patients with advanced prostatic cancer to administration of somatostatin analog RC-160 (vapreotide) at the time of relapse: *Prostate*, v. 56, no. 3, p. 183-191.

Graybill, T. L., R. E. Dolle, C. T. Helaszek, R. E. Miller, and M. A. Ator, 1994, Preparation and evaluation of peptidic aspartyl hemiacetals as reversible inhibitors of interleukin-1 beta converting enzyme (ICE): *Int.J.Pept.Protein Res.*, v. 44, no. 2, p. 173-182.

Green, D. R., 1998, Apoptotic pathways: the roads to ruin: *Cell*, v. 94, no. 6, p. 695-698.

Green, D. R., and G. I. Evan, 2002, A matter of life and death: *Cancer Cell*, v. 1, no. 1, p. 19-30.

Green, D. R., and G. Kroemer, 2004, The pathophysiology of mitochondrial cell death: *Science*, v. 305, no. 5684, p. 626-629.

Green, D. R., and J. C. Reed, 1998, Mitochondria and apoptosis: *Science*, v. 281, no. 5381, p. 1309-1312.

Grell, M., G. Zimmermann, D. Hulser, K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, 1994, TNF receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways: *J.Immunol.*, v. 153, no. 5, p. 1963-1972.

Grinberg, M., R. Sarig, Y. Zaltsman, D. Frumkin, N. Grammatikakis, E. Reuveny, and A. Gross, 2002, tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis: *J.Biol.Chem.*, v. 277, no. 14, p. 12237-12245.

Gu, Y. et al., 1997, Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme: *Science*, v. 275, no. 5297, p. 206-209.

Guan, Y. S., Z. La, L. Yang, Q. He, and P. Li, 2007, p53 gene in treatment of hepatic carcinoma: status quo: *World J.Gastroenterol.*, v. 13, no. 7, p. 985-992.

Guicciardi, M. E., and G. J. Gores, 2002, Ursodeoxycholic acid cytoprotection: dancing with death receptors and survival pathways: *Hepatology*, v. 35, no. 4, p. 971-973.

Guicciardi, M. E., and G. J. Gores, 2005, Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury: *Gut*, v. 54, no. 7, p. 1024-1033.

Guillermet, J. et al., 2003, Somatostatin receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 100, no. 1, p. 155-160.

Guldutuna, S., G. Zimmer, M. Imhof, S. Bhatti, T. You, and U. Leuschner, 1993, Molecular aspects of membrane stabilization by ursodeoxycholate [see comment]: *Gastroenterology*, v. 104, no. 6, p. 1736-1744.

Guo, Y., S. M. Srinivasula, A. Druilhe, T. Fernandes-Alnemri, and E. S. Alnemri, 2002, Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria: *J.Biol.Chem.*, v. 277, no. 16, p. 13430-13437.

Hagey, L. R., D. L. Crombie, E. Espinosa, M. C. Carey, H. Igimi, and A. F. Hofmann, 1993, Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores: *J.Lipid Res.*, v. 34, no. 11, p. 1911-1917.

Hajnoczky, G., G. Csordas, S. Das, C. Garcia-Perez, M. Saotome, R. S. Sinha, and M. Yi, 2006, Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis: *Cell Calcium*, v. 40, no. 5-6, p. 553-560.

Halicka, H. D., B. Ardelt, X. Li, M. M. Melamed, and Z. Darzynkiewicz, 1995, 2-Deoxy-D-glucose enhances sensitivity of human histiocytic lymphoma U937 cells to apoptosis induced by tumor necrosis factor: *Cancer Res.*, v. 55, no. 2, p. 444-449.

Hallstrom, T. C., and J. R. Nevins, 2009, Balancing the decision of cell proliferation and cell fate: *Cell Cycle*, v. 8, no. 4, p. 532-535.

Hamada, E. et al., 1999, Activation of Kupffer cells and caspase-3 involved in rat hepatocyte apoptosis induced by endotoxin: *J.Hepatol.*, v. 30, no. 5, p. 807-818.

Han, S. I., Y. S. Kim, and T. H. Kim, 2008, Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions: *BMB.Rep.*, v. 41, no. 1, p. 1-10.

Harris, M. H., and C. B. Thompson, 2000, The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability: *Cell Death.Differ.*, v. 7, no. 12, p. 1182-1191.

Harvey, N. L., A. J. Butt, and S. Kumar, 1997, Functional activation of Nedd2/ICH-1 (caspase-2) is an early process in apoptosis: *J.Biol.Chem.*, v. 272, no. 20, p. 13134-13139.

Haussinger, D., N. Saha, C. Hallbrucker, F. Lang, and W. Gerok, 1993, Involvement of microtubules in the swelling-induced stimulation of transcellular taurocholate transport in perfused rat liver: *Biochem.J.*, v. 291 (Pt 2), p. 355-360.

Hayry, P., A. Raisanen, J. Ustinov, A. Mennander, and T. Paavonen, 1993, Somatostatin analog lanreotide inhibits myocyte replication and several growth factors in allograft arteriosclerosis: *FASEB J.*, v. 7, no. 11, p. 1055-1060.

Heaney, A. P., and S. Melmed, 2004, Molecular targets in pituitary tumours: *Nat.Rev.Cancer*, v. 4, no. 4, p. 285-295.

Heath-Engel, H. M., N. C. Chang, and G. C. Shore, 2008, The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family: *Oncogene*, v. 27, no. 50, p. 6419-6433.

Heathcote, E. J. et al., 1994, The Canadian Multicenter Double-blind Randomized Controlled Trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: *Hepatology*, v. 19, no. 5, p. 1149-1156.

Hegde, R. et al., 2002, Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction: *J.Biol.Chem.*, v. 277, no. 1, p. 432-438.

Heller, R. A., K. Song, N. Fan, and D. J. Chang, 1992, The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity: *Cell*, v. 70, no. 1, p. 47-56.

Hemingway, D. M., S. A. Jenkins, and T. G. Cooke, 1992, The effects of sandostatin (Octreotide, SMS 201-995) infusion on splanchnic and hepatic blood flow in an experimental model of hepatic metastases: *Br.J.Cancer*, v. 65, no. 3, p. 396-398.

Hengartner, M. O., R. E. Ellis, and H. R. Horvitz, 1992, *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death: *Nature*, v. 356, no. 6369, p. 494-499.

Hengartner, M. O., and H. R. Horvitz, 1994, *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*: *Cell*, v. 76, no. 4, p. 665-676.

Herr, I., and K. M. Debatin, 2001, Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy: *Blood*, v. 98, no. 9, p. 2603-2614.

Herr, I., P. Schemmer, and M. W. Buchler, 2007, On the TRAIL to therapeutic intervention in liver disease: *Hepatology*, v. 46, no. 1, p. 266-274.

Heuman, D. M., R. S. Bajaj, and Q. Lin, 1996, Adsorption of mixtures of bile salt taurine conjugates to lecithin-cholesterol membranes: implications for bile salt toxicity and cytoprotection: *J.Lipid Res.*, v. 37, no. 3, p. 562-573.

Hilbi, H., Y. Chen, K. Thirumalai, and A. Zychlinsky, 1997, The interleukin 1beta-converting enzyme, caspase 1, is activated during *Shigella flexneri*-induced apoptosis in human monocyte-derived macrophages: *Infect.Immun.*, v. 65, no. 12, p. 5165-5170.

Hofland, L. J., and S. W. Lamberts, 2003, The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance: *Endocr.Rev.*, v. 24, no. 1, p. 28-47.

Hofland, L. J. et al., 2004, The novel somatostatin analog SOM230 is a potent inhibitor of hormone release by growth hormone- and prolactin-secreting pituitary adenomas in vitro: *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 89, no. 4, p. 1577-1585.

Hofland, L. J., P. M. van Koetsveld, N. Wouters, M. Waaijers, J. C. Reubi, and S. W. Lamberts, 1992, Dissociation of antiproliferative and antihormonal effects of the somatostatin analog octreotide on 7315b pituitary tumor cells: *Endocrinology*, v. 131, no. 2, p. 571-577.

Hofmann, A. F., 1994, Pharmacology of ursodeoxycholic acid, an enterohepatic drug: *Scand.J.Gastroenterol.Suppl*, v. 204, p. 1-15.

Hofmann, A. F., and H. Popper, 1987, Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis: *Lancet*, v. 2, no. 8555, p. 398-399.

Hofmann, K., 1999, The modular nature of apoptotic signaling proteins: *Cell Mol.Life Sci.*, v. 55, no. 8-9, p. 1113-1128.

Hofmann, K., P. Bucher, and J. Tschopp, 1997, The CARD domain: a new apoptotic signalling motif: *Trends Biochem.Sci.*, v. 22, no. 5, p. 155-156.

Hoglen, N. C., L. S. Chen, C. D. Fisher, B. P. Hirakawa, T. Groessl, and P. C. Contreras, 2004, Characterization of IDN-6556 (3-[2-(2-tert-butyl-phenylaminoxy)-amino]-propionylamino]-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-phenoxy)-pentanoic acid): a liver-targeted caspase inhibitor: *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, v. 309, no. 2, p. 634-640.

Hollstein, M. et al., 1994, Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: *Nucleic Acids Res.*, v. 22, no. 17, p. 3551-3555.

Hornick, C. A., C. T. Anthony, S. Hughey, B. M. Gebhardt, G. D. Espenan, and E. A. Woltering, 2000, Progressive nuclear translocation of somatostatin analogs: *J.Nucl.Med.*, v. 41, no. 7, p. 1256-1263.

Hotchkiss, R. S. et al., 1999, Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis: *J.Immunol.*, v. 162, no. 7, p. 4148-4156.

Hsu, H., H. B. Shu, M. G. Pan, and D. V. Goeddel, 1996, TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways: *Cell*, v. 84, no. 2, p. 299-308.

Hsu, H., J. Xiong, and D. V. Goeddel, 1995, The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation: *Cell*, v. 81, no. 4, p. 495-504.

Hu, C., C. Yi, Z. Hao, S. Cao, H. Li, X. Shao, J. Zhang, T. Qiao, and D. Fan, 2004, The effect of somatostatin and SSTR3 on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells: *Cancer Biol. Ther.*, v. 3, no. 8, p. 726-730.

Hu, S., S. J. Snipas, C. Vincenz, G. Salvesen, and V. M. Dixit, 1998, Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease: *J. Biol. Chem.*, v. 273, no. 45, p. 29648-29653.

Hua, Y. P., X. Y. Yin, B. G. Peng, S. Q. Li, J. M. Lai, H. Z. Liang, and L. J. Liang, 2009, Mechanisms and influence of octreotide-induced regulation of somatostatin receptor 2 on hepatocellular carcinoma: *Chemotherapy*, v. 55, no. 5, p. 312-320.

Huang, Y., Y. C. Park, R. L. Rich, D. Segal, D. G. Myszka, and H. Wu, 2001, Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain: *Cell*, v. 104, no. 5, p. 781-790.

Hui, A. M., M. Makuuchi, and X. Li, 1998, Cell cycle regulators and human hepatocarcinogenesis: *Hepatogastroenterology*, v. 45, no. 23, p. 1635-1642.

Humke, E. W., J. Ni, and V. M. Dixit, 1998, ERICE, a novel FLICE-activatable caspase: *J. Biol. Chem.*, v. 273, no. 25, p. 15702-15707.

Hussain, S. P., J. Schwank, F. Staib, X. W. Wang, and C. C. Harris, 2007, TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer: *Oncogene*, v. 26, no. 15, p. 2166-2176.

Huynh, H., P. K. Chow, L. L. Ooi, and K. C. Soo, 2002, A possible role for insulin-like growth factor-binding protein-3 autocrine/paracrine loops in controlling hepatocellular carcinoma cell proliferation: *Cell Growth Differ.*, v. 13, no. 3, p. 115-122.

Im, E., and J. D. Martinez, 2004, Ursodeoxycholic acid (UDCA) can inhibit deoxycholic acid (DCA)-induced apoptosis via modulation of EGFR/Raf-1/ERK signaling in human colon cancer cells: *J. Nutr.*, v. 134, no. 2, p. 483-486.

Ito, N. et al., 1991, Elevated levels of transforming growth factor beta messenger RNA and its polypeptide in human hepatocellular carcinoma: *Cancer Res.*, v. 51, no. 15, p. 4080-4083.

Ito, T. et al., 2000a, Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma: *Hepatology*, v. 31, no. 5, p. 1080-1085.

Ito, Y. et al., 2000b, The status of Fas and Fas ligand expression can predict recurrence of hepatocellular carcinoma: *Br. J. Cancer*, v. 82, no. 6, p. 1211-1217.

Itoh, N., Y. Tsujimoto, and S. Nagata, 1993, Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death: J.Immunol., v. 151, no. 2, p. 621-627.

Itoh, N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto, and S. Nagata, 1991, The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis: Cell, v. 66, no. 2, p. 233-243.

Jacobs, T., 1992, Control of the cell cycle: Dev.Biol., v. 153, no. 1, p. 1-15.

Janson, E. T., M. Stridsberg, A. Gobl, J. E. Westlin, and K. Oberg, 1998, Determination of somatostatin receptor subtype 2 in carcinoid tumors by immunohistochemical investigation with somatostatin receptor subtype 2 antibodies: Cancer Res., v. 58, no. 11, p. 2375-2378.

Jaquet, P. et al., 2000, Human somatostatin receptor subtypes in acromegaly: distinct patterns of messenger ribonucleic acid expression and hormone suppression identify different tumoral phenotypes: J.Clin.Endocrinol.Metab, v. 85, no. 2, p. 781-792.

Jazrawi, R. P., J. S. de Caestecker, P. M. Goggin, A. J. Britten, A. E. Joseph, J. D. Maxwell, and T. C. Northfield, 1994, Kinetics of hepatic bile acid handling in cholestatic liver disease: effect of ursodeoxycholic acid: Gastroenterology, v. 106, no. 1, p. 134-142.

Jeong, S. Y., and D. W. Seol, 2008, The role of mitochondria in apoptosis: BMB.Rep., v. 41, no. 1, p. 11-22.

Jia, L. T. et al., 2003a, Specific tumoricidal activity of a secreted proapoptotic protein consisting of HER2 antibody and constitutively active caspase-3: Cancer Res., v. 63, no. 12, p. 3257-3262.

Jia, W. D., G. L. Xu, H. C. Sun, L. Wang, R. N. Xu, and Q. Xue, 2003b, Effect of octreotide on angiogenesis induced by hepatocellular carcinoma in vivo: Hepatobiliary.Pancreat.Dis.Int., v. 2, no. 3, p. 404-409.

Jiang, W., and D. S. Pisetsky, 2007, Mechanisms of Disease: the role of high-mobility group protein 1 in the pathogenesis of inflammatory arthritis: Nat.Clin.Pract.Rheumatol., v. 3, no. 1, p. 52-58.

Jiang, X. et al., 2003, Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway: Science, v. 299, no. 5604, p. 223-226.

Jiang, X., and X. Wang, 2000, Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1: J.Biol.Chem., v. 275, no. 40, p. 31199-31203.

Johnstone, R. W., A. J. Frew, and M. J. Smyth, 2008, The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy: Nat.Rev.Cancer, v. 8, no. 10, p. 782-798.

Kalai, M., M. Lamkanfi, G. Denecker, M. Boogmans, S. Lippens, A. Meeus, W. Declercq, and P. Vandenabeele, 2003, Regulation of the expression and processing of caspase-12: J.Cell Biol., v. 162, no. 3, p. 457-467.

Kang, B. H., E. Ko, O. K. Kwon, and K. Y. Choi, 2002, The structure of procaspase 6 is similar to that of active mature caspase 6: *Biochem.J.*, v. 364, no. Pt 3, p. 629-634.

Kang, B. N., K. S. Jeong, S. J. Park, S. J. Kim, T. H. Kim, H. J. Kim, and S. Y. Ryu, 2001, Regulation of apoptosis by somatostatin and substance P in peritoneal macrophages: *Regul.Pept.*, v. 101, no. 1-3, p. 43-49.

Kaplan, M. M., and M. E. Gershwin, 2005, Primary biliary cirrhosis: *N.Engl.J.Med.*, v. 353, no. 12, p. 1261-1273.

Kaplowitz, N., 2000a, Cell death at the millennium. Implications for liver diseases: *Clin.Liver Dis.*, v. 4, no. 1, p. 1-23, v.

Kaplowitz, N., 2000b, Mechanisms of liver cell injury: *J.Hepatol.*, v. 32, no. 1 Suppl, p. 39-47.

Kaplowitz, N., 2002, Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury: *Semin.Liver Dis.*, v. 22, no. 2, p. 137-144.

Kaposi-Novak, P., J. S. Lee, L. Gomez-Quiroz, C. Coulouarn, V. M. Factor, and S. S. Thorgeirsson, 2006, Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype: *J.Clin.Invest*, v. 116, no. 6, p. 1582-1595.

Karbowski, M., and R. J. Youle, 2003, Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis: *Cell Death.Differ.*, v. 10, no. 8, p. 870-880.

Kaufmann, S. H., and D. L. Vaux, 2003, Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance: *Oncogene*, v. 22, no. 47, p. 7414-7430.

Keene, C. D., C. M. Rodrigues, T. Eich, M. S. Chhabra, C. J. Steer, and W. C. Low, 2002, Tauroursodeoxycholic acid, a bile acid, is neuroprotective in a transgenic animal model of Huntington's disease: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 99, no. 16, p. 10671-10676.

Keene, C. D., C. M. Rodrigues, T. Eich, C. Linehan-Stieers, A. Abt, B. T. Kren, C. J. Steer, and W. C. Low, 2001, A bile acid protects against motor and cognitive deficits and reduces striatal degeneration in the 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease: *Exp.Neurol.*, v. 171, no. 2, p. 351-360.

Kelekar, A., and C. B. Thompson, 1998, Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis: *Trends Cell Biol.*, v. 8, no. 8, p. 324-330.

Kennedy, B. K., N. R. Austriaco, Jr., J. Zhang, and L. Guarente, 1995, Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae*: *Cell*, v. 80, no. 3, p. 485-496.

Kern, M. A. et al., 2006, Cyclooxygenase-2 inhibition induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma: *Cancer Res.*, v. 66, no. 14, p. 7059-7066.

- Kern, M. A., D. Schubert, D. Sahi, M. M. Schoneweiss, I. Moll, A. M. Haugg, H. P. Dienes, K. Breuhahn, and P. Schirmacher, 2002, Proapoptotic and antiproliferative potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in human liver tumor cells: *Hepatology*, v. 36, no. 4 Pt 1, p. 885-894.**
- Kerr, J. F., 1971, Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death: *J.Pathol.*, v. 105, no. 1, p. 13-20.**
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie, 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics: *Br.J.Cancer*, v. 26, no. 4, p. 239-257.**
- Kessel, D., J. A. Caruso, and J. J. Reiners, Jr., 2000, Potentiation of photodynamic therapy by ursodeoxycholic acid: *Cancer Res.*, v. 60, no. 24, p. 6985-6988.**
- Kim, T. H., Y. Zhao, M. J. Barber, D. K. Kuharsky, and X. M. Yin, 2000, Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 50, p. 39474-39481.**
- Kim, Y., and D. W. Seol, 2003, TRAIL, a mighty apoptosis inducer: *Mol.Cells*, v. 15, no. 3, p. 283-293.**
- Kim, Y. C., K. S. Song, G. Yoon, M. J. Nam, and W. S. Ryu, 2001, Activated ras oncogene collaborates with HBx gene of hepatitis B virus to transform cells by suppressing HBx-mediated apoptosis: *Oncogene*, v. 20, no. 1, p. 16-23.**
- King, K. L., and J. A. Cidlowski, 1998, Cell cycle regulation and apoptosis: *Annu.Rev.Physiol*, v. 60, p. 601-617.**
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Krammer, and M. E. Peter, 1995, Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor: *EMBO J.*, v. 14, no. 22, p. 5579-5588.**
- Kischkel, F. C. et al., 2001, Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8: *J.Biol.Chem.*, v. 276, no. 49, p. 46639-46646.**
- Kitani, K., M. Ohta, and S. Kanai, 1985, Tauroursodeoxycholate prevents biliary protein excretion induced by other bile salts in the rat: *Am.J.Physiol*, v. 248, no. 4 Pt 1, p. G407-G417.**
- Kolios, G., Z. Brown, R. L. Robson, D. A. Robertson, and J. Westwick, 1995, Inducible nitric oxide synthase activity and expression in a human colonic epithelial cell line, HT-29: *Br.J.Pharmacol.*, v. 116, no. 7, p. 2866-2872.**
- Kong, D., L. Xu, Y. Yu, W. Zhu, D. W. Andrews, Y. Yoon, and T. H. Kuo, 2005, Regulation of Ca²⁺-induced permeability transition by Bcl-2 is antagonized by Drp1 and hFis1: *Mol.Cell Biochem.*, v. 272, no. 1-2, p. 187-199.**

Konishi, A. et al., 2003, Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks: *Cell*, v. 114, no. 6, p. 673-688.

Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K. J. Oh, and P. H. Schlesinger, 2000, Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c: *Cell Death.Differ.*, v. 7, no. 12, p. 1166-1173.

Koulentaki, M., J. Moscandrea, P. Dimoulios, C. Chatzicostas, and E. A. Kouroumalis, 2004, Survival of anti-mitochondrial antibody-positive and -negative primary biliary cirrhosis patients on ursodeoxycholic acid treatment: *Dig.Dis.Sci.*, v. 49, no. 7-8, p. 1190-1195.

Kouroumalis, E., D. Samonakis, and P. Skordilis, 2003, Octreotide treatment of hepatocellular carcinoma: *Hepatology*, v. 37, no. 2, p. 477.

Kouroumalis, E., P. Skordilis, K. Thermos, A. Vasilaki, J. Moschandrea, and O. N. Manousos, 1998, Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomised controlled study: *Gut*, v. 42, no. 3, p. 442-447.

Kouroumalis, E. A., 2001, Octreotide for cancer of the liver and biliary tree: *Chemotherapy*, v. 47 Suppl 2, p. 150-161.

Krammer, P. H., 1999, CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die: *Adv.Immunol.*, v. 71, p. 163-210.

Kroemer, G., 1997, The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis: *Nat.Med.*, v. 3, no. 6, p. 614-620.

Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P. H. Krammer, and S. Kirchhoff, 2001, Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex: *J.Biol.Chem.*, v. 276, no. 23, p. 20633-20640.

Kuiper, E. M. et al., 2009, Improved prognosis of patients with primary biliary cirrhosis that have a biochemical response to ursodeoxycholic acid: *Gastroenterology*, v. 136, no. 4, p. 1281-1287.

Kulaksiz, H., R. Eissele, D. Rossler, S. Schulz, V. Holtt, Y. Cetin, and R. Arnold, 2002, Identification of somatostatin receptor subtypes 1, 2A, 3, and 5 in neuroendocrine tumours with subtype specific antibodies: *Gut*, v. 50, no. 1, p. 52-60.

Kullak-Ublick, G. A., U. Beuers, and G. Paumgartner, 1996, Molecular and functional characterization of bile acid transport in human hepatoblastoma HepG2 cells: *Hepatology*, v. 23, no. 5, p. 1053-1060.

Kullak-Ublick, G. A., B. Stieger, B. Hagenbuch, and P. J. Meier, 2000, Hepatic transport of bile salts: *Semin.Liver Dis.*, v. 20, no. 3, p. 273-292.

Kumar, M., Z. R. Liu, L. Thapa, Q. Chang, D. Y. Wang, and R. Y. Qin, 2004, Antiangiogenic effect of somatostatin receptor subtype 2 on pancreatic cancer cell

line: Inhibition of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 expression in vitro: World J.Gastroenterol., v. 10, no. 3, p. 393-399.

Kumar, S., M. Kinoshita, M. Noda, N. G. Copeland, and N. A. Jenkins, 1994, Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-3* and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme: Genes Dev., v. 8, no. 14, p. 1613-1626.

Kumar, S., and D. L. Vaux, 2002, Apoptosis. A cinderella caspase takes center stage: Science, v. 297, no. 5585, p. 1290-1291.

Kuribayashi, K., P. A. Mayes, and W. S. El-Deiry, 2006, What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria?: Cancer Biol.Ther., v. 5, no. 7, p. 763-765.

Kurz, A. K., D. Graf, M. Schmitt, D. S. Vom, and D. Haussinger, 2001, Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats: Gastroenterology, v. 121, no. 2, p. 407-419.

Kuwana, T., L. Bouchier-Hayes, J. E. Chipuk, C. Bonzon, B. A. Sullivan, D. R. Green, and D. D. Newmeyer, 2005, BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly: Mol.Cell, v. 17, no. 4, p. 525-535.

Kuwana, T., J. J. Smith, M. Muzio, V. Dixit, D. D. Newmeyer, and S. Kornbluth, 1998, Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c: J.Biol.Chem., v. 273, no. 26, p. 16589-16594.

Kvols, L. K., and E. A. Woltering, 2006, Role of somatostatin analogs in the clinical management of non-neuroendocrine solid tumors: Anticancer Drugs, v. 17, no. 6, p. 601-608.

Lahlou, H., M. Fanjul, L. Pradayrol, C. Susini, and S. Pyronnet, 2005, Restoration of functional gap junctions through internal ribosome entry site-dependent synthesis of endogenous connexins in density-inhibited cancer cells: Mol.Cell Biol., v. 25, no. 10, p. 4034-4045.

Lahlou, H., J. Guillermet, M. Hortala, F. Vernejoul, S. Pyronnet, C. Bousquet, and C. Susini, 2004, Molecular signaling of somatostatin receptors: Ann.N.Y.Acad.Sci., v. 1014, p. 121-131.

Lamberts, S. W., W. W. de Herder, and L. J. Hofland, 2002, Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer: Trends Endocrinol.Metab, v. 13, no. 10, p. 451-457.

Lamberts, S. W., J. C. Reubi, and E. P. Krenning, 1994, The role of somatostatin analogs in the control of tumor growth: Semin.Oncol., v. 21, no. 5 Suppl 13, p. 61-64.

Lamberts, S. W., A. J. van der Lely, W. W. de Herder, and L. J. Hofland, 1996, Octreotide: N.Engl.J.Med., v. 334, no. 4, p. 246-254.

- Lamkanfi, M. et al., 2005, A novel caspase-2 complex containing TRAF2 and RIP1: *J.Biol.Chem.*, v. 280, no. 8, p. 6923-6932.
- Lamkanfi, M., W. Declercq, M. Kalai, X. Saelens, and P. Vandenabeele, 2002, Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man: *Cell Death.Differ.*, v. 9, no. 4, p. 358-361.
- Lasfer, M., N. Vadrot, A. V. Schally, A. Nagy, G. Halmos, D. Pessayre, G. Feldmann, and F. J. Rey-Desmars, 2005, Potent induction of apoptosis in human hepatoma cell lines by targeted cytotoxic somatostatin analogue AN-238: *J.Hepatol.*, v. 42, no. 2, p. 230-237.
- Lassus, P., X. Opitz-Araya, and Y. Lazebnik, 2002, Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization: *Science*, v. 297, no. 5585, p. 1352-1354.
- Lattuada, D., C. Casnici, A. Venuto, and O. Marelli, 2002, The apoptotic effect of somatostatin analogue SMS 201-995 on human lymphocytes: *J.Neuroimmunol.*, v. 133, no. 1-2, p. 211-216.
- Lawnicka, H., H. Stepien, J. Wyczolkowska, B. Kolago, J. Kunert-Radek, and J. Komorowski, 2000, Effect of somatostatin and octreotide on proliferation and vascular endothelial growth factor secretion from murine endothelial cell line (HECa10) culture: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 268, no. 2, p. 567-571.
- Lazaridis, K. N., G. J. Gores, and K. D. Lindor, 2001, Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders': *J.Hepatol.*, v. 35, no. 1, p. 134-146.
- LeBlanc, H. N., and A. Ashkenazi, 2003, Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors: *Cell Death.Differ.*, v. 10, no. 1, p. 66-75.
- Lee, J. M., M. Trauner, C. J. Soroka, B. Stieger, P. J. Meier, and J. L. Boyer, 2000, Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat: *Gastroenterology*, v. 118, no. 1, p. 163-172.
- Lee, K. H., C. Feig, V. Tchikov, R. Schickel, C. Hallas, S. Schutze, M. E. Peter, and A. C. Chan, 2006, The role of receptor internalization in CD95 signaling: *EMBO J.*, v. 25, no. 5, p. 1009-1023.
- Lee, S. H. et al., 2001, Expression of Fas and Fas-related molecules in human hepatocellular carcinoma: *Hum.Pathol.*, v. 32, no. 3, p. 250-256.
- Lee, Y. M., and M. M. Kaplan, 2005, The natural history of PBC: has it changed?: *Semin.Liver Dis.*, v. 25, no. 3, p. 321-326.
- Leist, M., F. Gantner, I. Bohlinger, P. G. Germann, G. Tiegs, and A. Wendel, 1994, Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest: *J.Immunol.*, v. 153, no. 4, p. 1778-1788.

Lemasters, J. J., T. Qian, L. C. Trost, B. Herman, W. E. Cascio, C. A. Bradham, D. A. Brenner, and A. L. Nieminen, 1999, Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic and apoptotic cell death: *Biochem.Soc.Symp.*, v. 66, p. 205-222.

Leng, J., C. Han, A. J. Demetris, G. K. Michalopoulos, and T. Wu, 2003, Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis: *Hepatology*, v. 38, no. 3, p. 756-768.

Leung-Toung, R., W. Li, T. F. Tam, and K. Karimian, 2002, Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a review: *Curr.Med.Chem.*, v. 9, no. 9, p. 979-1002.

Leuschner, M., K. P. Maier, J. Schlichting, S. Strahl, G. Herrmann, H. H. Dahm, H. Ackermann, J. Happ, and U. Leuschner, 1999, Oral budesonide and ursodeoxycholic acid for treatment of primary biliary cirrhosis: results of a prospective double-blind trial: *Gastroenterology*, v. 117, no. 4, p. 918-925.

Leuschner, U., H. Fischer, W. Kurtz, S. Guldutuna, K. Hubner, A. Hellstern, M. Gatzten, and M. Leuschner, 1989, Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a controlled double-blind trial: *Gastroenterology*, v. 97, no. 5, p. 1268-1274.

Li, H., L. Bergeron, V. Cryns, M. S. Pasternack, H. Zhu, L. Shi, A. Greenberg, and J. Yuan, 1997, Activation of caspase-2 in apoptosis: *J.Biol.Chem.*, v. 272, no. 34, p. 21010-21017.

Li, H., H. Zhu, C. J. Xu, and J. Yuan, 1998, Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis: *Cell*, v. 94, no. 4, p. 491-501.

Li, J., C. Y. Huang, R. L. Zheng, K. R. Cui, and J. F. Li, 2000, Hydrogen peroxide induces apoptosis in human hepatoma cells and alters cell redox status: *Cell Biol.Int.*, v. 24, no. 1, p. 9-23.

Li, J., R. Zheng, J. Li, and Z. Wang, 2001a, Mechanisms of the induction of apoptosis in human hepatoma cells by tumour necrosis factor-alpha: *Cell Biol.Int.*, v. 25, no. 12, p. 1213-1219.

Li, L. Y., X. Luo, and X. Wang, 2001b, Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria: *Nature*, v. 412, no. 6842, p. 95-99.

Lian, Z., J. Liu, J. Pan, N. L. Satiroglu Tufan, M. Zhu, P. Arbuthnot, M. Kew, M. M. Clayton, and M. A. Feitelson, 2001, A cellular gene up-regulated by hepatitis B virus-encoded X antigen promotes hepatocellular growth and survival: *Hepatology*, v. 34, no. 1, p. 146-157.

Liedtke, C., J. Plumpe, S. Kubicka, C. A. Bradham, M. P. Manns, D. A. Brenner, and C. Trautwein, 2002, Jun kinase modulates tumor necrosis factor-dependent apoptosis in liver cells: *Hepatology*, v. 36, no. 2, p. 315-325.

- Lin, Y., W. Ma, and S. Benchimol, 2000, Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis: *Nat.Genet.*, v. 26, no. 1, p. 122-127.
- Lindor, K. D., 1997, Ursodiol for primary sclerosing cholangitis. Mayo Primary Sclerosing Cholangitis-Ursodeoxycholic Acid Study Group: *N.Engl.J.Med.*, v. 336, no. 10, p. 691-695.
- Lindor, K. D. et al., 1994, Ursodeoxycholic acid in the treatment of primary biliary cirrhosis: *Gastroenterology*, v. 106, no. 5, p. 1284-1290.
- Lindor, K. D., R. A. Jorgensen, T. M. Therneau, M. Malinchoc, and E. R. Dickson, 1997, Ursodeoxycholic acid delays the onset of esophageal varices in primary biliary cirrhosis: *Mayo Clin.Proc.*, v. 72, no. 12, p. 1137-1140.
- Liu, D., G. Martino, M. Thangaraju, M. Sharma, F. Halwani, S. H. Shen, Y. C. Patel, and C. B. Srikant, 2000, Caspase-8-mediated intracellular acidification precedes mitochondrial dysfunction in somatostatin-induced apoptosis: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 13, p. 9244-9250.
- Liu, H., C. Y. Qin, G. Q. Han, H. W. Xu, M. Meng, and Z. Yang, 2007, Mechanism of apoptotic effects induced selectively by ursodeoxycholic acid on human hepatoma cell lines: *World J.Gastroenterol.*, v. 13, no. 11, p. 1652-1658.
- Liu, H. L., L. Huo, and L. Wang, 2004, Octreotide inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells: *Acta Pharmacol.Sin.*, v. 25, no. 10, p. 1380-1386.
- Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, and X. Wang, 1996, Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c: *Cell*, v. 86, no. 1, p. 147-157.
- Llovet, J. M., and M. Beaugrand, 2003, Hepatocellular carcinoma: present status and future prospects: *J.Hepatol.*, v. 38 Suppl 1, p. S136-S149.
- Llovet, J. M., and J. Bruix, 2008a, Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma: *Hepatology*, v. 48, no. 4, p. 1312-1327.
- Llovet, J. M., and J. Bruix, 2008b, Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008: *J.Hepatol.*, v. 48 Suppl 1, p. S20-S37.
- Llovet, J. M., A. Burroughs, and J. Bruix, 2003, Hepatocellular carcinoma: *Lancet*, v. 362, no. 9399, p. 1907-1917.
- Llovet, J. M., J. Bustamante, A. Castells, R. Vilana, M. C. Ayuso, M. Sala, C. Bru, J. Rodes, and J. Bruix, 1999, Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials: *Hepatology*, v. 29, no. 1, p. 62-67.
- Llovet, J. M. et al., 2006, A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis: *Gastroenterology*, v. 131, no. 6, p. 1758-1767.

Locke, G. R., III, T. M. Therneau, J. Ludwig, E. R. Dickson, and K. D. Lindor, 1996, Time course of histological progression in primary biliary cirrhosis: *Hepatology*, v. 23, no. 1, p. 52-56.

Lotze, M. T., and K. J. Tracey, 2005, High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 5, no. 4, p. 331-342.

Lowe, S. W., E. M. Schmitt, S. W. Smith, B. A. Osborne, and T. Jacks, 1993, p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes: *Nature*, v. 362, no. 6423, p. 847-849.

Lu, X., M. Lee, T. Tran, and T. Block, 2005, High level expression of apoptosis inhibitor in hepatoma cell line expressing Hepatitis B virus: *Int.J.Med.Sci.*, v. 2, no. 1, p. 30-35.

Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang, 1998, Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors: *Cell*, v. 94, no. 4, p. 481-490.

Ma, Q., L. Q. Meng, J. C. Liu, J. P. Hu, J. Ge, Y. L. Wan, and S. Jiang, 2008, [Octreotide induces apoptosis of human hepatoma cells by the mechanism of facilitating the Fas/FasL gene expression therein]: *Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.*, v. 88, no. 10, p. 716-718.

MacKenzie, S. H., and A. C. Clark, 2008, Targeting cell death in tumors by activating caspases: *Curr.Cancer Drug Targets.*, v. 8, no. 2, p. 98-109.

Marsters, S. A., R. M. Pitti, C. J. Donahue, S. Ruppert, K. D. Bauer, and A. Ashkenazi, 1996, Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA: *Curr.Biol.*, v. 6, no. 6, p. 750-752.

Martin, D. A., R. M. Siegel, L. Zheng, and M. J. Lenardo, 1998, Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal: *J.Biol.Chem.*, v. 273, no. 8, p. 4345-4349.

Martin, D. P., R. E. Schmidt, P. S. DiStefano, O. H. Lowry, J. G. Carter, and E. M. Johnson, Jr., 1988, Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation: *J.Cell Biol.*, v. 106, no. 3, p. 829-844.

Martin, S. J., S. V. Lennon, A. M. Bonham, and T. G. Cotter, 1990, Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis: *J.Immunol.*, v. 145, no. 6, p. 1859-1867.

Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, 2002a, The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta: *Mol.Cell*, v. 10, no. 2, p. 417-426.

Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, 2002b, The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta: *Mol.Cell*, v. 10, no. 2, p. 417-426.

Martinon, F., K. Hofmann, and J. Tschopp, 2001, The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation: *Curr.Biol.*, v. 11, no. 4, p. R118-R120.

Massague, J., 2008, TGFbeta in Cancer: *Cell*, v. 134, no. 2, p. 215-230.

Mathai, J. P., M. Germain, and G. C. Shore, 2005, BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death: *J.Biol.Chem.*, v. 280, no. 25, p. 23829-23836.

Mathias, S., and R. Kolesnick, 1993, Ceramide: a novel second messenger: *Adv.Lipid Res.*, v. 25, p. 65-90.

Mela, M., A. Mancuso, and A. K. Burroughs, 2003, Review article: hepatocellular carcinoma: indications for liver transplantation: *Aliment.Pharmacol.Ther.*, v. 17 Suppl 2, p. 130-137.

Melet, A., K. Song, O. Bucur, Z. Jagani, A. R. Grassian, and R. Khosravi-Far, 2008, Apoptotic pathways in tumor progression and therapy: *Adv.Exp.Med.Biol.*, v. 615, p. 47-79.

Micheau, O., M. Thome, P. Schneider, N. Holler, J. Tschopp, D. W. Nicholson, C. Briand, and M. G. Grutter, 2002, The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex: *J.Biol.Chem.*, v. 277, no. 47, p. 45162-45171.

Micheau, O., and J. Tschopp, 2003, Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes: *Cell*, v. 114, no. 2, p. 181-190.

Michieli, P., M. Chedid, D. Lin, J. H. Pierce, W. E. Mercer, and D. Givol, 1994, Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway: *Cancer Res.*, v. 54, no. 13, p. 3391-3395.

Miller, L. K., 1999, An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs: *Trends Cell Biol.*, v. 9, no. 8, p. 323-328.

Mittl, P. R., M. S. Di, J. F. Krebs, X. Bai, D. S. Karanewsky, J. P. Priestle, K. J. Tomaselli, and M. G. Grutter, 1997, Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone: *J.Biol.Chem.*, v. 272, no. 10, p. 6539-6547.

Miura, T., R. Ouchida, N. Yoshikawa, K. Okamoto, Y. Makino, T. Nakamura, C. Morimoto, I. Makino, and H. Tanaka, 2001, Functional modulation of the glucocorticoid receptor and suppression of NF-kappaB-dependent transcription by ursodeoxycholic acid: *J.Biol.Chem.*, v. 276, no. 50, p. 47371-47378.

Mohammad, R. M., M. L. Varterasian, V. P. Almatchy, G. N. Hannoudi, G. R. Pettit, and A. Al-Katib, 1998, Successful treatment of human chronic lymphocytic leukemia xenografts with combination biological agents auristatin PE and bryostatin 1: *Clin.Cancer Res.*, v. 4, no. 5, p. 1337-1343.

- Monack, D. M., W. W. Navarre, and S. Falkow, 2001, Salmonella-induced macrophage death: the role of caspase-1 in death and inflammation: *Microbes.Infect.*, v. 3, no. 14-15, p. 1201-1212.
- Mott, J. L., and G. J. Gores, 2007, Piercing the armor of hepatobiliary cancer: Bcl-2 homology domain 3 (BH3) mimetics and cell death: *Hepatology*, v. 46, no. 3, p. 906-911.
- Murray, J., J. A. Barbara, S. A. Dunkley, A. F. Lopez, O. Van, X, A. M. Condliffe, I. Dransfield, C. Haslett, and E. R. Chilvers, 1997, Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro: *Blood*, v. 90, no. 7, p. 2772-2783.
- Murray, R. D., K. Kim, S. G. Ren, M. Chelly, Y. Umehara, and S. Melmed, 2004a, Central and peripheral actions of somatostatin on the growth hormone-IGF-I axis: *J.Clin.Invest*, v. 114, no. 3, p. 349-356.
- Murray, R. D., K. Kim, S. G. Ren, I. Lewis, G. Weckbecker, C. Bruns, and S. Melmed, 2004b, The novel somatostatin ligand (SOM230) regulates human and rat anterior pituitary hormone secretion: *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 89, no. 6, p. 3027-3032.
- Muzio, M. et al., 1996, FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex: *Cell*, v. 85, no. 6, p. 817-827.
- Muzio, M., B. R. Stockwell, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, and V. M. Dixit, 1998, An induced proximity model for caspase-8 activation: *J.Biol.Chem.*, v. 273, no. 5, p. 2926-2930.
- Nagata, S., and P. Golstein, 1995, The Fas death factor: *Science*, v. 267, no. 5203, p. 1449-1456.
- Naugler, W. E., and M. Karin, 2008, NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms: *Curr.Opin.Genet.Dev.*, v. 18, no. 1, p. 19-26.
- Nechushtan, A., C. L. Smith, I. Lamensdorf, S. H. Yoon, and R. J. Youle, 2001, Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis: *J.Cell Biol.*, v. 153, no. 6, p. 1265-1276.
- Neuman, M. G., 2001, Apoptosis in diseases of the liver: *Crit Rev.Clin.Lab Sci.*, v. 38, no. 2, p. 109-166.
- Neuveut, C., K. G. Low, F. Maldarelli, I. Schmitt, F. Majone, R. Grassmann, and K. T. Jeang, 1998, Human T-cell leukemia virus type 1 Tax and cell cycle progression: role of cyclin D-cdk and p110Rb: *Mol.Cell Biol.*, v. 18, no. 6, p. 3620-3632.
- Nguyen, J. T., and J. A. Wells, 2003, Direct activation of the apoptosis machinery as a mechanism to target cancer cells: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 100, no. 13, p. 7533-7538.

Nicholson, D. W., and N. A. Thornberry, 1997, Caspases: killer proteases: Trends Biochem.Sci., v. 22, no. 8, p. 299-306.

Nicotera, P., and S. Orrenius, 1998, The role of calcium in apoptosis: Cell Calcium, v. 23, no. 2-3, p. 173-180.

Nigg, E. A., 1995, Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle: Bioessays, v. 17, no. 6, p. 471-480.

Niwa, Y., H. Kanda, Y. Shikauchi, A. Saiura, K. Matsubara, T. Kitagawa, J. Yamamoto, T. Kubo, and H. Yoshikawa, 2005, Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma: Oncogene, v. 24, no. 42, p. 6406-6417.

Norman, J., J. Yang, G. Fink, G. Carter, G. Ku, W. Denham, and D. Livingston, 1997, Severity and mortality of experimental pancreatitis are dependent on interleukin-1 converting enzyme (ICE): J.Interferon Cytokine Res., v. 17, no. 2, p. 113-118.

Notas, G., M. Kampa, A. P. Nifli, K. Xidakis, D. Papasava, K. Thermos, E. Kouroumalis, and E. Castanas, 2007, The inhibitory effect of opioids on HepG2 cells is mediated via interaction with somatostatin receptors: Eur.J.Pharmacol., v. 555, no. 1, p. 1-7.

Notas, G., G. Kolios, N. Mastrodimou, M. Kampa, A. Vasilaki, C. Xidakis, E. Castanas, K. Thermos, and E. Kouroumalis, 2004, Cortistatin production by HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line and distribution of somatostatin receptors: J.Hepatol., v. 40, no. 5, p. 792-798.

O'Reilly, L. A. et al., 2002, Caspase-2 is not required for thymocyte or neuronal apoptosis even though cleavage of caspase-2 is dependent on both Apaf-1 and caspase-9: Cell Death.Differ., v. 9, no. 8, p. 832-841.

Oberg, K., 2001, Established clinical use of octreotide and lanreotide in oncology: Chemotherapy, v. 47 Suppl 2, p. 40-53.

Okano, H. et al., 2003, Cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein as a principal regulator of cell death and survival in human hepatocellular carcinoma: Lab Invest, v. 83, no. 7, p. 1033-1043.

Okun, I., K. V. Balakin, S. E. Tkachenko, and A. V. Ivachtchenko, 2008, Caspase activity modulators as anticancer agents: Anticancer Agents Med.Chem., v. 8, no. 3, p. 322-341.

Olias, G., C. Viollet, H. Kusserow, J. Epelbaum, and W. Meyerhof, 2004, Regulation and function of somatostatin receptors: J.Neurochem., v. 89, no. 5, p. 1057-1091.

Orrenius, S., D. J. McConkey, G. Bellomo, and P. Nicotera, 1989, Role of Ca²⁺ in toxic cell killing: Trends Pharmacol.Sci., v. 10, no. 7, p. 281-285.

Ortiz, C., L. Caja, P. Sancho, E. Bertran, and I. Fabregat, 2008, Inhibition of the EGF receptor blocks autocrine growth and increases the cytotoxic effects of doxorubicin in

rat hepatoma cells: role of reactive oxygen species production and glutathione depletion: *Biochem.Pharmacol.*, v. 75, no. 10, p. 1935-1945.

Otsuka, M., N. Kato, H. Taniguchi, H. Yoshida, T. Goto, Y. Shiratori, and M. Omata, 2002, Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression: *Virology*, v. 296, no. 1, p. 84-93.

Oyama, K., G. Shiota, H. Ito, Y. Murawaki, and H. Kawasaki, 2002, Reduction of hepatocarcinogenesis by ursodeoxycholic acid in rats: *Carcinogenesis*, v. 23, no. 5, p. 885-892.

Pages, P., N. Benali, N. Saint-Laurent, J. P. Esteve, A. V. Schally, J. Tkaczuk, N. Vaysse, C. Susini, and L. Buscail, 1999, sst2 somatostatin receptor mediates cell cycle arrest and induction of p27(Kip1). Evidence for the role of SHP-1: *J.Biol.Chem.*, v. 274, no. 21, p. 15186-15193.

Palma, J., H. Reyes, J. Ribalta, J. Iglesias, M. C. Gonzalez, I. Hernandez, C. Alvarez, C. Molina, and A. M. Danitz, 1992, Effects of ursodeoxycholic acid in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy: *Hepatology*, v. 15, no. 6, p. 1043-1047.

Papotti, M., M. Bongiovanni, M. Volante, E. Allia, S. Landolfi, L. Helboe, M. Schindler, S. L. Cole, and G. Bussolati, 2002, Expression of somatostatin receptor types 1-5 in 81 cases of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. A correlative immunohistochemical and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis: *Virchows Arch.*, v. 440, no. 5, p. 461-475.

Pares, A., L. Caballeria, and J. Rodes, 2006, Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic Acid: *Gastroenterology*, v. 130, no. 3, p. 715-720.

Pares, A. et al., 2000, Long-term effects of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a double-blind controlled multicentric trial. UDCA-Cooperative Group from the Spanish Association for the Study of the Liver: *J.Hepatol.*, v. 32, no. 4, p. 561-566.

Park, E., C. I. Kalunta, T. T. Nguyen, C. L. Wang, F. S. Chen, C. K. Lin, J. S. Kaptein, and P. M. Lad, 1996, TNF-alpha inhibits anti-IgM-mediated apoptosis in Ramos cells: *Exp.Cell Res.*, v. 226, no. 1, p. 1-10.

Park, H. H., and H. Wu, 2006, Crystal structure of RAIDD death domain implicates potential mechanism of PIDDosome assembly: *J.Mol.Biol.*, v. 357, no. 2, p. 358-364.

Park, I. H., M. K. Kim, and S. U. Kim, 2008, Ursodeoxycholic acid prevents apoptosis of mouse sensory neurons induced by cisplatin by reducing P53 accumulation: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 377, no. 4, p. 1025-1030.

Park, Y. H., J. A. Kim, J. H. Baek, E. J. Jung, T. H. Kim, H. Suh, M. H. Park, and K. W. Kim, 1997, Induction of apoptosis in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells by a novel derivative of ursodeoxycholic acid (UDCA): *Arch.Pharm.Res.*, v. 20, no. 1, p. 29-33.

- Paroni, G., C. Henderson, C. Schneider, and C. Brancolini, 2001, Caspase-2-induced apoptosis is dependent on caspase-9, but its processing during UV- or tumor necrosis factor-dependent cell death requires caspase-3: J.Biol.Chem., v. 276, no. 24, p. 21907-21915.**
- Paroni, G., C. Henderson, C. Schneider, and C. Brancolini, 2002, Caspase-2 can trigger cytochrome C release and apoptosis from the nucleus: J.Biol.Chem., v. 277, no. 17, p. 15147-15161.**
- Pasquali, D. et al., 2008, Effects of somatostatin analog SOM230 on cell proliferation, apoptosis, and catecholamine levels in cultured pheochromocytoma cells: J.Mol.Endocrinol., v. 40, no. 6, p. 263-271.**
- Patel, R. C. et al., 2002, Ligand binding to somatostatin receptors induces receptor-specific oligomer formation in live cells: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 99, no. 5, p. 3294-3299.**
- Patel, T., S. F. Bronk, and G. J. Gores, 1994, Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes: J.Clin.Invest, v. 94, no. 6, p. 2183-2192.**
- Patel, Y. C., 1997, Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes: J.Endocrinol.Invest, v. 20, no. 6, p. 348-367.**
- Patel, Y. C., 1999, Somatostatin and its receptor family: Front Neuroendocrinol., v. 20, no. 3, p. 157-198.**
- Patel, Y. C., and C. B. Srikant, 1994, Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5): Endocrinology, v. 135, no. 6, p. 2814-2817.**
- Paulovich, A. G., D. P. Toczyski, and L. H. Hartwell, 1997, When checkpoints fail: Cell, v. 88, no. 3, p. 315-321.**
- Paumgartner, G., and U. Beuers, 2002, Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited: Hepatology, v. 36, no. 3, p. 525-531.**
- Peluso, G., O. Petillo, M. A. Melone, G. Mazzeo, M. Ranieri, and G. F. Tajana, 1996, Modulation of cytokine production in activated human monocytes by somatostatin: Neuropeptides, v. 30, no. 5, p. 443-451.**
- Peter, M. E., and P. H. Kramer, 2003, The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond: Cell Death.Differ., v. 10, no. 1, p. 26-35.**
- Pfeiffer, M., T. Koch, H. Schroder, M. Klutzny, S. Kirscht, H. J. Kreienkamp, V. Hollt, and S. Schulz, 2001, Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A): J.Biol.Chem., v. 276, no. 17, p. 14027-14036.**

Pines, J., 1995, Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view: *Biochem.J.*, v. 308 (Pt 3), p. 697-711.

Pinton, P., D. Ferrari, P. Magalhaes, K. Schulze-Osthoff, V. F. Di, T. Pozzan, and R. Rizzuto, 2000, Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells: *J.Cell Biol.*, v. 148, no. 5, p. 857-862.

Pop, C., Y. R. Chen, B. Smith, K. Bose, B. Bobay, A. Tripathy, S. Franzen, and A. C. Clark, 2001, Removal of the pro-domain does not affect the conformation of the procaspase-3 dimer: *Biochemistry*, v. 40, no. 47, p. 14224-14235.

Poupon, R. E., B. Balkau, E. Eschwege, and R. Poupon, 1991, A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. UDCA-PBC Study Group: *N.Engl.J.Med.*, v. 324, no. 22, p. 1548-1554.

Poupon, R. E., A. M. Bonnard, Y. Chretien, and R. Poupon, 1999, Ten-year survival in ursodeoxycholic acid-treated patients with primary biliary cirrhosis. The UDCA-PBC Study Group: *Hepatology*, v. 29, no. 6, p. 1668-1671.

Poupon, R. E., Y. Chretien, R. Poupon, and G. Paumgartner, 1993, Serum bile acids in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid therapy: *Hepatology*, v. 17, no. 4, p. 599-604.

Poupon, R. E., P. M. Huet, R. Poupon, A. M. Bonnard, J. T. Nhieu, and E. S. Zafrani, 1996, A randomized trial comparing colchicine and ursodeoxycholic acid combination to ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. UDCA-PBC Study Group: *Hepatology*, v. 24, no. 5, p. 1098-1103.

Poupon, R. E., K. D. Lindor, K. Cauch-Dudek, E. R. Dickson, R. Poupon, and E. J. Heathcote, 1997, Combined analysis of randomized controlled trials of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: *Gastroenterology*, v. 113, no. 3, p. 884-890.

Poupon, R. E., R. Poupon, and B. Balkau, 1994, Ursodiol for the long-term treatment of primary biliary cirrhosis. The UDCA-PBC Study Group: *N.Engl.J.Med.*, v. 330, no. 19, p. 1342-1347.

Pusl, T., T. Vennegeerts, R. Wimmer, G. U. Denk, U. Beuers, and C. Rust, 2008, Tauroursodeoxycholic acid reduces bile acid-induced apoptosis by modulation of AP-1: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 367, no. 1, p. 208-212.

Qiao, L. et al., 2001, Deoxycholic acid (DCA) causes ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and FAS receptor in primary hepatocytes: inhibition of EGFR/mitogen-activated protein kinase-signaling module enhances DCA-induced apoptosis: *Mol.Biol.Cell*, v. 12, no. 9, p. 2629-2645.

Qiao, L., A. Yacoub, E. Studer, S. Gupta, X. Y. Pei, S. Grant, P. B. Hylemon, and P. Dent, 2002, Inhibition of the MAPK and PI3K pathways enhances UDCA-induced apoptosis in primary rodent hepatocytes: *Hepatology*, v. 35, no. 4, p. 779-789.

Qiao, L., H. Zhang, J. Yu, R. Francisco, P. Dent, M. P. Ebert, C. Rocken, and G. Farrell, 2006, Constitutive activation of NF-kappaB in human hepatocellular carcinoma: evidence of a cytoprotective role: *Hum.Gene Ther.*, v. 17, no. 3, p. 280-290.

Que, F. G., V. A. Phan, V. H. Phan, N. F. LaRusso, and G. J. Gores, 1999, GUDC inhibits cytochrome c release from human cholangiocyte mitochondria: *J.Surg.Res.*, v. 83, no. 2, p. 100-105.

Rabuffetti, M., C. Sciorati, G. Tarozzo, E. Clementi, A. A. Manfredi, and M. Beltramo, 2000, Inhibition of caspase-1-like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone induces long-lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines: *J.Neurosci.*, v. 20, no. 12, p. 4398-4404.

Raderer, M., M. H. Hejna, C. Muller, G. V. Kornek, A. Kurtaran, I. Virgolini, W. Fiebiger, G. Hamilton, and W. Scheithauer, 2000, Treatment of hepatocellular cancer with the long acting somatostatin analog lanreotide in vitro and in vivo: *Int.J.Oncol.*, v. 16, no. 6, p. 1197-1201.

Ramalho, R. M., R. J. Viana, W. C. Low, C. J. Steer, and C. M. Rodrigues, 2008, Bile acids and apoptosis modulation: an emerging role in experimental Alzheimer's disease: *Trends Mol.Med.*, v. 14, no. 2, p. 54-62.

Rau, B., A. Paszkowski, S. Lillich, K. Baumgart, P. Moller, and H. G. Beger, 2001, Differential effects of caspase-1/interleukin-1beta-converting enzyme on acinar cell necrosis and apoptosis in severe acute experimental pancreatitis: *Lab Invest*, v. 81, no. 7, p. 1001-1013.

Rautiainen, H., P. Karkkainen, A. L. Karvonen, H. Nurmi, P. Pikkarainen, H. Nuutinen, and M. Farkkila, 2005, Budesonide combined with UDCA to improve liver histology in primary biliary cirrhosis: a three-year randomized trial: *Hepatology*, v. 41, no. 4, p. 747-752.

Raynor, K., W. A. Murphy, D. H. Coy, J. E. Taylor, J. P. Moreau, K. Yasuda, G. I. Bell, and T. Reisine, 1993, Cloned somatostatin receptors: identification of subtype-selective peptides and demonstration of high affinity binding of linear peptides: *Mol.Pharmacol.*, v. 43, no. 6, p. 838-844.

Read, S. H., B. C. Baliga, P. G. Ekert, D. L. Vaux, and S. Kumar, 2002, A novel Apaf-1-independent putative caspase-2 activation complex: *J.Cell Biol.*, v. 159, no. 5, p. 739-745.

Reddy, S. A., J. H. Huang, and W. S. Liao, 2000, Phosphatidylinositol 3-kinase as a mediator of TNF-induced NF-kappa B activation: *J.Immunol.*, v. 164, no. 3, p. 1355-1363.

Reed, J. C. et al., 2003, Comparative analysis of apoptosis and inflammation genes of mice and humans: *Genome Res.*, v. 13, no. 6B, p. 1376-1388.

Reed, J. C., J. M. Jurgensmeier, and S. Matsuyama, 1998, Bcl-2 family proteins and mitochondria: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1366, no. 1-2, p. 127-137.

Reisine, T., and G. I. Bell, 1995, Molecular biology of somatostatin receptors: *Endocr.Rev.*, v. 16, no. 4, p. 427-442.

Ren, J. G., R. L. Zheng, Y. M. Shi, B. Gong, and J. F. Li, 1998, Apoptosis, redifferentiation and arresting proliferation simultaneously triggered by oxidative stress in human hepatoma cells: *Cell Biol.Int.*, v. 22, no. 1, p. 41-49.

Renatus, M., H. R. Stennicke, F. L. Scott, R. C. Liddington, and G. S. Salvesen, 2001, Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 98, no. 25, p. 14250-14255.

Renatus, M., Q. Zhou, H. R. Stennicke, S. J. Snipas, D. Turk, L. A. Bankston, R. C. Liddington, and G. S. Salvesen, 2000, Crystal structure of the apoptotic suppressor CrmA in its cleaved form: *Structure.*, v. 8, no. 7, p. 789-797.

Reubi, J. C., 2003, Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy: *Endocr.Rev.*, v. 24, no. 4, p. 389-427.

Reubi, J. C., U. Horisberger, and J. Laissue, 1994, High density of somatostatin receptors in veins surrounding human cancer tissue: role in tumor-host interaction?: *Int.J.Cancer*, v. 56, no. 5, p. 681-688.

Reubi, J. C., L. K. Kvols, B. Waser, D. M. Nagorney, P. U. Heitz, J. W. Charboneau, C. C. Reading, and C. Moertel, 1990, Detection of somatostatin receptors in surgical and percutaneous needle biopsy samples of carcinoids and islet cell carcinomas: *Cancer Res.*, v. 50, no. 18, p. 5969-5977.

Reubi, J. C., J. C. Schaer, B. Waser, C. Hoeger, and J. Rivier, 1998, A selective analog for the somatostatin sst1-receptor subtype expressed by human tumors: *Eur.J.Pharmacol.*, v. 345, no. 1, p. 103-110.

Reubi, J. C., and B. Waser, 2003, Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumours: molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting: *Eur.J.Nucl.Med.Mol.Imaging*, v. 30, no. 5, p. 781-793.

Reubi, J. C., B. Waser, J. C. Schaer, and J. A. Laissue, 2001, Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands: *Eur.J.Nucl.Med.*, v. 28, no. 7, p. 836-846.

Reubi, J. C., A. Zimmermann, S. Jonas, B. Waser, P. Neuhaus, U. Laderach, and B. Wiedenmann, 1999, Regulatory peptide receptors in human hepatocellular carcinomas: *Gut*, v. 45, no. 5, p. 766-774.

Reynaert, H., K. Rombouts, Y. Jia, D. Urbain, N. Chatterjee, N. Uyama, and A. Geerts, 2005, Somatostatin at nanomolar concentration reduces collagen I and III synthesis by, but not proliferation of activated rat hepatic stellate cells: *Br.J.Pharmacol.*, v. 146, no. 1, p. 77-88.

Reynaert, H., K. Rombouts, A. Vandermonde, D. Urbain, U. Kumar, P. Bioulac-Sage, M. Pinzani, J. Rosenbaum, and A. Geerts, 2004, Expression of somatostatin receptors

in normal and cirrhotic human liver and in hepatocellular carcinoma: *Gut*, v. 53, no. 8, p. 1180-1189.

Riedl, S. J., M. Renatus, R. Schwarzenbacher, Q. Zhou, C. Sun, S. W. Fesik, R. C. Liddington, and G. S. Salvesen, 2001, Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP: *Cell*, v. 104, no. 5, p. 791-800.

Rizzuto, R., M. Brini, M. Murgia, and T. Pozzan, 1993, Microdomains with high Ca^{2+} close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria: *Science*, v. 262, no. 5134, p. 744-747.

Robertson, J. D., M. Enoksson, M. Suomela, B. Zhivotovsky, and S. Orrenius, 2002, Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis: *J.Biol.Chem.*, v. 277, no. 33, p. 29803-29809.

Robertson, J. D., V. Gogvadze, A. Kropotov, H. Vakifahmetoglu, B. Zhivotovsky, and S. Orrenius, 2004, Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity: *EMBO Rep.*, v. 5, no. 6, p. 643-648.

Rochaix, P., N. Delesque, J. P. Esteve, N. Saint-Laurent, J. J. Voight, N. Vaysse, C. Susini, and L. Buscail, 1999, Gene therapy for pancreatic carcinoma: local and distant antitumor effects after somatostatin receptor sst2 gene transfer: *Hum.Gene Ther.*, v. 10, no. 6, p. 995-1008.

Rocheville, M., D. C. Lange, U. Kumar, R. Sasi, R. C. Patel, and Y. C. Patel, 2000, Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 11, p. 7862-7869.

Rodrigues, C. M., G. Fan, X. Ma, B. T. Kren, and C. J. Steer, 1998a, A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation: *J.Clin.Invest*, v. 101, no. 12, p. 2790-2799.

Rodrigues, C. M., G. Fan, P. Y. Wong, B. T. Kren, and C. J. Steer, 1998b, Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production: *Mol.Med.*, v. 4, no. 3, p. 165-178.

Rodrigues, C. M., X. Ma, C. Linehan-Stieers, G. Fan, B. T. Kren, and C. J. Steer, 1999, Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation: *Cell Death.Differ.*, v. 6, no. 9, p. 842-854.

Rodrigues, C. M., S. Sola, Z. Nan, R. E. Castro, P. S. Ribeiro, W. C. Low, and C. J. Steer, 2003, Tauroursodeoxycholic acid reduces apoptosis and protects against neurological injury after acute hemorrhagic stroke in rats: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 100, no. 10, p. 6087-6092.

Rodrigues, C. M., S. R. Spellman, S. Sola, A. W. Grande, C. Linehan-Stieers, W. C. Low, and C. J. Steer, 2002, Neuroprotection by a bile acid in an acute stroke model in the rat: *J.Cereb.Blood Flow Metab*, v. 22, no. 4, p. 463-471.

Rodrigues, C. M., and C. J. Steer, 2000, Mitochondrial membrane perturbations in cholestasis: *J.Hepatol.*, v. 32, no. 1, p. 135-141.

Rolo, A. P., C. M. Palmeira, J. M. Holy, and K. B. Wallace, 2004, Role of mitochondrial dysfunction in combined bile acid-induced cytotoxicity: the switch between apoptosis and necrosis: *Toxicol.Sci.*, v. 79, no. 1, p. 196-204.

Roskopf, D., M. Schurks, I. Manthey, M. Joisten, S. Busch, and W. Siffert, 2003, Signal transduction of somatostatin in human B lymphoblasts: *Am.J.Physiol Cell Physiol*, v. 284, no. 1, p. C179-C190.

Rothe, M., V. Sarma, V. M. Dixit, and D. V. Goeddel, 1995, TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40: *Science*, v. 269, no. 5229, p. 1424-1427.

Rothe, M., S. C. Wong, W. J. Henzel, and D. V. Goeddel, 1994, A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor: *Cell*, v. 78, no. 4, p. 681-692.

Rotonda, J. et al., 1996, The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis: *Nat.Struct.Biol.*, v. 3, no. 7, p. 619-625.

Roy, N., Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen, and J. C. Reed, 1997, The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases: *EMBO J.*, v. 16, no. 23, p. 6914-6925.

Rubin, R. A., T. E. Kowalski, M. Khandelwal, and P. F. Malet, 1994, Ursodiol for hepatobiliary disorders: *Ann.Intern.Med.*, v. 121, no. 3, p. 207-218.

Rubinstein, L. V., R. H. Shoemaker, K. D. Paull, R. M. Simon, S. Tosini, P. Skehan, D. A. Scudiero, A. Monks, and M. R. Boyd, 1990, Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines: *J.Natl.Cancer Inst.*, v. 82, no. 13, p. 1113-1118.

Ruggieri, A., M. Murdolo, T. Harada, T. Miyamura, and M. Rapicetta, 2004, Cell cycle perturbation in a human hepatoblastoma cell line constitutively expressing Hepatitis C virus core protein: *Arch.Virol.*, v. 149, no. 1, p. 61-74.

Russell, J. H., V. R. Masakowski, and C. B. Dobos, 1980, Mechanisms of immune lysis. I. Physiological distinction between target cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes and antibody plus complement: *J.Immunol.*, v. 124, no. 3, p. 1100-1105.

Rust, C., L. M. Karnitz, C. V. Paya, J. Moscat, R. D. Simari, and G. J. Gores, 2000, The bile acid taurochenodeoxycholate activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 26, p. 20210-20216.

Rustgi, V. K., 1987, Epidemiology of hepatocellular carcinoma: *Gastroenterol.Clin.North Am.*, v. 16, no. 4, p. 545-551.

Saito, I. et al., 1990, Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 87, no. 17, p. 6547-6549.

Saleh, M. et al., 2004, Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms: *Nature*, v. 429, no. 6987, p. 75-79.

Salomons, G. S., H. J. Brady, M. Verwijs-Janssen, J. D. Van Den Berg, A. A. Hart, H. Van Den Berg, H. Behrendt, K. Hahlen, and L. A. Smets, 1997, The Bax alpha:Bcl-2 ratio modulates the response to dexamethasone in leukaemic cells and is highly variable in childhood acute leukaemia: *Int.J.Cancer*, v. 71, no. 6, p. 959-965.

Salvesen, G. S., and J. M. Abrams, 2004, Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies: *Oncogene*, v. 23, no. 16, p. 2774-2784.

Samali, A., H. Nordgren, B. Zhivotovsky, E. Peterson, and S. Orrenius, 1999a, A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 255, no. 1, p. 6-11.

Samali, A., B. Zhivotovsky, D. Jones, S. Nagata, and S. Orrenius, 1999b, Apoptosis: cell death defined by caspase activation: *Cell Death.Differ.*, v. 6, no. 6, p. 495-496.

Samonakis, D. N., J. Moschandreas, T. Arnaoutis, P. Skordilis, C. Leontidis, I. Vafiades, and E. Kouroumalis, 2002, Treatment of hepatocellular carcinoma with long acting somatostatin analogues: *Oncol.Rep.*, v. 9, no. 4, p. 903-907.

Samonakis, D. N., G. Notas, N. Christodoulakis, and E. A. Kouroumalis, 2008, Mechanisms of action and resistance of somatostatin analogues for the treatment of hepatocellular carcinoma: a message not well taken: *Dig.Dis.Sci.*, v. 53, no. 9, p. 2359-2365.

Sauer, P., C. Benz, G. Rudolph, P. Kloters-Plachky, W. Stremmel, and A. Stiehl, 1999, Influence of cholestasis on absorption of ursodeoxycholic acid: *Dig.Dis.Sci.*, v. 44, no. 4, p. 817-822.

Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer, and M. E. Peter, 1998, Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways: *EMBO J.*, v. 17, no. 6, p. 1675-1687.

Scaffidi, C., F. C. Kischkel, P. H. Krammer, and M. E. Peter, 2000, Analysis of the CD95 (APO-1/Fas) death-inducing signaling complex by high-resolution two-dimensional gel electrophoresis: *Methods Enzymol.*, v. 322, p. 363-373.

Scaffidi, C., P. H. Krammer, and M. E. Peter, 1999a, Isolation and analysis of components of CD95 (APO-1/Fas) death-inducing signaling complex: *Methods*, v. 17, no. 4, p. 287-291.

Scaffidi, C., J. P. Medema, P. H. Krammer, and M. E. Peter, 1997, FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b: *J.Biol.Chem.*, v. 272, no. 43, p. 26953-26958.

Scaffidi, C., I. Schmitz, P. H. Krammer, and M. E. Peter, 1999b, The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis: *J.Biol.Chem.*, v. 274, no. 3, p. 1541-1548.

Scaffidi, C., I. Schmitz, J. Zha, S. J. Korsmeyer, P. H. Krammer, and M. E. Peter, 1999c, Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells: *J.Biol.Chem.*, v. 274, no. 32, p. 22532-22538.

Scaffidi, P., T. Misteli, and M. E. Bianchi, 2002, Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation: *Nature*, v. 418, no. 6894, p. 191-195.

Schafer, K. A., 1998, The cell cycle: a review: *Vet.Pathol.*, v. 35, no. 6, p. 461-478.

Schally, A. V., 1988, Oncological applications of somatostatin analogues: *Cancer Res.*, v. 48, no. 24 Pt 1, p. 6977-6985.

Schimmer, A. D. et al., 2004, Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor XIAP exhibit broad antitumor activity: *Cancer Cell*, v. 5, no. 1, p. 25-35.

Schliess, F., A. K. Kurz, D. S. vom, and D. Haussinger, 1997, Mitogen-activated protein kinases mediate the stimulation of bile acid secretion by tauroursodeoxycholate in rat liver: *Gastroenterology*, v. 113, no. 4, p. 1306-1314.

Schmid, H. A., and P. Schoeffter, 2004, Functional activity of the multiligand analog SOM230 at human recombinant somatostatin receptor subtypes supports its usefulness in neuroendocrine tumors: *Neuroendocrinology*, v. 80 Suppl 1, p. 47-50.

Schneider-Brachert, W. et al., 2004, Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles: *Immunity*, v. 21, no. 3, p. 415-428.

Schoemaker, M. H., d. I. R. Conde, M. Buist-Homan, T. E. Vrenken, R. Havinga, K. Poelstra, H. J. Haisma, P. L. Jansen, and H. Moshage, 2004, Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways: *Hepatology*, v. 39, no. 6, p. 1563-1573.

Schulze-Osthoff, K., A. C. Bakker, B. Vanhaesebroeck, R. Beyaert, W. A. Jacob, and W. Fiers, 1992, Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation: *J.Biol.Chem.*, v. 267, no. 8, p. 5317-5323.

Schulze-Osthoff, K., R. Beyaert, V. Vandevorode, G. Haegeman, and W. Fiers, 1993, Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF: *EMBO J.*, v. 12, no. 8, p. 3095-3104.

Schwartz, J. D., and A. S. Beutler, 2004, Therapy for unresectable hepatocellular carcinoma: review of the randomized clinical trials-II: systemic and local non-embolization-based therapies in unresectable and advanced hepatocellular carcinoma: *Anticancer Drugs*, v. 15, no. 5, p. 439-452.

Schwartz, M., 2004, Liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: *Liver Transpl.*, v. 10, no. 2 Suppl 1, p. S81-S85.

Schweizer, A., C. Briand, and M. G. Grutter, 2003, Crystal structure of caspase-2, apical initiator of the intrinsic apoptotic pathway: *J.Biol.Chem.*, v. 278, no. 43, p. 42441-42447.

Scorrano, L., S. A. Oakes, J. T. Opferman, E. H. Cheng, M. D. Sorcinelli, T. Pozzan, and S. J. Korsmeyer, 2003, BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis: *Science*, v. 300, no. 5616, p. 135-139.

Sharma, K., Y. C. Patel, and C. B. Srikant, 1996, Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3: *Mol.Endocrinol.*, v. 10, no. 12, p. 1688-1696.

Sharma, K., and C. B. Srikant, 1998, G protein coupled receptor signaled apoptosis is associated with activation of a cation insensitive acidic endonuclease and intracellular acidification: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 242, no. 1, p. 134-140.

Sherr, C. J., and J. M. Roberts, 1995, Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases: *Genes Dev.*, v. 9, no. 10, p. 1149-1163.

Shi, J., C. Wu, Y. Lin, Y. X. Chen, L. Zhu, and W. F. Xie, 2006, Long-term effects of mid-dose ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: a meta-analysis of randomized controlled trials: *Am.J.Gastroenterol.*, v. 101, no. 7, p. 1529-1538.

Shi, Y. H., W. X. Ding, J. Zhou, J. Y. He, Y. Xu, A. A. Gambotto, H. Rabinowich, J. Fan, and X. M. Yin, 2008, Expression of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein in hepatocellular carcinoma promotes metastasis and tumor recurrence: *Hepatology*, v. 48, no. 2, p. 497-507.

Shikama, Y., U M, T. Miyashita, and M. Yamada, 2001, Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases: *Exp.Cell Res.*, v. 264, no. 2, p. 315-325.

Shimizu, S., M. Narita, and Y. Tsujimoto, 1999, Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC: *Nature*, v. 399, no. 6735, p. 483-487.

Shimon, I., J. E. Taylor, J. Z. Dong, R. A. Bitonte, S. Kim, B. Morgan, D. H. Coy, M. D. Culler, and S. Melmed, 1997, Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary cultures. Differential role of SSTR2 and SSTR5 for growth hormone, thyroid-stimulating hormone, and prolactin regulation: *J.Clin.Invest*, v. 99, no. 4, p. 789-798.

Shin, E. C., J. S. Shin, J. H. Park, J. J. Kim, H. Kim, and S. J. Kim, 1998, Expression of Fas-related genes in human hepatocellular carcinomas: *Cancer Lett.*, v. 134, no. 2, p. 155-162.

Shiozaki, E. N., J. Chai, D. J. Rigotti, S. J. Riedl, P. Li, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, R. Fairman, and Y. Shi, 2003, Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9: *Mol.Cell*, v. 11, no. 2, p. 519-527.

Shiraki, K. et al., 2005a, Different effects of bile acids, ursodeoxycholic acid and deoxycholic acid, on cell growth and cell death in human colonic adenocarcinoma cells: *Int.J.Mol.Med.*, v. 16, no. 4, p. 729-733.

Shiraki, K., T. Yamanaka, H. Inoue, T. Kawakita, N. Enokimura, H. Okano, K. Sugimoto, K. Murata, and T. Nakano, 2005b, Expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human hepatocellular carcinoma: *Int.J.Oncol.*, v. 26, no. 5, p. 1273-1281.

Shub, D. A., 1994, Bacterial viruses. Bacterial altruism?: *Curr.Biol.*, v. 4, no. 6, p. 555-556.

Siegel, J. L., R. Jorgensen, P. Angulo, and K. D. Lindor, 2003, Treatment with ursodeoxycholic acid is associated with weight gain in patients with primary biliary cirrhosis: *J.Clin.Gastroenterol.*, v. 37, no. 2, p. 183-185.

Sieghart, W. et al., 2006, Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy: *J.Hepatol.*, v. 44, no. 1, p. 151-157.

Skehan, P. et al., 1990, New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening: *J.Natl.Cancer Inst.*, v. 82, no. 13, p. 1107-1112.

Skulachev, V. P., 1998, Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades: *FEBS Lett.*, v. 423, no. 3, p. 275-280.

Slee, E. A. et al., 1999, Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner: *J.Cell Biol.*, v. 144, no. 2, p. 281-292.

Slijkhuis, W. A., L. Stadheim, Z. M. Hassoun, U. C. Nzeako, W. K. Kremers, J. A. Talwalkar, and G. J. Gores, 2005, Octreotide therapy for advanced hepatocellular carcinoma: *J.Clin.Gastroenterol.*, v. 39, no. 4, p. 333-338.

Smalley, K. S., W. Feniuk, L. A. Sellers, and P. P. Humphrey, 1999, The pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in the human somatostatin sst(4) receptor-mediated stimulation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase and extracellular acidification: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 263, no. 1, p. 239-243.

Sohn, J., V. I. Khaoustov, Q. Xie, C. C. Chung, B. Krishnan, and B. Yoffe, 2003, The effect of ursodeoxycholic acid on the survivin in thapsigargin-induced apoptosis: *Cancer Lett.*, v. 191, no. 1, p. 83-92.

Sola, S., J. D. Amaral, R. E. Castro, R. M. Ramalho, P. M. Borralho, B. T. Kren, H. Tanaka, C. J. Steer, and C. M. Rodrigues, 2005, Nuclear translocation of UDCA by the glucocorticoid receptor is required to reduce TGF-beta1-induced apoptosis in rat hepatocytes: *Hepatology*, v. 42, no. 4, p. 925-934.

Sola, S., R. E. Castro, B. T. Kren, C. J. Steer, and C. M. Rodrigues, 2004, Modulation of nuclear steroid receptors by ursodeoxycholic acid inhibits TGF-beta1-induced E2F-1/p53-mediated apoptosis of rat hepatocytes: *Biochemistry*, v. 43, no. 26, p. 8429-8438.

Sola, S., R. E. Castro, P. A. Laires, C. J. Steer, and C. M. Rodrigues, 2003a, Tauroursodeoxycholic acid prevents amyloid-beta peptide-induced neuronal death via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling pathway: *Mol.Med.*, v. 9, no. 9-12, p. 226-234.

Sola, S., X. Ma, R. E. Castro, B. T. Kren, C. J. Steer, and C. M. Rodrigues, 2003b, Ursodeoxycholic acid modulates E2F-1 and p53 expression through a caspase-independent mechanism in transforming growth factor beta1-induced apoptosis of rat hepatocytes: *J.Biol.Chem.*, v. 278, no. 49, p. 48831-48838.

Song, T. J., E. W. Ip, and Y. Fong, 2004, Hepatocellular carcinoma: current surgical management: *Gastroenterology*, v. 127, no. 5 Suppl 1, p. S248-S260.

Sprick, M. R., E. Rieser, H. Stahl, A. Grosse-Wilde, M. A. Weigand, and H. Walczak, 2002, Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8: *EMBO J.*, v. 21, no. 17, p. 4520-4530.

Srikant, C. B., 1995, Cell cycle dependent induction of apoptosis by somatostatin analog SMS 201-995 in AtT-20 mouse pituitary cells: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 209, no. 2, p. 400-406.

Srinivasula, S. M. et al., 2001, A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis: *Nature*, v. 410, no. 6824, p. 112-116.

Stanger, B. Z., P. Leder, T. H. Lee, E. Kim, and B. Seed, 1995, RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death: *Cell*, v. 81, no. 4, p. 513-523.

Stefani, M., and C. M. Dobson, 2003, Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution: *J.Mol.Med.*, v. 81, no. 11, p. 678-699.

Stefanis, L., C. M. Troy, H. Qi, M. L. Shelanski, and L. A. Greene, 1998, Caspase-2 (Nedd-2) processing and death of trophic factor-deprived PC12 cells and sympathetic neurons occur independently of caspase-3 (CPP32)-like activity: *J.Neurosci.*, v. 18, no. 22, p. 9204-9215.

Stiehl, A., S. Walker, L. Stiehl, G. Rudolph, W. J. Hofmann, and L. Theilmann, 1994, Effect of ursodeoxycholic acid on liver and bile duct disease in primary sclerosing cholangitis. A 3-year pilot study with a placebo-controlled study period: *J.Hepatol.*, v. 20, no. 1, p. 57-64.

Stockwell, B. R., 2000, Chemical genetics: ligand-based discovery of gene function: *Nat.Rev.Genet.*, v. 1, no. 2, p. 116-125.

Strasser, A., A. W. Harris, D. C. Huang, P. H. Krammer, and S. Cory, 1995, Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis: *EMBO J.*, v. 14, no. 24, p. 6136-6147.

Suda, T., T. Takahashi, P. Golstein, and S. Nagata, 1993, Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family: *Cell*, v. 75, no. 6, p. 1169-1178.

Sugiyama, T., S. Shimizu, Y. Matsuoka, Y. Yoneda, and Y. Tsujimoto, 2002, Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by pro-apoptotic BH3-only protein Bim: *Oncogene*, v. 21, no. 32, p. 4944-4956.

Sun, X. M., M. MacFarlane, J. Zhuang, B. B. Wolf, D. R. Green, and G. M. Cohen, 1999, Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis: *J.Biol.Chem.*, v. 274, no. 8, p. 5053-5060.

Susin, S. A. et al., 1999, Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor: *Nature*, v. 397, no. 6718, p. 441-446.

Susin, S. A., N. Zamzami, and G. Kroemer, 1998, Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1366, no. 1-2, p. 151-165.

Susini, C., and L. Buscail, 2006, Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents: *Ann.Oncol.*, v. 17, no. 12, p. 1733-1742.

Suzuki, A., M. Hayashida, H. Kawano, K. Sugimoto, T. Nakano, and K. Shiraki, 2000, Hepatocyte growth factor promotes cell survival from fas-mediated cell death in hepatocellular carcinoma cells via Akt activation and Fas-death-inducing signaling complex suppression: *Hepatology*, v. 32, no. 4 Pt 1, p. 796-802.

Suzuki, Y., Y. Imai, H. Nakayama, K. Takahashi, K. Takio, and R. Takahashi, 2001, A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death: *Mol.Cell*, v. 8, no. 3, p. 613-621.

Swanton, C., and N. Jones, 2001, Strategies in subversion: de-regulation of the mammalian cell cycle by viral gene products: *Int.J.Exp.Pathol.*, v. 82, no. 1, p. 3-13.

Szabadkai, G., A. M. Simoni, M. Chami, M. R. Wieckowski, R. J. Youle, and R. Rizzuto, 2004, Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca²⁺ waves and protects against Ca²⁺-mediated apoptosis: *Mol.Cell*, v. 16, no. 1, p. 59-68.

Takahashi, M., H. Saito, T. Okuyama, T. Miyashita, M. Kosuga, F. Sumisa, M. Yamada, H. Ebinuma, and H. Ishii, 1999, Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis: *J.Hepatol.*, v. 31, no. 2, p. 315-322.

Takeda, Y. et al., 2001, Geranylgeraniol, an intermediate product in mevalonate pathway, induces apoptotic cell death in human hepatoma cells: death receptor-independent activation of caspase-8 with down-regulation of Bcl-xL expression: *Jpn.J.Cancer Res.*, v. 92, no. 9, p. 918-925.

Takehara, T., X. Liu, J. Fujimoto, S. L. Friedman, and H. Takahashi, 2001, Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas: *Hepatology*, v. 34, no. 1, p. 55-61.

Takikawa, Y., H. Miyoshi, C. Rust, P. Roberts, R. Siegel, P. K. Mandal, R. E. Millikan, and G. J. Gores, 2001, The bile acid-activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway inhibits Fas apoptosis upstream of bid in rodent hepatocytes: *Gastroenterology*, v. 120, no. 7, p. 1810-1817.

Talanian, R. V., L. C. Dang, C. R. Ferenz, M. C. Hackett, J. A. Mankovich, J. P. Welch, W. W. Wong, and K. D. Brady, 1996, Stability and oligomeric equilibria of refolded interleukin-1beta converting enzyme: *J.Biol.Chem.*, v. 271, no. 36, p. 21853-21858.

Talanian, R. V., C. Quinlan, S. Trautz, M. C. Hackett, J. A. Mankovich, D. Banach, T. Ghayur, K. D. Brady, and W. W. Wong, 1997, Substrate specificities of caspase family proteases: *J.Biol.Chem.*, v. 272, no. 15, p. 9677-9682.

Tam, S. W., A. M. Theodoras, J. W. Shay, G. F. Draetta, and M. Pagano, 1994, Differential expression and regulation of Cyclin D1 protein in normal and tumor human cells: association with Cdk4 is required for Cyclin D1 function in G1 progression: *Oncogene*, v. 9, no. 9, p. 2663-2674.

Tamm, I. et al., 2003, Peptides targeting caspase inhibitors: *J.Biol.Chem.*, v. 278, no. 16, p. 14401-14405.

Tan, T. T., and L. M. Coussens, 2007, Humoral immunity, inflammation and cancer: *Curr.Opin.Immunol.*, v. 19, no. 2, p. 209-216.

Tan, T. T., and E. White, 2008, Therapeutic targeting of death pathways in cancer: mechanisms for activating cell death in cancer cells: *Adv.Exp.Med.Biol.*, v. 615, p. 81-104.

Tang, C., C. Wang, and L. Tang, 2003, Effects of combined octreotide and aspirin on the growth of gastric cancer: *Chin Med.J.(Engl.)*, v. 116, no. 3, p. 373-377.

Tarao, K., S. Fujiyama, S. Ohkawa, K. Miyakawa, S. Tamai, S. Hirokawa, T. Masaki, and K. Tanaka, 2005, Ursodiol use is possibly associated with lower incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-associated liver cirrhosis: *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, v. 14, no. 1, p. 164-169.

Tartaglia, L. A., T. M. Ayres, G. H. Wong, and D. V. Goeddel, 1993, A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death: *Cell*, v. 74, no. 5, p. 845-853.

Teijeiro, R., R. Rios, J. A. Costoya, R. Castro, J. L. Bello, J. Devesa, and V. M. Arce, 2002, Activation of human somatostatin receptor 2 promotes apoptosis through a mechanism that is independent from induction of p53: *Cell Physiol Biochem.*, v. 12, no. 1, p. 31-38.

Teitz, T. et al., 2000, Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN: *Nat.Med.*, v. 6, no. 5, p. 529-535.

ter Borg, P. C., S. W. Schalm, B. E. Hansen, and H. R. van Buuren, 2006, Prognosis of ursodeoxycholic Acid-treated patients with primary biliary cirrhosis. Results of a 10-

yr cohort study involving 297 patients: *Am.J.Gastroenterol.*, v. 101, no. 9, p. 2044-2050.

Tewari, M., L. T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D. R. Beidler, G. G. Poirier, G. S. Salvesen, and V. M. Dixit, 1995, Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase: *Cell*, v. 81, no. 5, p. 801-809.

Thomas, M. B., and A. X. Zhu, 2005, Hepatocellular carcinoma: the need for progress: *J.Clin.Oncol.*, v. 23, no. 13, p. 2892-2899.

Thome, M. et al., 1997, Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors: *Nature*, v. 386, no. 6624, p. 517-521.

Thompson, E. B., 1998, The many roles of c-Myc in apoptosis: *Annu.Rev.Physiol*, v. 60, p. 575-600.

Thorgeirsson, S. S., and J. W. Grisham, 2002, Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma: *Nat.Genet.*, v. 31, no. 4, p. 339-346.

Thornberry, N. A. et al., 1992, A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes: *Nature*, v. 356, no. 6372, p. 768-774.

Thornberry, N. A., and Y. Lazebnik, 1998, Caspases: enemies within: *Science*, v. 281, no. 5381, p. 1312-1316.

Thornberry, N. A. et al., 1997, A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis: *J.Biol.Chem.*, v. 272, no. 29, p. 17907-17911.

Tinel, A., and J. Tschopp, 2004, The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress: *Science*, v. 304, no. 5672, p. 843-846.

Toker, A., and L. C. Cantley, 1997, Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase: *Nature*, v. 387, no. 6634, p. 673-676.

Totpal, K., R. LaPushin, T. Kohno, B. G. Darnay, and B. B. Aggarwal, 1994, TNF and its receptor antibody agonist differ in mediation of cellular responses: *J.Immunol.*, v. 153, no. 5, p. 2248-2257.

Troy, C. M., and M. L. Shelanski, 2003, Caspase-2 redux: *Cell Death.Differ.*, v. 10, no. 1, p. 101-107.

Tulipano, G. et al., 2001, Differential inhibition of growth hormone secretion by analogs selective for somatostatin receptor subtypes 2 and 5 in human growth-hormone-secreting adenoma cells in vitro: *Neuroendocrinology*, v. 73, no. 5, p. 344-351.

Valatas, V., G. Kolios, P. Manousou, G. Notas, C. Xidakis, I. Diamantis, and E. Kouroumalis, 2004a, Octreotide regulates CC but not CXC LPS-induced chemokine secretion in rat Kupffer cells: *Br.J.Pharmacol.*, v. 141, no. 3, p. 477-487.

Valatas, V., G. Kolios, P. Manousou, C. Xidakis, G. Notas, D. Ljumovic, and E. A. Kouroumalis, 2004b, Secretion of inflammatory mediators by isolated rat Kupffer cells: the effect of octreotide: *Regul.Pept.*, v. 120, no. 1-3, p. 215-225.

Van de Craen, M. et al., 1997, Characterization of seven murine caspase family members: *FEBS Lett.*, v. 403, no. 1, p. 61-69.

Van Nieuwkerk, C. M., R. P. Elferink, A. K. Groen, R. Ottenhoff, G. N. Tytgat, K. P. Dingemans, Van Den Bergh Weerman MA, and G. J. Offerhaus, 1996, Effects of Ursodeoxycholate and cholate feeding on liver disease in FVB mice with a disrupted *mdr2* P-glycoprotein gene: *Gastroenterology*, v. 111, no. 1, p. 165-171.

van, G. M., N. Festjens, L. G. van, X. Saelens, and P. Vandenabeele, 2003, Mitochondrial intermembrane proteins in cell death: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 304, no. 3, p. 487-497.

Vanden Berghe, T., M. Kalai, G. Denecker, A. Meeus, X. Saelens, and P. Vandenabeele, 2006, Necrosis is associated with IL-6 production but apoptosis is not: *Cell Signal.*, v. 18, no. 3, p. 328-335.

Vandenabeele, P., T. Vanden Berghe, and N. Festjens, 2006, Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways: *Sci.STKE.*, v. 2006, no. 358, p. e44.

Vanhaesebroeck, B., J. C. Reed, V. D. De, J. Grooten, T. Miyashita, S. Tanaka, R. Beyaert, R. F. Van, and W. Fiers, 1993, Effect of *bcl-2* proto-oncogene expression on cellular sensitivity to tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity: *Oncogene*, v. 8, no. 4, p. 1075-1081.

Varela, M., M. Sala, J. M. Llovet, and J. Bruix, 2003, Review article: natural history and prognostic prediction of patients with hepatocellular carcinoma: *Aliment.Pharmacol.Ther.*, v. 17 Suppl 2, p. 98-102.

Varfolomeev, E., and D. Vucic, 2008, (Un)expected roles of c-IAPs in apoptotic and NFkappaB signaling pathways: *Cell Cycle*, v. 7, no. 11, p. 1511-1521.

Varfolomeev, E. E. et al., 1998, Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally: *Immunity.*, v. 9, no. 2, p. 267-276.

Vaux, D. L., and A. Strasser, 1996, The molecular biology of apoptosis: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 93, no. 6, p. 2239-2244.

Vaux, D. L., and I. L. Weissman, 1993, Neither macromolecular synthesis nor *myc* is required for cell death via the mechanism that can be controlled by *Bcl-2*: *Mol.Cell Biol.*, v. 13, no. 11, p. 7000-7005.

Vaux, D. L., I. L. Weissman, and S. K. Kim, 1992, Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2: *Science*, v. 258, no. 5090, p. 1955-1957.

Vucic, D., 2008, Targeting IAP (inhibitor of apoptosis) proteins for therapeutic intervention in tumors: *Curr.Cancer Drug Targets.*, v. 8, no. 2, p. 110-117.

Vucic, D., H. R. Stennicke, M. T. Pisabarro, G. S. Salvesen, and V. M. Dixit, 2000, ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas: *Curr.Biol.*, v. 10, no. 21, p. 1359-1366.

Wagner, K. W., I. H. Engels, and Q. L. Deveraux, 2004, Caspase-2 can function upstream of bid cleavage in the TRAIL apoptosis pathway: *J.Biol.Chem.*, v. 279, no. 33, p. 35047-35052.

Waldman, T., K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, 1995, p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells: *Cancer Res.*, v. 55, no. 22, p. 5187-5190.

Walker, N. P. et al., 1994a, Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer: *Cell*, v. 78, no. 2, p. 343-352.

Walker, N. P. et al., 1994b, Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer: *Cell*, v. 78, no. 2, p. 343-352.

Walter, D. et al., 2008, Switch from type II to I Fas/CD95 death signaling on in vitro culturing of primary hepatocytes: *Hepatology*, v. 48, no. 6, p. 1942-1953.

Wang, C., C. Tang, and L. Tang, 2001, [Inhibition effects of octreotide on the growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo]: *Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.*, v. 81, no. 19, p. 1194-1197.

Wang, C. Y., M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel, and A. S. Baldwin, Jr., 1998a, NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation: *Science*, v. 281, no. 5383, p. 1680-1683.

Wang, J. H., Q. T. Xing, and M. B. Yuan, 2004, Antineoplastic effects of octreotide on human gallbladder cancer cells in vitro: *World J.Gastroenterol.*, v. 10, no. 7, p. 1043-1046.

Wang, L., M. Miura, L. Bergeron, H. Zhu, and J. Yuan, 1994, Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death: *Cell*, v. 78, no. 5, p. 739-750.

Wang, S., and W. S. El-Deiry, 2003, TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors: *Oncogene*, v. 22, no. 53, p. 8628-8633.

Wang, S., M. Miura, Y. K. Jung, H. Zhu, E. Li, and J. Yuan, 1998b, Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE: *Cell*, v. 92, no. 4, p. 501-509.

Wanker, E. E., 2002, Hip1 and Hipp1 participate in a novel cell death-signaling pathway: *Dev.Cell*, v. 2, no. 2, p. 126-128.

Wasiak, S., R. Zunino, and H. M. McBride, 2007, Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death: *J.Cell Biol.*, v. 177, no. 3, p. 439-450.

Weber, C. H., and C. Vincenz, 2001, The death domain superfamily: a tale of two interfaces?: *Trends Biochem.Sci.*, v. 26, no. 8, p. 475-481.

Webster, C. R., and M. S. Anwer, 1998, Cyclic adenosine monophosphate-mediated protection against bile acid-induced apoptosis in cultured rat hepatocytes: *Hepatology*, v. 27, no. 5, p. 1324-1331.

Weckbecker, G., U. Briner, I. Lewis, and C. Bruns, 2002, SOM230: a new somatostatin peptidomimetic with potent inhibitory effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in rats, primates, and dogs: *Endocrinology*, v. 143, no. 10, p. 4123-4130.

Weckbecker, G., I. Lewis, R. Albert, H. A. Schmid, D. Hoyer, and C. Bruns, 2003, Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects: *Nat.Rev.Drug Discov.*, v. 2, no. 12, p. 999-1017.

Weckbecker, G., F. Raulf, B. Stolz, and C. Bruns, 1993, Somatostatin analogs for diagnosis and treatment of cancer: *Pharmacol.Ther.*, v. 60, no. 2, p. 245-264.

Weckbecker, G., F. Raulf, L. Tolcsvai, and C. Bruns, 1996, Potentiation of the anti-proliferative effects of anti-cancer drugs by octreotide in vitro and in vivo: *Digestion*, v. 57 Suppl 1, p. 22-28.

Wei, M. C. et al., 2001, Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death: *Science*, v. 292, no. 5517, p. 727-730.

Wei, Y., T. Fox, S. P. Chambers, J. Sintchak, J. T. Coll, J. M. Golec, L. Swenson, K. P. Wilson, and P. S. Charifson, 2000, The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity: *Chem.Biol.*, v. 7, no. 6, p. 423-432.

Weinberg, R. A., 1995, The retinoblastoma protein and cell cycle control: *Cell*, v. 81, no. 3, p. 323-330.

Wiessner, C., D. Sauer, D. Alaimo, and P. R. Allegrini, 2000, Protective effect of a caspase inhibitor in models for cerebral ischemia in vitro and in vivo: *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)*, v. 46, no. 1, p. 53-62.

Willet, C. G. et al., 2004, Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer: *Nat.Med.*, v. 10, no. 2, p. 145-147.

Wilson, K. P. et al., 1994a, Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme: *Nature*, v. 370, no. 6487, p. 270-275.

Wilson, K. P. et al., 1994b, Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme: Nature, v. 370, no. 6487, p. 270-275.

Woltering, E. A., 2003, Development of targeted somatostatin-based antiangiogenic therapy: a review and future perspectives: Cancer Biother.Radiopharm., v. 18, no. 4, p. 601-609.

Woltering, E. A., J. C. Watson, R. C. Alperin-Lea, C. Sharma, E. Keenan, D. Kurozawa, and R. Barrie, 1997, Somatostatin analogs: angiogenesis inhibitors with novel mechanisms of action: Invest New Drugs, v. 15, no. 1, p. 77-86.

Wu, T. Y., K. W. Wagner, B. Bursulaya, P. G. Schultz, and Q. L. Deveraux, 2003, Development and characterization of nonpeptidic small molecule inhibitors of the XIAP/caspase-3 interaction: Chem.Biol., v. 10, no. 8, p. 759-767.

Wyllie, A. H., 1980, Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation: Nature, v. 284, no. 5756, p. 555-556.

Wyllie, A. H., J. F. Kerr, and A. R. Currie, 1980, Cell death: the significance of apoptosis: Int.Rev.Cytol., v. 68, p. 251-306.

Xidakis, C., G. Kolios, V. Valatas, G. Notas, I. Mouzas, and E. Kouroumalis, 2004, Effect of octreotide on apoptosis-related proteins in rat Kupffer cells: a possible anti-tumour mechanism: Anticancer Res., v. 24, no. 2B, p. 833-841.

Xie, Y., C. W. Tang, and C. H. Wang, 2005, [Effect of HBV X gene transfection on octreotide-inhibited growth of hepatocellular carcinoma cell line HepG2]: Ai.Zheng., v. 24, no. 8, p. 965-969.

Xiong, Y., G. J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi, and D. Beach, 1993, p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases: Nature, v. 366, no. 6456, p. 701-704.

Xu, G., M. Cirilli, Y. Huang, R. L. Rich, D. G. Myszka, and H. Wu, 2001, Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex: Nature, v. 410, no. 6827, p. 494-497.

Xu, Y. M. et al., 2004, A caspase-6 and anti-human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) antibody chimeric molecule suppresses the growth of HER2-overexpressing tumors: J.Immunol., v. 173, no. 1, p. 61-67.

Xue, D., S. Shaham, and H. R. Horvitz, 1996, The Caenorhabditis elegans cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease: Genes Dev., v. 10, no. 9, p. 1073-1083.

Yamanaka, T. et al., 2000, Chemotherapeutic agents augment TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines: Hepatology, v. 32, no. 3, p. 482-490.

Yang, E., and S. J. Korsmeyer, 1996, Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death: Blood, v. 88, no. 2, p. 386-401.

Yang, Y. A., G. M. Zhang, L. Feigenbaum, and Y. E. Zhang, 2006, Smad3 reduces susceptibility to hepatocarcinoma by sensitizing hepatocytes to apoptosis through downregulation of Bcl-2: *Cancer Cell*, v. 9, no. 6, p. 445-457.

Yarmolinsky, M. B., 1995, Programmed cell death in bacterial populations: *Science*, v. 267, no. 5199, p. 836-837.

Yerushalmi, B., R. Dahl, M. W. Devereaux, E. Gumprich, and R. J. Sokol, 2001, Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition: *Hepatology*, v. 33, no. 3, p. 616-626.

Yin, X. M., K. Wang, A. Gross, Y. Zhao, S. Zinkel, B. Klocke, K. A. Roth, and S. J. Korsmeyer, 1999, Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis: *Nature*, v. 400, no. 6747, p. 886-891.

Yonish-Rouach, E., D. Resnitzky, J. Lotem, L. Sachs, A. Kimchi, and M. Oren, 1991, Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6: *Nature*, v. 352, no. 6333, p. 345-347.

Yoon, Y., E. W. Krueger, B. J. Oswald, and M. A. McNiven, 2003, The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1: *Mol.Cell Biol.*, v. 23, no. 15, p. 5409-5420.

Yoshikawa, H., K. Matsubara, G. S. Qian, P. Jackson, J. D. Groopman, J. E. Manning, C. C. Harris, and J. G. Herman, 2001, SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity: *Nat.Genet.*, v. 28, no. 1, p. 29-35.

Youle, R. J., and M. Karbowski, 2005, Mitochondrial fission in apoptosis: *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, v. 6, no. 8, p. 657-663.

Yu, T., R. J. Fox, L. S. Burwell, and Y. Yoon, 2005, Regulation of mitochondrial fission and apoptosis by the mitochondrial outer membrane protein hFis1: *J.Cell Sci.*, v. 118, no. Pt 18, p. 4141-4151.

Yuan, J., S. Shaham, S. Ledoux, H. M. Ellis, and H. R. Horvitz, 1993, The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme: *Cell*, v. 75, no. 4, p. 641-652.

Yuen, M. F., R. T. Poon, C. L. Lai, S. T. Fan, C. M. Lo, K. W. Wong, W. M. Wong, and B. C. Wong, 2002, A randomized placebo-controlled study of long-acting octreotide for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: *Hepatology*, v. 36, no. 3, p. 687-691.

Zamzami, N., and G. Kroemer, 2001, The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens: *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, v. 2, no. 1, p. 67-71.

Zamzami, N., P. Marchetti, M. Castedo, C. Zanin, J. L. Vayssiere, P. X. Petit, and G. Kroemer, 1995, Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo: *J.Exp.Med.*, v. 181, no. 5, p. 1661-1672.

Zender, L. et al., 2005, NFkappaB-mediated upregulation of bcl-xl restrains TRAIL-mediated apoptosis in murine viral hepatitis: Hepatology, v. 41, no. 2, p. 280-288.

Zender, L. et al., 2006, Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach: Cell, v. 125, no. 7, p. 1253-1267.

Zhang, Y., and D. C. Chan, 2007, Structural basis for recruitment of mitochondrial fission complexes by Fis1: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 104, no. 47, p. 18526-18530.

Zhang, Z., L. Wang, K. B. Seydel, E. Li, S. Ankri, D. Mirelman, and S. L. Stanley, Jr., 2000, Entamoeba histolytica cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis: Mol.Microbiol., v. 37, no. 3, p. 542-548.

Zheng, L., G. Fisher, R. E. Miller, J. Peschon, D. H. Lynch, and M. J. Lenardo, 1995, Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor: Nature, v. 377, no. 6547, p. 348-351.

Zhivotovsky, B., D. H. Burgess, D. M. Vanags, and S. Orrenius, 1997, Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis: Biochem.Biophys.Res.Comm., v. 230, no. 3, p. 481-488.

Zhivotovsky, B., A. Samali, A. Gahm, and S. Orrenius, 1999, Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis: Cell Death.Differ., v. 6, no. 7, p. 644-651.

Zhu, H., X. P. Chen, W. G. Zhang, S. F. Luo, and B. X. Zhang, 2005, Expression and significance of new inhibitor of apoptosis protein survivin in hepatocellular carcinoma: World J.Gastroenterol., v. 11, no. 25, p. 3855-3859.

Zychlinsky, A., M. C. Prevost, and P. J. Sansonetti, 1992, Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages: Nature, v. 358, no. 6382, p. 167-169.