

Academiejaar 2010 - 2011

DCA, een wondermiddel tegen kanker?

Delphine SMETRYNS

Promotor: Prof. Dr. Van Coster

Begeleider: Joél Smet

Scriptie voorgedragen in de 2^{de} Master in het kader van de opleiding tot
MASTER IN DE GENEESKUNDE

Academiejaar 2010 - 2011

DCA, een wondermiddel tegen kanker?

Delphine SMETRYNS

Promotor: Prof. Dr. Van Coster

Begeleider: Joél Smet

Scriptie voorgedragen in de 2^{de} Master in het kader van de opleiding tot

MASTER IN DE GENEESKUNDE

Deze pagina is niet beschikbaar omdat ze persoonsgegevens bevat.
Universiteitsbibliotheek Gent, 2021.

This page is not available because it contains personal information.
Ghent University, Library, 2021.

Voorwoord

Vroeg of laat wordt iedereen in zijn leven direct of indirect geconfronteerd met kanker. Als toekomstige arts ga ik hier eveneens vaak mee te maken hebben. Daarom heb ik een literatuurstudie verricht over de werkzaamheid van dichlooracetaat in de behandeling van kanker. Dit onderwerp is niet alleen erg interessant, maar ook nuttig met oog op de toekomst.

Graag wil ik mijn promotor, Prof. Dr. Van Coster, bedanken voor het aanreiken van zo een boeiend thema en voor zijn goede raad tijdens het schrijven van deze thesis.

Het hele jaar door stond mijn begeleider, de heer Joél Smet, paraat met de nodige raadgevingen en kritische beschouwingen. Graag wil ik hem hiervoor hartelijk bedanken.

Ook mijn ouders wil ik bedanken voor de kans die zij mij boden om aan de UGent te studeren en er een onvergetelijke studententijd door te brengen.

Tot slot bedank ik al mijn vrienden met wie ik samen een prachtige studententijd beleefd heb en die altijd voor mij klaar stonden.

Inhoudstafel

Abstract.....	1
1 Inleiding.....	2
2 Methodologie	5
3 Resultaten.....	7
3.1 De energieproductie	7
3.1.1 Glycolyse	7
3.1.2 Pyruvaat Dehydrogenase Complex.....	8
3.1.2.1 Pyruvaat als centrale molecule.....	8
3.1.2.2 Opbouw	8
3.1.2.3 Functie.....	8
3.1.2.4 Regeling.....	9
3.1.2.5 Ontregeling.....	10
3.1.2.6 Deficiëntie	10
3.1.3 De Krebscyclus.....	11
3.1.4 De Oxidatieve Fosforylatie	12
3.1.4.1 Algemeen.....	12
3.1.4.2 Protonenstroom.....	12
3.1.4.3 Elektronen van NADH.....	12
3.1.4.4 Elektronen van FADH ₂	13
3.1.4.5 ATP-synthase	14
3.1.4.6 Controle van de respiratoire keten.....	15
3.1.4.7 Centrale rol van de mitochondriën in de homeostase.....	15
3.2 Apoptose.....	16
3.2.1 Algemeen	16
3.2.2 Ontstaan	16
3.2.3 Verloop.....	17
3.2.4 Regulatie.....	17
3.2.5 Disfunctie	19
3.3 De kankercel.....	19
3.3.1 Algemeen	19
3.3.2 Epidemiologie.....	19
3.3.3 Ontstaan.....	20
3.3.3.1 Mutaties	20

3.3.3.1.1	Erfelijke mutaties.....	21
3.3.3.1.2	Verworven mutaties.....	21
3.3.3.1.2.1	Infecties.....	21
3.3.3.1.2.2	Fysische factoren.....	21
3.3.3.1.2.3	Chemische stoffen.....	22
3.3.3.2	Van mutatie naar kanker.....	22
3.3.3.2.1	Algemeen.....	22
3.3.3.2.2	Proto-oncogenen.....	23
3.3.3.2.3	Tumorsuppressorgenen.....	23
3.3.3.2.4	Apoptosegenen.....	23
3.3.3.2.5	DNA-repairgenen.....	23
3.3.3.3	Andere genmutaties.....	23
3.3.3.4	Complex 1- en 2-mutaties.....	24
3.3.4	Energieproductie.....	25
3.3.4.1	Het Warburgeffect.....	25
3.3.4.2	Verhoogde PDK-expressie.....	27
3.3.5	Apoptoseresistentie.....	27
3.3.6	Niet-oncogene genetische veranderingen.....	30
3.3.7	Wisselende cellulaire omgeving.....	30
3.4	Dichlooracetaat.....	31
3.4.1	Algemeen.....	31
3.4.1.1	Omgevingsbronnen.....	31
3.4.1.2	Gebruik in mitochondriale ziekten.....	31
3.4.1.3	Effect op het lactaatniveau.....	32
3.4.1.4	Farmacokinetiek.....	32
3.4.1.5	Onderzoek.....	32
3.4.1.6	Effect afhankelijk van het type moleculaire abnormaliteit.....	32
3.4.2	Het effect op de kankercel.....	33
3.4.2.1	Inhibitie PDK.....	33
3.4.2.2	In vivo en in vitro testen met DCA.....	35
3.4.2.3	Effect afhankelijk van de omgevingsfactoren.....	35
3.4.3	Effect op de normale cel.....	36
3.4.4	Bijwerkingen.....	36
3.4.5	Orale toediening.....	39

3.4.6	Effect op specifieke kankers	39
3.4.6.1	Longkanker, borstkanker en glioblastoma	39
3.4.6.2	Prostaatkanker	39
3.4.6.3	Endometriumkanker	40
3.4.6.4	Hoofd- en nekcarcinomen	40
3.4.6.5	Pediatrische kanker	40
3.4.6.6	Cervicale kanker	40
3.4.6.7	Pancreascarcinoom	41
3.4.6.8	Colorectale kanker	41
3.4.6.9	Borstkanker en longmetastasen	42
3.4.6.10	Glioblastoma multiforme	42
3.4.7	Combinatie met andere middelen	43
4	Discussie	44
4.1	Behandeling kanker	44
4.2	Dichlooracetaat	44
4.2.1	Werking	44
4.2.2	Alle tumoren vatbaar?	45
4.2.3	Specifieke kankers	45
4.2.3.1	In vitro studies	45
4.2.3.2	In vivo studies	45
4.2.3.3	Menselijke patiëntenstudies	46
4.2.4	Resultaten	46
4.2.5	Toxicologie	46
4.3	Blik op de toekomst	47
4.3.1	Combinatie van DCA met andere middelen	47
4.3.2	Alternatieve medicatie	47
4.4	Besluit	48
	Referenties	50

Figuren

<i>Figuur 1 De glycolyse (11).....</i>	<i>7</i>
<i>Figuur 2 Pyruvaat als centrale molecule (10).....</i>	<i>8</i>
<i>Figuur 3 Oxidatieve decarboxylatie van pyruvaat naar acetyl-CoA (13).....</i>	<i>9</i>
<i>Figuur 4 De regeling van het pyruvaat dehydrogenase complex (13).....</i>	<i>9</i>
<i>Figuur 5 De Krebscyclus (10)</i>	<i>11</i>
<i>Figuur 6 NADH in de elektronentransportketen (10).....</i>	<i>13</i>
<i>Figuur 7 FADH₂ in de elektronentransportketen (10)</i>	<i>14</i>
<i>Figuur 8 F₀F₁-complex van het ATP synthase (10).....</i>	<i>14</i>
<i>Figuur 9 De oxidatieve fosforylatie (17).....</i>	<i>15</i>
<i>Figuur 10 Apoptoseregulatie (21)</i>	<i>17</i>
<i>Figuur 11 Apoptoseresistentie in kankercel door metabolische hervorming (9).....</i>	<i>29</i>
<i>Figuur 12 Molecule dichlooracetaat (36).....</i>	<i>31</i>
<i>Figuur 13 Glycolyse versus door DCA-geïnduceerde oxidatieve fosforylatie (8).....</i>	<i>34</i>

Abstract

Universiteit Gent
Faculteit Geneeskunde en Gezondheidswetenschappen
Master in de Geneeskunde

Promotor: Prof. Dr. Van Coster
Begeleider: Joël Smet
Delphine Smetryns

DCA, een wondermiddel tegen kanker?

Inleiding Aërobe glycolyse, ook wel bekend als het Warbureffect, is een unieke eigenschap van de meeste kankers. De kankercel heeft een heel actief '*pyruvaat dehydrogenase kinase 1*' (PDK-1) wat leidt tot een mitochondriale disfunctie. Door deze disfunctie zal er een apoptoseresistentie in de kankercellen ontstaan wat uiteindelijk tumorgroei gaat bevorderen en waardoor mitochondriën nieuwe therapeutische doelwitten geworden zijn in de behandeling van kanker. Één van de middelen die de mitochondriën heractiveert, is het oraalbeschikbare '*dichlooracetaat*' (DCA), dat al meer dan 30 jaar gebruikt wordt voor de behandeling van mitochondriale ziekten.

Methodologie De diverse aspecten van DCA als mogelijke antikankertherapie worden hier bestudeerd aan de hand van relevante en naar inhoud kritisch geselecteerde artikels. De artikels werden hiertoe samengevat, vergeleken en gelinkt.

Resultaten Via de inhibitie van PDK zorgt DCA voor de verschuiving van het metabolisme in de kankercel van de glycolyse naar de oxidatieve fosforylatie. Hierdoor neemt het aantal actieve mitochondriën toe, wordt de tumorgroei afgeremd en wordt er in de kankercellen apoptose geïnduceerd. DCA wordt bijgevolg beschouwd als een veelbelovende selectieve antikankertherapie.

Discussie In de behandeling van kanker zijn de mitochondriën nieuwe therapeutische doelen geworden. De meeste onderzoeken met DCA toonden positieve resultaten. Vermits er zeldzaam een verhoogde tumorgroei werd bekomen, is meer onderzoek nodig om de effectiviteit van dit middel te bepalen.

1 Inleiding

Kanker is een verzamelnaam voor meer dan honderd verschillende soorten kwaadaardige gezwellen. Samen met de hart- en vaatziekten vormt kanker de belangrijkste doodsoorzaak in de Westerse wereld. Één op drie volwassenen krijgt te maken met kanker in zijn leven en 1 op 650 kinderen ontwikkelt kanker vóór de leeftijd van 16 jaar. In België worden per jaar 60.000 nieuwe gevallen van kanker gerapporteerd bij volwassenen en 300 bij kinderen. (1, 2)

In het ontstaan van kanker staan de genetische mutaties centraal. Daardoor kan het metabolische fenotype van de cel veranderen. De mutaties kunnen erfelijk of verworven zijn. Meestal gaat het om verworven mutaties in de ‘desoxyribonucleïnezuur’ (DNA)-genen zoals een mutatie in het p53-gen. De verworven mutaties kunnen ontstaan door fysische factoren zoals Röntgenstralen en ‘ultraviolet’ (UV)-licht, door chemische stoffen zoals asbest en tabaksrook en door infecties zoals het humaan papillomavirus. Virussen kunnen rechtstreeks, zonder eerst een mutatie te induceren, via virale oncogenen en reverse transcriptie kanker doen ontstaan. Een voorbeeld van een mutatie in het nucleaire DNA is het BRCA1- of het BRCA2-gen. Een drager hiervan heeft een verhoogde kans op de ontwikkeling van borstkanker en ovariumcarcinoom. Kanker kan ook het gevolg zijn van mitochondriale DNA-mutaties in de cel wat kan leiden tot een mitochondriale disfunctie. Zeldzame familiale mutaties in de enzymen fumaraathydratase en succinaatdehydrogenase (complex 2) die specifieke kankers kunnen veroorzaken, zijn daar een voorbeeld van. Kanker wordt gekenmerkt door een ongecontroleerde en aanhoudende vermenigvuldiging van cellen. Als gevolg hiervan kan invasieve groei of metastasering optreden. (3-6)

In bijna alle medische specialiteiten wordt men geconfronteerd met kanker maar vooral experts in de oncologie en de radiotherapie houden zich bezig met de behandeling van kanker. De belangrijkste en meest gebruikte behandelingen zijn chirurgie, radiotherapie en chemotherapie aan de hand van cytostatica. (3, 4)

Een combinatie van deze verschillende behandelingstechnieken is mogelijk. De keuze van combinatie is voor elke therapie afhankelijk van de tumorsensitiviteit, de lokalisatie en lokale invasie van de tumor, de mogelijkheid tot totale resectie en de aan- of afwezigheid van metastasen. De verschillende therapieën kunnen zowel voor genezing als voor palliatie gebruikt worden. (4)

Aërobe glycolyse, ook wel bekend als het Warbureffect, is een unieke eigenschap van de meeste kankers. Dit fenomeen wordt gekenmerkt door verhoogde glucose-opname, hoge aanmaak van lactaat en verlaagde mitochondriale glucose-oxidatie ondanks de aanwezigheid van voldoende zuurstof. Deze aërobe glycolyse is het resultaat van een mitochondriale disfunctie. Mitochondriën oefenen naast de

‘adenosinetriofosfaat’ (ATP)-energieproductie via de oxidatieve fosforylatie nog vele andere belangrijke functies uit in de cel waaronder de controle van celdood, -groei en -ontwikkeling en de integratie van signalen vanuit de nucleus. Bij disfunctie van de mitochondriën zal er apoptoseresistentie in de kankercellen ontstaan. Deze resistentie ontstaat door hyperpolarisatie van het binnenste mitochondriale membraan waardoor de pro-apoptotische mediators niet meer kunnen vrijkomen vanuit de mitochondriën naar het cytoplasma. Dit leidt uiteindelijk tot tumorgroei. (6, 7)

De hoofdregelaar van het cellulaire metabolisme is het ‘Pyruvaat Dehydrogenase Complex’ (PDHc) die de aanzet is tot de Krebscyclus en de oxidatieve fosforylatie. De enzymactiviteit van PDHc wordt bepaald door de graad van fosforylatie. De ‘Pyruvaat Dehydrogenase Kinases’ (PDK) 1-4 fosforyleren en inhiberen het PDHc en de ‘Pyruvaat Dehydrogenase Fosfatasen’ (PDP) 1-2 defosforyleren en reactiveren het PDHc. De kankercel heeft een heel actief PDK-1. Het PDK-1 wordt door ‘Hypoxine Inducible Factor 1 α ’ (HIF-1 α) gereguleerd maar omgekeerd wordt het HIF-1 α ook geactiveerd door een hoge PDK-1 expressie wat de kwaadaardige (maligne) progressie bevordert. HIF-1 α ontstaat in het begin van de carcinogenese door de zuurstofarme condities van de cel en zorgt voor de grotere glucose-opname in de cel. (5, 7, 8)

Vermits de glycolyse niet in de normale weefsels gezien wordt, met uitzondering van skeletspieren bij een zware inspanning, zou het bio-energetische verschil tussen kankercellen en normale cellen een specifiek therapeutisch doel kunnen zijn. De disfunctionele mitochondriën die de apoptoseresistentie in kankercellen veroorzaken, zijn nieuwe therapeutische doelwitten geworden in de behandeling van kankers. (8, 9)

Wat is de ideale antikankertherapie? Een behandeling waarbij een selectieve inductie van celdood in de kankercellen optreedt, maar niet in de normale cellen. De behandeling moet gebruiksvriendelijk zijn hetgeen een hoge therapietrouw zou waarborgen. Tenslotte zouden de kosten van de behandeling niet te hoog mogen zijn. Aan deze drie criteria voldoet een behandeling met ‘dichlooracetaat’ (DCA), een kleine, eenvoudige en goedkope molecule, die oraal kan ingenomen worden en selectief met de mitochondriale werking interageert. Deze selectieve aanval van DCA is mogelijk omdat de kankercel in zijn energievoorziening voorziet door middel van glycolyse in het cytoplasma, in tegenstelling tot de normale cel waarbij vooral energie gegenereerd wordt door pyruvaatoxidatie in de mitochondriën. De abnormale energievoorziening kan door DCA gecorrigeerd worden omdat DCA het PDK-1 inhibeert. De inhibitie van PDK-1 leidt tot verminderde PDH- α -fosforylatie, herstel van de PDHc activiteit, omkering van het metabolische Warburgfenotype, verminderde HIF-1 α -expressie in normoxie, verminderde celoverleving in hypoxische omstandigheden, daling van de invasiviteit en inhibitie van de tumorgroei. (5, 8)

Het metabolische doel van DCA houdt twee synergische mechanismen in. De proximale weg gebeurt via de mitochondriën. DCA inhibeert PDK waardoor een stijgende PDHc activiteit ontstaat. Deze

verschuift het metabolisme van de glycolyse naar de glucose-oxidatie en vermindert de depolarisatie van het mitochondriale membraan welke de '*Mitochondriale Transition Pores*' (MTP-kanalen) opent. Dit laat cytochroom c en '*Apoptose Inducing Factor*' (AIF) toe om zich, via de oxidatieve fosforylatie ontstane '*Reactive Oxygen Species*' (ROS), te verplaatsen van de mitochondriën naar het cytoplasma. Bijgevolg wordt apoptose geïnduceerd via de activatie van caspases. De distale weg is de opening van de Kv1.5 K⁺-kanalen in het plasmamembraan via het getransporteerde ROS. Dit hyperpolariseert de cel en vermindert de intracellulaire Ca²⁺-concentratie leidend tot een daling van de tonische inhibitie op de caspases. DCA doet dus het aantal actieve mitochondriën toenemen. Hierdoor zou DCA de tumorgroei kunnen afremmen en de apoptose van de kankercellen kunnen induceren. (7, 9)

Dankzij het preklinische werk en het feit dat DCA al meer dan 30 jaar aangewend is voor de behandeling van mitochondriale ziekten, wordt het oraalbeschikbare DCA beschouwd als een veelbelovende selectieve antikankertherapie. (8, 9) De diverse aspecten van DCA als mogelijke antikankertherapie zullen in dit werk bestudeerd worden aan de hand van relevante literatuur. Een kritische selectie werd gemaakt op basis van de inhoud van de gelezen artikels. De artikels werden samengevat, vergeleken en gelinkt. De correctie van de metabolische abnormaliteiten in de mitochondriën levert een unieke kans voor de ontwikkeling van de ideale kankertherapie. Ze zou potentieel ook synergisch kunnen werken met andere reeds bestaande kankerbehandelingen.

2 Methodologie

Het onderwerp van deze literatuurstudie verplicht ons om drie belangrijke onderzoeksdomeinen te bespreken. De oncologie of de studie die zich richt op de behandeling van diverse kankers komt als eerste aan bod. Het tweede domein is de studie van het metabolisme of stofwisseling, dit meer specifiek in verband met de veranderde energievoorziening in tumoren. Het derde en laatste onderzoeksdomein omvat het bestuderen van apoptose, een proces dat in tumoren wordt onderdrukt of zelfs volledig is uitgeschakeld. Met behulp van DCA wordt getracht om de mitochondriën, die mede verantwoordelijk zijn voor apoptose, te reactiveren en op die manier de tumorgroei te stoppen en een sterfte van de kankercellen te induceren.

De effecten van DCA op specifieke kankercellen worden beschreven en de onderzoeksgegevens uit de verschillende artikels worden met elkaar vergeleken.

Een deel van de bruikbare literatuur werd door mijn begeleider, de heer Joël Smet, ter beschikking gesteld, zoals het handboek 'The biology of cancer' van Weinberg R.A. (3) en verschillende artikels waaronder 'Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer' van Michelakis et al. (2008). (8)

Om meer inzicht te krijgen in het onderwerp, werden vele gesprekken gevoerd met de heer Joël Smet. Ook werd er gezocht naar enkele basiswerken over de algemene biochemie van de cel via pubmed en het handboek 'Molecular cell biology' van Lodish et al. (10)

Op 17/06/2010 greep er een vergadering plaats met Prof. Dr. Van Coster om de stand van zaken na te gaan en te controleren of alle relevante aspecten die verband houden met het onderwerp van deze literatuurstudie voldoende werden bestudeerd.

De periode waarin de meeste literatuur werd opgezocht is september 2009-augustus 2010. Gezien de actualiteit van het onderwerp, werden tot in het begin van 2011 nog enkele artikels opgezocht om de literatuurstudie zo volledig mogelijk te maken.

Via pubmed werd er gezocht met de volgende keywords:

Voor dichlooracetaat:	DCA, dichloroacetate
Voor bijwerkingen:	neurotoxicity, side effects, periferal neuropathy
Voor kanker:	cancer, tumor
Voor pyruvaat dehydrogenase:	PDH, pyruvaat dehydrogenase complex, PDHc
Voor apoptose:	apoptosis
Voor glycolyse:	glycolysis, glycolytic

Aan de hand van de titel of het abstract werd beslist of het artikel relevant leek. Van alle artikels werden de referenties nagekeken en ook via deze weg werden relevante artikels opgezocht en opgenomen in de literatuurstudie.

De meeste illustraties werden opgezocht via google-afbeeldingen.

3 Resultaten

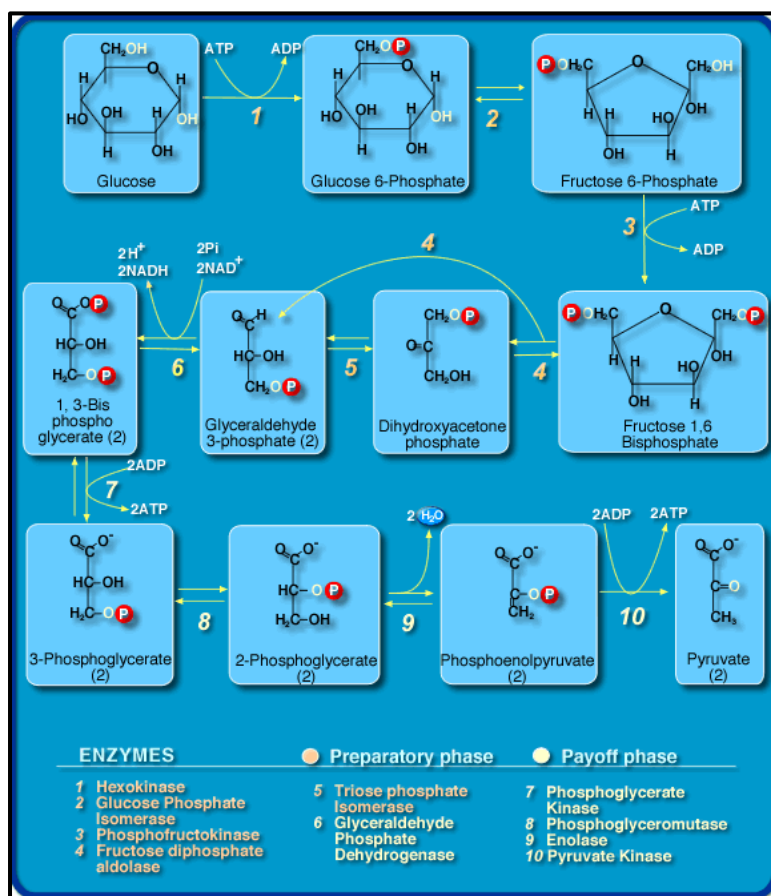
3.1 De energieproductie

Glucose glycolyse → pyruvaat PDHc – E1: decarboxylatie → acetyl-CoA Krebscyclus → OXFOS → ATP

3.1.1 Glycolyse

De opeenvolging van reacties waarbij glucose wordt omgezet tot pyruvaat noemt men de glycolyse.

De nettoreactie van de glycolyse, zoals te zien op figuur 1, is:



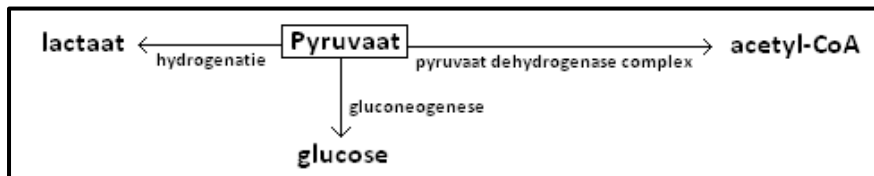
Figuur 1 De glycolyse (11)

De glycolyse vindt plaats in het cytosol en is onafhankelijk van zuurstof. Hierbij wordt ook een kleine hoeveelheid ATP gevormd. In een aëroob milieu is de glycolyse de aanzet tot de Krebscyclus en vervolgens de oxidatieve fosforylatie. Het pyruvaat wordt in zuurstofrijke condities volledig geoxideerd tot CO_2 en H_2O in de mitochondriën. Daarentegen wordt bij zuurstoftekort het pyruvaat (pyrodruivenzuur) omgezet tot lactaat (melkzuur). Het PDK voert een controlefunctie uit op het verder verloop van de glycolyse. (10)

3.1.2 Pyruvaat Dehydrogenase Complex

3.1.2.1 Pyruvaat als centrale molecule

Pyruvaat is een centraal gelegen molecule in het metabolisme. Het kan verschillende reacties teweegbrengen (zie figuur 2) en als bouwsteen voor de cel gebruikt worden. (10)



Figuur 2 Pyruvaat als centrale molecule (10)

Bij de meeste eukaryoten is zuurstof noodzakelijk om te groeien. Ze gaan via de oxidatie van glucose een grote hoeveelheid ATP produceren. Daarentegen kunnen velen de glycolyse ook laten verlopen via anaërobe omstandigheden. Het totaal rendement is dan slechts 2 ATP. Dit is onder andere het geval bij de spieren gedurende een intense activiteit. Hier gebeurt een omzetting van pyruvaat naar lactaat door de beperkte zuurstofconcentratie in het spierweefsel. Dit melkzuur veroorzaakt de welgekende spierpijn na het sporten. Bij micro-organismen zoals prokaryoten wordt het pyruvaat altijd omgezet tot lactaat. (10)

In zuurstofrijke cellen wordt het pyruvaat getransporteerd naar de matrix van de mitochondriën. Hierbij is er een uitwisseling van de OH^- groep. In aërobe condities wordt de meeste energie uit het glucose gehaald via de Krebscyclus (citroenzuurcyclus) en de elektronentransportketen. Het ‘acetylcoënzyme A’ (acetyl-CoA) zorgt voor de start van de Krebscyclus. Het acetyl-CoA wordt in de mitochondriën gevormd uit het pyruvaat via het PDHc. (10)

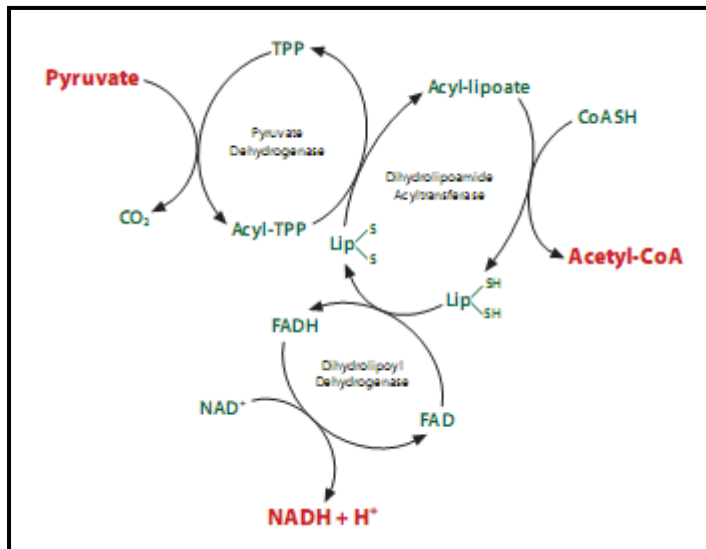
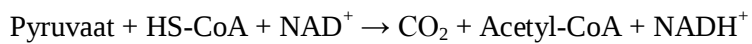
3.1.2.2 Opbouw

Het PDHc bestaat uit 4 enzymen: ‘pyruvaat dehydrogenase’ (E1), ‘dihydrolipoamide acyltransferase’ (E2), ‘dihydrolipoyl dehydrogenase’ (E3) en 1 structureel enzym E2/E3BP of proteïne X. Het enzym E1 bestaat uit 2α en 2β subeenheden. (12)

3.1.2.3 Functie

Het PDHc katalyseert de irreversibele overgang van de glycolyse naar de Krebscyclus door de oxidatieve decarboxylering van het pyruvaat naar het acetyl-CoA. Het PDHc ondergaat inhibitie door zijn eigen producten acetyl-CoA en de ‘gereduceerde vorm van het nicotinamide-adeninedinucleotide’ (NADH). ATP zal dit inhiberend effect nog eens versterken. (10)

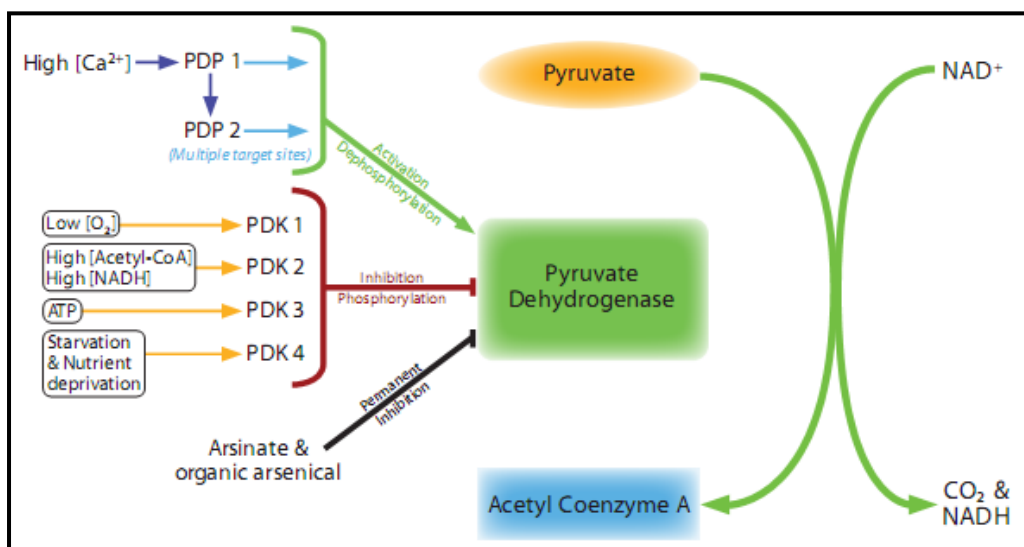
De reactie van de oxidatieve decarboxylering (te zien op figuur 3) is:



Figuur 3 Oxidatieve decarboxylatie van pyruvaat naar acetyl-CoA (13)

3.1.2.4 Regeling

Het PDHc wordt streng gereguleerd door het PDK 1-4 en het PDP 1-2 die door cyclussen van fosforylatie (desactivatie) en defosforylatie (activatie) bepalen hoeveel van het PDHc in zijn actieve toestand zal zitten. Dit is duidelijk te zien op figuur 4. Deze regulatie is onder andere afhankelijk van de glucose- en vetzuurinname, het vasten en het zuurstoftekort. (13, 14)



Figuur 4 De regeling van het pyruvaat dehydrogenase complex (13)

Het PDK fosforyleert E1 wat tot desactivatie van E1 en inhibitie van PDHc leidt. (12) Geïnhibeerd PDK zorgt voor een actieve PDHc en dus een efficiënte koppeling tussen de glycolyse en de oxidatieve fosforylatie want het PDHc reguleert de flux van pyruvaat naar de mitochondriën. (8) Het PDP defosforyleert E1 wat E1 en bijgevolg het PDHc activeert. (15) Fosforylatie van slechts één van de zes E1 α -plaatsen op het heterotetrameer is voldoende voor de inactivatie van PDHc. (16)

Een hoge Ca²⁺-concentratie activeert het PDP-1 en het PDP-2 wat leidt tot activatie (defosforylatie) van het PDH. (13)

Geactiveerde PDK-1-2-3-4 leiden tot inhibitie van het PDHc. Een lage O₂-concentratie activeert het PDK-1. Zo bijvoorbeeld is er in het begin van de carcinogenese hypoxie. Dit activeert HIF-1 α die vervolgens het PDK-1 activeert wat uiteindelijk leidt tot een energieproductie met uitsluitend glycolyse: “het Warburgeffect”. Er is geen oxidatieve fosforylatie meer waardoor er ook geen ROS-productie is. Dit leidt tot resistentie aan apoptose. Een hoge acetyl-CoA-concentratie of een hoge concentratie van de NADH activeert het PDK-2. ATP activeert het PDK-3. Uithongering en hoge vetinname activeren het PDK-4. Insuline inhibeert het PDK-4. (13) Bij inname van koolhydraten, zal het bloedglucose stijgen en de insulineproductie ook. Hierdoor wordt het PDK-4 gedesactiveerd en bijgevolg het PDHc geactiveerd. Indien er een tekort is aan glucose, zoals bij uithongering, zal door de stijgende activatie van het PDK-4 het PDHc gefosforyleerd worden in de meeste weefsels zoals de hart- en skeletspieren om glucose als enige energiebron voor de hersenen te verzekeren. (14) De spieren zullen hun energie uit vetten en ketonen halen. Indien er veel glucose en dus pyruvaat aanwezig is, zal er inhibitie zijn van het PDK-4 en activatie van het PDHc met een verschuiving van pyruvaat uit het cytosol naar de mitochondriën. (13)

3.1.2.5 Ontregeling

Een ontregeling van de PDK- of PDP-regulatie is kenmerkend in obesitas, ‘*diabetes mellitus*’ (DM) en andere metabole ziekten alsook in kanker. Bij DM type 2 zal het PDK-4 stijgen ondanks dat er voldoende glucose wordt ingenomen. Dit leidt tot hyperglycemie. Insuline zorgt normaal voor de inhibitie van het PDK-4 maar in DM type 2 is er een insulinedeficiëntie. Een mitochondriale disfunctie en een verandering in het PDH-gehalte gaat de ziekte van Alzheimer vooraf. (14)

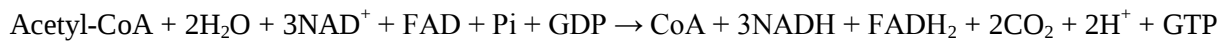
3.1.2.6 Deficiëntie

De PDHc-deficiëntie is een mitochondriale afwijking, meestal ontstaan door een defect van E1 α op het chromosoom X. De deficiëntie is een grote oorzaak van neonatale encephalopathie geassocieerd met primaire lactatacidose. Bij een E1 α -defect is het PDHc gedesactiveerd waardoor pyruvaat in het

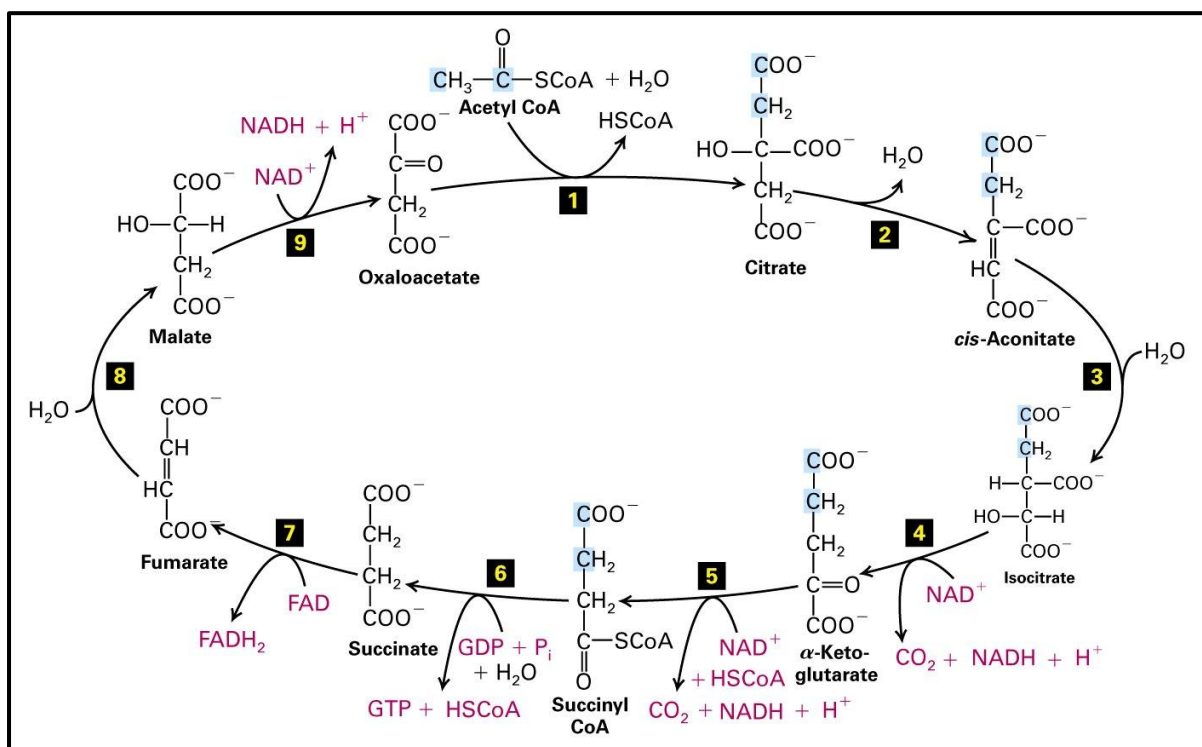
cytosol blijft. Dit geeft te weinig energie want er is een ineffektieve citroenzuurcyclus. Het pyruvaat wordt omgezet tot lactaat. (12)

3.1.3 De Krebscyclus

De reacties van de Krebscyclus gaan door in de mitochondriale matrix in tegenstelling tot de glycolyse die in het cytosol doorgaat. Het geactiveerde acetyl-CoA wordt volledig geoxideerd tot CO_2 door de citroenzuurcyclus. (10)



Men bekomt naast het CO_2 ook één 'Guanine Trifosfaat' (GTP), 3 NADH en één 'gereduceerde vorm van het flavine adenosinedinucleotide' (FADH_2) per acetyl-CoA (te zien op figuur 5). Het GTP kan gebruikt worden om ATP aan te maken. Het NADH en het FADH_2 zullen hun hoogenergetische elektronen afgeven aan O_2 in de respiratoire keten. In de Krebscyclus is zuurstof niet direct betrokken. Daarentegen zijn aërobe condities onmisbaar voor de vorming van NAD^+ en FAD en bijgevolg het in stand houden van de citroenzuurcyclus. (10)



Figuur 5 De Krebscyclus (10)

3.1.4 De Oxidatieve Fosforylatie

3.1.4.1 Algemeen

Het NADH en FADH₂ dragen elektronen met een hoog potentiaal. Zowel tijdens de glycolyse, de citroenzuurcyclus als tijdens de vetzuuroxidatie worden deze energierijke moleculen NADH en FADH₂ gevormd. Een grote hoeveelheid vrije energie wordt vrijgesteld bij de overdracht van deze elektronen aan het O₂. Deze energie wordt gebruikt voor de fosforylatie van ‘*adenosinedifosfaat*’ (ADP) tot ATP. Het proces waarbij de energie, afkomstig van de doorgang van deze elektronen langsheen de elektronentransportketen, omgezet wordt in chemische energie van ATP noemt men de oxidatieve fosforylatie. (10)

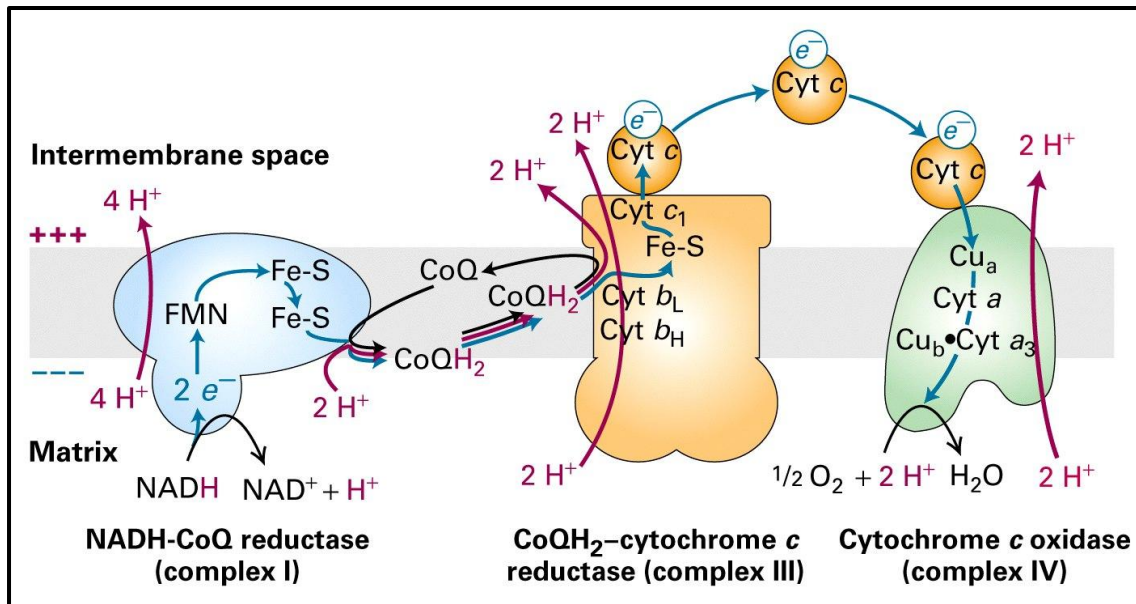
De oxidatieve fosforylatie is de voornaamste energiebron voor aërobe systemen. Zo worden er 32 ATP-moleculen gevormd tijdens de oxidatieve fosforylatie van glucose naar CO₂ en H₂O. De oxidatieve fosforylatie gebeurt in het binnenste membraan van het mitochondrion. (10)

3.1.4.2 Protonenstroom

De transfer van elektronen van NADH en FADH₂ naar O₂ is gekoppeld aan het simultaan pompen van protonen vanuit de mitochondriale matrix naar de intermembraire ruimte. Ongeveer 8 protonen worden getransponeerd om de 2 elektronen van één geoxideerd NADH door het elektronentransportsysteem te laten passeren. Hierdoor ontstaat er een H⁺-gradiënt over het membraan. De pH-gradiënt heeft aan de matrixzijde een hogere pH (kleinere H⁺-concentratie) en aan de cytosolzijde en de intermembraire ruimte een lagere pH. Dit genereert een elektrisch membraanpotentiaal over het binnenste mitochondriale membraan waarbij de matrix negatief wordt in vergelijking met de intermembraire ruimte. De terugstroom van de protonen naar de mitochondriale matrix via complex V levert ook de energie voor de synthese van ATP uit ADP en ‘*fosfor*’ (P_i). (10)

3.1.4.3 Elektronen van NADH

De elektronen van het NADH komen in de respiratoire keten binnen langs het eerste complex (zie figuur 6). Dit is het NADH-coënzym-Q-reductase. Van hieruit worden de elektronen overgedragen op het ubiquinon (Coënzym Q) die vrij kan bewegen in het binnenste mitochondriale membraan. Op deze manier kan het ubiquinon zijn elektronen afstaan aan het derde complex: het CoQH₂-cytochroom-c-reductase. Deze geeft zijn elektronen af aan het cytochroom c, een klein eiwit dat beweeglijk is langs de cytosolische zijde van het binnenste mitochondriale membraan. Deze molecule draagt het elektronenpaar via de haem-groep naar het laatste en vierde complex van de keten: het cytochroom-c-oxidase. (10)



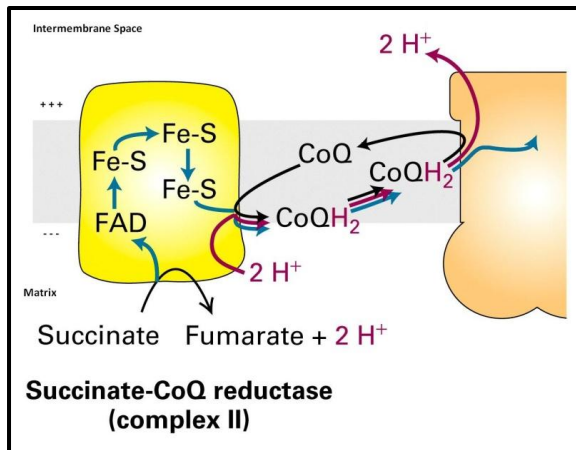
Figuur 6 NADH in de elektronentransportketen (10)

In het vierde complex worden alle elektronen, die individueel in het elektronentransportsysteem zijn binnengekomen, verzameld per vier en op die manier aan het O₂ afgegeven. Dit vermijdt de vorming van een gedeeltelijk gereduceerde zuurstof zoals het superoxide-anion, welke een uiterst gevaarlijke component is. Deze laatste reactie staat in voor ongeveer 90% van de totale zuurstofopname van de cel. De drijfkracht van de elektronentranslocatie is afkomstig van de elektrochemische gradiënt tussen het NADH en O₂. (10)

Zowel door diffusie van Coënzym Q in het binnenste mitochondriale membraan als door cytochroom c in de intermembranaire ruimte worden de elektronen van het ene complex naar het andere getransporteerd. (10)

3.1.4.4 Elektronen van FADH₂

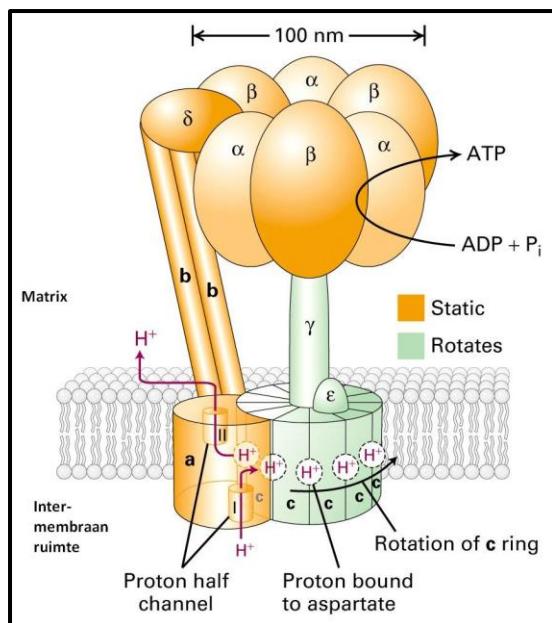
De elektronen van FADH₂ worden direct opgenomen via het tweede complex, namelijk het succinaat-coënzym-Q-reductase (zie figuur 7). Van hieruit gaan de elektronen via het coënzym Q onmiddellijk naar het CoQH₂-cytochroom-c-reductase en vervolgens via cytochroom c naar het cytochroom c oxidase. Dit betekent dat er één H⁺-pomp wordt overgeslagen en dus minder ATP zal gevormd worden. Voor één FADH₂ zullen 2 ATP gevormd worden in tegenstelling tot de 3 ATP die uit één NADH gevormd worden. (10)



Figuur 7 FADH₂ in de elektronentransportketen (10)

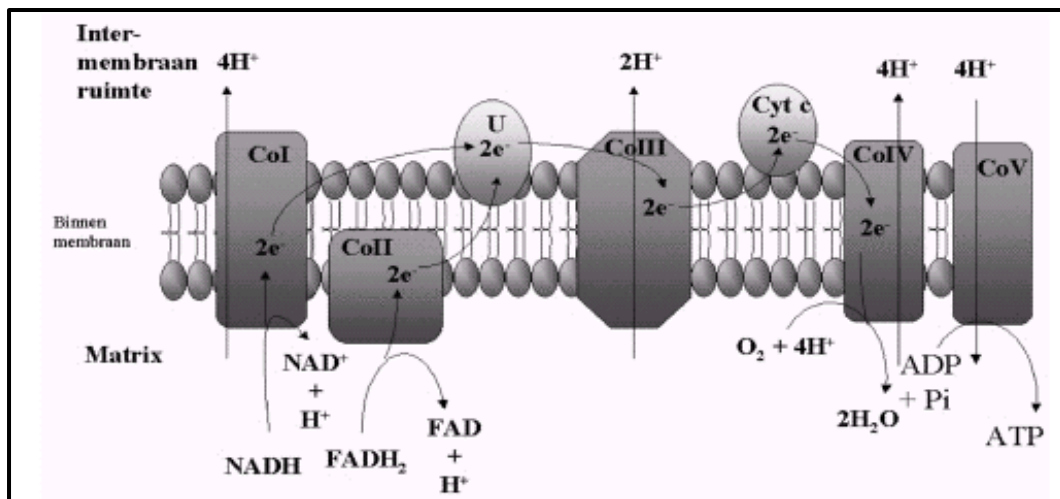
3.1.4.5 ATP-synthase

Het ATP-synthase (F₀F₁-ATPase of H⁺-ATPase) bestaat uit 2 deeldomeinen en katalyseert de synthese van het ATP in de aanwezigheid van de protonengradiënt. Het is dus afhankelijk van de pH-gradiënt over het membraan. Bij de omgekeerde gradiënt wordt het ATP gehydrolyseerd door het ATP-synthase. De eerste component F₁ is het perifere gedeelte dat in de matrix zit en de synthese van ATP katalyseert. F₀ is de tweede component dat in het mitochondriale membraan zit (zie figuur 8). (10)



Figuur 8 F₀F₁-complex van het ATP synthase (10)

Het F₁F₀-ATPase gebruikt de opgeslagen potentiaalenergie voor de ATP-synthese (zie figuur 9). (9)



Figuur 9 De oxidatieve fosforylatie (17)

3.1.4.6 Controle van de respiratoire keten

De controle van de respiratoire keten gebeurt door het evenwicht tussen de vrije energieveranderingen van het protonentranslocatiesysteem en het elektronentransport. Wanneer de H^+ -gradiënt stijgt, zal het elektronentransport vertraagd worden. Indien de H^+ -gradiënt daalt, stijgt het elektronentransport tot zijn maximale waarde. (10)

Als ATP nodig is, zal de ADP concentratie laag zijn en zal het ATP-synthase meer protonen laten stromen. Vermits de H^+ -gradiënt dan daalt, zal de snelheid van het elektronentransport verhogen. Dit verhoogt dus de oxidatieve fosforylatie welke op zijn beurt verbonden is met de snelheid van de glycolyse, het vetzuurmetabolisme en de Krebscyclus. De oxidatieve fosforylatie is dus direct verbonden met de energienood van de cel en de elektronenstroom is bijgevolg gekoppeld aan de energielading van de cel. (10)

3.1.4.7 Centrale rol van de mitochondriën in de homeostase

De mitochondriën hebben een centrale rol in de homeostase van de cel. In het menselijk lichaam wordt energie geproduceerd door de oxidatieve fosforylatie van glucose in de mitochondriën. De totale winst is ongeveer 36 ATP per geoxideerd glucose. Enkel in de skeletspieren na een zware inspanning wordt energie exclusief uit de glycolyse gehaald. De mitochondriën zorgen dus voor de meeste ATP-energie. (8, 18)

Via de intracellulaire Ca^{2+} -concentratie regelen de mitochondriën de Ca^{2+} -afhankelijke transcriptie factoren. Deze zijn ook belangrijk in de controle van de apoptose. (8, 9, 18)

Gezien het mitochondrion tal van belangrijke functies heeft, zal mitochondriale disfunctie vele gevolgen hebben voor de cel. (9)

3.2 Apoptose

3.2.1 Algemeen

De apoptose is het proces van natuurlijke fysiologische geprogrammeerde celdood. Het omvat een serie van biochemische reacties die leiden tot een wijziging in celmorphologie en celdood. Er is een daling in het celvolume en een verlies van de membraansymmetrie. Het cytoplasma wordt dens en de kern wordt pyknotisch door chromatinecondensatie. De organellen blijven intact. Er is fragmentatie van het chromosomale DNA. De cel breekt in verschillende apoptotische blaasjes die onmiddellijk worden gefagocyteerd door macrofagen zonder dat er een inflammatoir antwoord ontstaat. Apoptose is een actief proces dat ATP vereist. Daarentegen is necrose een passief proces van celdood dat wel tot inflammatie en beschadiging van het organisme leidt. (19, 20)

In het algemeen geeft apoptose vele voordelen gedurende het leven. De differentiatie van de tenen en vingers in het menselijk embryo is een voorbeeld van apoptose van de cellen tussen de vingers. Gemiddeld sterven er tussen de 50 en 70 biljoen cellen elke dag als gevolg van apoptose in het volwassen menselijk lichaam. (19, 20)

3.2.2 Ontstaan

Apoptose ontstaat door onherstelbare schade aan een cel of door schade aan het DNA, vaak in het p53-gen. De mechanismen om de apoptose in gang te zetten zijn stress, glucocorticoiden, hitte, radiatie, tekort aan nutriënten, virale infecties, hypoxie, verhoogt intracellulair calcium, toxines, hormonen, groeifactoren, stikstofoxide en cytokines. (19, 20)

Het tumorsuppressorgen p53 accumuleert bij DNA-schade en voorkomt replicatie van een beschadigde cel door de celcyclus te stoppen in de G1-fase of de interfase. Dit geeft de cel de tijd om te herstellen. Interferon induceert de transcriptie van het p53-gen. Als de schade onherstelbaar is, zorgt het p53-eiwit voor apoptose. Bij schade aan het p53-gen of aan de interferon-genen zal er geen herstel of apoptose meer kunnen zijn van de beschadigde cellen. Daardoor zou er mogelijkst tumorgroei kunnen ontstaan. (19, 20)

Homeostase wordt bereikt wanneer het aantal mitosen in evenwicht is met de hoeveelheid celdood. Te veel apoptose leidt tot atrofie. Dit celverlies komt voor bij ischemische schade. Te weinig apoptose leidt tot ongecontroleerde celproliferatie en het doorgeven van fouten zoals gezien wordt in kanker. Inefficiënte apoptose kan ook leiden tot ziekten zoals AIDS, diabetes mellitus en neurodegeneratieve aandoeningen. De progressie van een '*humane immunodeficiëntie virus*' (HIV)-infectie naar AIDS is

hoofdzakelijk het gevolg van een tekort aan CD4⁺ T-helper lymfocyten. Dit tekort is onder andere het resultaat van te veel apoptose. (19, 20)

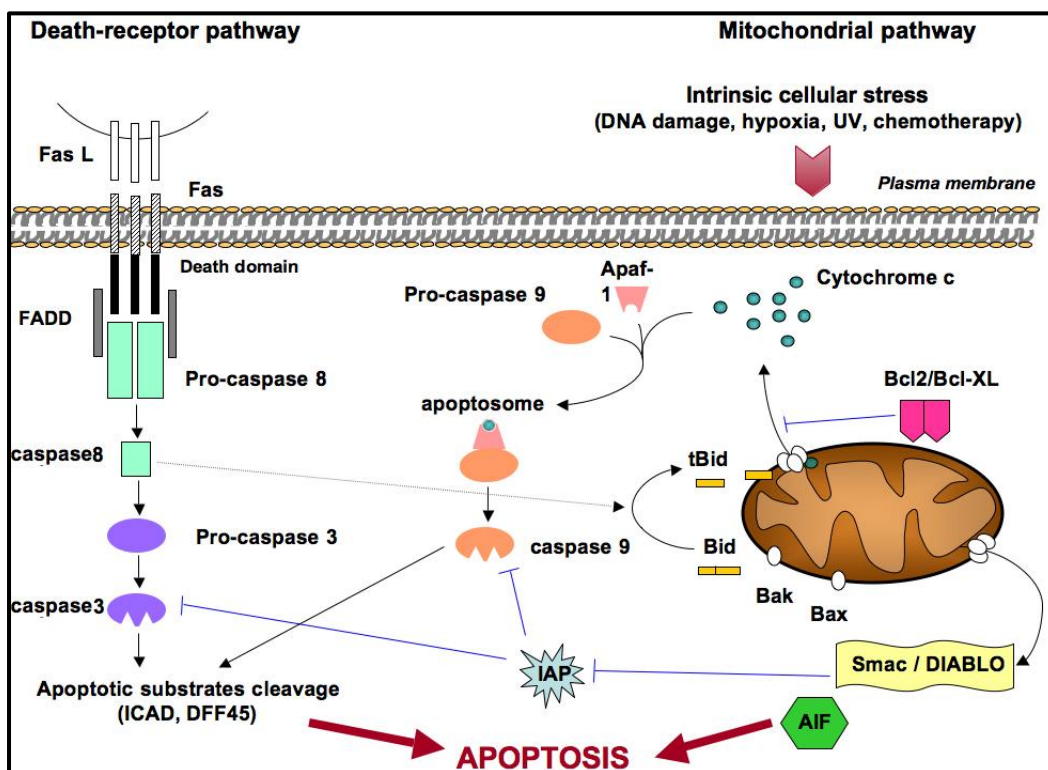
3.2.3 Verloop

Bij de oxidatieve fosforylatie in de normale cel is er een depolarisatie van het mitochondriale membraan. Dit gaat gepaard met een stijging van ROS waardoor het MTP-kanaal open gaat. In het mitochondrion bevindt zich cytochroom c en AIF. Indien het MTP-kanaal open is, zullen deze enzymen naar het cytosol vloeien en apoptose induceren. (8)

Het door de mitochondriën geproduceerde superoxide kan veranderen in ‘waterstofperoxide’ (H₂O₂) door manganese superoxide dismutase en kan vrij verspreiden in de cel. Dit H₂O₂ zal het K⁺-kanaal activeren. Het actieve K⁺-kanaal regelt de influx van Ca²⁺ en zorgt voor een dalende proliferatie, een verminderde activatie van transcriptiefactoren en een stijgende activiteit van caspasen. (8)

3.2.4 Regulatie

Apoptose wordt gereguleerd via 2 verschillende wegen. Deze wegen zijn te zien op figuur 10.



Figuur 10 Apoptoseregulatie (21)

De eerste weg is intrinsiek via de mitochondriën. Door de zwelling van de mitochondriën via de vorming van membraanporiën of door een verhoogde permeabiliteit van het mitochondriale membraan kunnen apoptotische effectoren wegvloeien naar het cytosol. (19)

De mitochondriale proteïnen die vrijkomen uit de mitochondriën zijn '*second mitochondria-derived activator of caspases*' (SMAC) en cytochroom c. Wanneer SMAC in het cytosol terecht komt door de verhoogde permeabiliteit van het mitochondriale membraan, inhibeert het de '*inhibitor of apoptosis protein*' (IAP) waardoor de caspases niet meer onderdrukt zullen worden en de apoptose normaal kan doorgaan. De caspases zijn proteolytisch en zorgen voor een degradatie van de cel. (19, 20)

Cytochroom c komt in het cytosol terecht via de vorming van het '*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization Pore*' (MAC-kanaal) in het buitenste mitochondriale membraan, dat gereguleerd wordt door het anti-apoptotische Bcl-2-gen. Hierdoor ontstaat er een morfologische verandering in de cel. Het cytochroom c bindt met de '*apoptotic protease activating factor-1*' (Apaf-1), ATP en procaspase-9 om het apoptosoom te vormen. Het apoptosoom activeert caspase-9 welke op zijn beurt caspase-3 zal activeren. Deze zullen via proteolytische degeneratie ook zorgen voor apoptose van de cel. Ook kan het pro-apoptotische cytochroom c de K^+ -kanalen activeren. (9, 19, 20)

De vrijstelling en de werking van het cytochroom c in het cytosol worden gereguleerd door opwaartse en afwaartse regulatoren. De opwaartse regulatoren zijn pro-apoptotische Bax en anti-apoptotische Bcl-2, allebei uit de Bcl-2-familie. Bax en Bak vormen poriën waardoor cytochroom c naar het cytosol kan gaan. Bcl-2, Bcl-xL of Mcl-1 zorgen dat ROS op een niet-lethaal niveau gehouden wordt door de inhibitie van de vorming van MAC-kanalen. De stroomafwaartse regulatoren zijn IAPs. Zij zorgen voor inactivatie van de caspases ondanks cytochroom-c-vrijstelling. (19, 20, 22)

De inductie van apoptose kan ook via AIF. Dit is een caspase-onafhankelijke weg. (19, 20)

De tweede weg is extrinsiek via de directe initiatie van het apoptosemechanisme. Twee theorieën werden hieromtrent gesuggereerd. Zowel het '*tumor necrosis factor*' (TNF)-gemedieerde als het Fas-Fas-ligand-gemedieerde model maken gebruik van receptoren uit de '*TNF-receptor*' (TNF-R)-familie gekoppeld aan extrinsieke signalen. TNF is een cytokine die vooral geproduceerd wordt door geactiveerde macrofagen. Wanneer TNF bindt op TNF-R1 leidt dit tot caspase-activatie via de intermediaire membraanproteïnen '*TNF receptor-associated death domain*' (TRADD) en '*Fas-associated death domain protein*' (FADD). Het binden aan deze receptor kan indirect ook leiden tot de activatie van transcriptiefactoren welke een rol spelen in celoverleving en inflammatoire antwoorden. Het verband tussen TNF en apoptose toont aan waarom een abnormale productie van TNF een belangrijke rol speelt in auto-immuunziekten. Wanneer de Fas-R, ook wel bekend als Apo-1 of CD95, bindt op het Fas-ligand, een transmembraaneiwit van de TNF-R familie, wordt het caspase-8 geactiveerd via het FADD. (19, 20)

3.2.5 Disfunctie

Bij disfunctie van het normale apoptosepad is de cel niet meer in staat geprogrammeerde celdood te ondergaan. Dit resulteert in een cel die onsterfelijk wordt. Bijgevolg zal die cel steeds meer foutieve DNA-genen doorgeven bij celvermenigvuldiging. Dit doet de kans op het cancerus of ziek worden van de cel enorm stijgen. (19)

3.3 De kankercel

3.3.1 Algemeen

Kanker wordt gekenmerkt door een ongecontroleerde groei van weefsels ten gevolge van voortdurende celdeling. (3)

De gezonde cellen uit het menselijk lichaam proliferen enkel wanneer deze aan vernieuwing of herstelling toe zijn. Onder celdifferentiatie verstaat men de specifieke vorm en grootte die de cellen tijdens de celdeling naargelang hun functie krijgen. De regeling van deling en differentiatie wordt bepaald door uitwendige factoren zoals hormonen, chemische stoffen en virussen alsook door inwendige signalen van eiwitten die ontstaan onder invloed van specifieke genen in de cel. Zowel de inwendige als de uitwendige factoren kunnen een stimulerende of een inhiberende invloed uitoefenen op de celdeling. (4)

Als er in één of meerdere cellen een ontregeling van deze groeibevorderende en groeiremmende factoren ontstaat in het voordeel van de groeistimulatie kan er lokaal daaruit een tumor (gezwel) ontstaan. De delende cellen zullen meestal hun normale functie verliezen. Kanker is een kwaadaardige tumor. In tegenstelling tot de goedaardige (benigne) tumoren is kanker in staat om het orgaan waarin het is ontstaan te vernietigen en niet enkel te beschadigen. Bovendien kunnen maligne tumoren de omgeving invaseren en daar schade aanbrengen evenals metastaseren via de bloed- en lymfestroom om zo in andere organen of holten uit te zaaien. De metastasen die ontstaan uit maligne tumoren zijn verantwoordelijk voor het grootste aantal sterftegevallen aan kanker. (3, 4)

3.3.2 Epidemiologie

In 2007 bedroeg de prevalentie van kanker in de United States 11.714.000 mensen. In de gemiddelde US populatie is de kans op het ontwikkelen van kanker bij mannen 44,29% en bij vrouwen 37,76%. De kans om aan kanker te sterven ligt rond de 20%. (23)

Wereldwijd sterven er jaarlijks 7,6 miljoen mensen aan kanker. Dit is ongeveer 13,5% van alle sterfgevallen. Er wordt verwacht dat het aantal sterfgevallen aan kanker wereldwijd zal stijgen tot 12 miljoen in 2030. (24, 25)

In de Westerse wereld zijn de frequentste kankers bij mannen prostaatkanker, longkanker en darmkanker. Bij vrouwen komen borstkanker, darmkanker en longkanker het meest voor. Bij kinderen en jongeren zijn leukemie, lymfomen en hersentumoren het meest frequent. (25)

In de ontwikkelingslanden zijn bij de mannen longkanker, maagkanker en leverkanker de meest voorkomende kankers. Bij de vrouw komen borstkanker, baarmoederkanker en longkanker het meest voor. (25)

3.3.3 Ontstaan

3.3.3.1 Mutaties

Tumoren zijn geen vreemde lichamen maar ontstaan uit normaal weefsel. Kanker is een aandoening van disfunctionerende cellen. Zo goed als alle cellen van het lichaam kunnen aanleiding geven tot kanker, maar de meeste kankers zijn van epitheliale oorsprong. Tumoren blijken zich progressief te ontwikkelen met verschillende gradaties van benigne tot metastatisch. Menselijke tumoren zijn monoklonaal dit wil zeggen dat ze afstammen uit één cel. (3)

Centraal in de ontwikkeling van kanker staan defecten in het DNA door mutaties. Ze kunnen ontstaan door erfelijke mutaties en door verworven mutaties. Mutaties in genen kunnen leiden tot nieuwe abnormale fenotypes. Zulke veranderingen kunnen onverenigbaar zijn met de normale functie van deze cellen. Door mutaties kunnen ook wijzigingen ontstaan in het cellulaire groeiprogramma en dit kan leiden tot grote populaties cellen die niet langer gehoorzamen aan de regels voor normale weefselopbouw en -onderhoud. De oncogenen worden geactiveerd wat tot een stijgende apoptose leidt maar eveneens tot een stijging van de proliferatie. Een voorbeeld van een oncogen is 'myelocytomatosis' (Myc), een gen dat codeert voor een transcriptiefactor die de expressie van vele genen regelt. Er is een inhibitie van tumorsuppressorgenen zoals p53 waardoor er een inhibitie is van de apoptose. Bij het activeren van oncogenen en het inhiberen van tumorsuppressorgenen zal er een stijgende proliferatie en apoptoseresistentie ontstaan. Kankercellen blijken slechts één doel te hebben namelijk zichzelf kopiëren. Een defecte apoptose kan een reden van therapieresistentie zijn. (3, 4, 22)

Het genoom van de cel wordt continu aangevallen door verscheidene chemische reactieve moleculen, velen afkomstig van de oxidatieve fosforylatie en de daaruit resulterende ROS. Het genoom kan ook onderhevig zijn aan spontane chemische wijzigingen welke de DNA-basen beïnvloeden. Bovendien kan het DNA-genoom van de cellen aangevallen worden door mutagene moleculen van vreemde oorsprong zoals pollutie maar ook voedsel. Cellen proberen velen van deze componenten te detoxifieren vooraleer ze het genoom kunnen aanvallen. Alhoewel de bijproducten van deze reacties soms reactiever en mutagener zijn dan de oorspronkelijke molecule. Als de aanvallende mutagenen het DNA kunnen schaden, zullen tal van eiwitten liggen te wachten om de beschadigde basen te kunnen

verwijderen. Erfelijke defecten in de mismatch-repair-eiwitten kunnen leiden tot een verhoogde vatbaarheid voor bepaalde soorten van kanker zoals de erfelijke vorm van darmkanker. (3)

De incidentie van sommige kankers is vergelijkbaar in de wereld maar vele kankers hebben een enorme variatie in voorkomen van land tot land. Verschillen in erfelijkheid en omgeving zouden deze variaties kunnen verklaren. Omgevingsfactoren blijken zelf de voornaamste factor te zijn voor deze interlandelijke verschillen in incidentie. Carcinogenen zijn risicofactoren voor de ontwikkeling van kanker. Er zijn al veel carcinogenen ontdekt waaronder bepaalde voedingsstoffen, gefrituurd of verbrand voedsel, medicamenten met geslachtshormonen, tabaksrook, x-stralen en alcohol. Bepaalde virussen en schimmels mogen ook niet vergeten worden als mogelijke oorzaak. Alle mutagenen zijn carcinogenen. Omgekeerd geldt dit niet. Carcinogenen veroorzaken kanker ofwel via het muteren van genen ofwel via niet-genetische mechanismen. De niet-mutagene carcinogenen worden ook wel tumorpromotors genoemd. (3)

3.3.3.1.1 Erfelijke mutaties.

Sommige mutaties die een sterk verhoogd risico op het ontstaan van kanker geven, kunnen overgeërfd worden. Voorbeelden van erfelijke mutaties zijn het BRCA1-gen en het BRCA2-gen. Bij overerving van een dergelijke mutatie hebben vrouwen een verhoogd risico op het ontwikkelen van borstkanker of ovariumkanker. (4)

3.3.3.1.2 Verworven mutaties

3.3.3.1.2.1 Infecties.

Meerdere ziekteverwekkers worden geassocieerd met het ontstaan van kanker. Zo geeft het Humaan Papillomavirus een verhoogde kans op cervixcarcinoom. Het Epstein-Barrvirus geeft een verhoogde kans op het Burkitt-lymfoom en de bacterie *Helicobacter Pylori* geeft een verhoogde kans op maagkanker. (4)

3.3.3.1.2.2 Fysische factoren.

UV-straling en ioniserende straling kunnen mutaties veroorzaken en bijgevolg ook kanker. (4)

Ioniserende stralen zijn stralen met een grote energie-inhoud en een korte golflengte die de moleculen waarop ze vallen elektrisch kunnen laden. Op die manier kunnen ze het DNA beschadigen door mutaties van de genen. Voorbeelden van ioniserende stralen zijn X-stralen gebruikt in röntgenfoto's, gammastralen die vrijkomen bij de ontploffing van een atoombom en kosmische stralen welke aangetroffen worden in het heelal. De ioniserende stralen kunnen mutaties in dieper gelegen weefsels

veroorzaken en rechtstreeks de kans op kanker doen toenemen doordat ze de proto-oncogenen in het lichaam activeren. (4)

Het zonlicht bevat UV-stralen. Deze zijn niet-ioniserend maar kunnen toch lichaamsdelen beschadigen door brandwonden te veroorzaken of door de kans op huidkanker aanzienlijk te verhogen. (4)

Bij laag geconcentreerde straling kan ons lichaam de beschadigde cellen nog herstellen, pas bij intensieve blootstelling is er een sterk verhoogd risico op het ontstaan van kanker. (4)

3.3.3.1.2.3 *Chemische stoffen.*

Verschillende chemische stoffen zijn carcinogenen. Een voorbeeld is asbest die een verhoogde kans geeft op het ontwikkelen van een mesothelioom. De chemicaliën kunnen nieuwe mutaties teweeg brengen die eventueel tot kanker kunnen leiden. Chemicaliën zouden verantwoordelijk zijn voor 80 à 90% van alle kankergevallen die bij de mens voorkomen. (4)

3.3.3.2 **Van mutatie naar kanker**

3.3.3.2.1 Algemeen

De tumorvorming is een ingewikkeld proces bestaande uit verschillende veranderingen in de cel waaronder het aantasten van de fysiologische controlemechanismen en het wijzigen van het fenotype van de cel. De complexiteit van dit proces weerspiegelt zich in de langdurige periode waarin de meeste humane tumoren zich ontwikkelen. Sommige van deze fysiologische veranderingen treden op als onmiddellijk gevolg van exogene mutagenen. In vele gevallen wordt de snelheid van de tumorprogressie bepaald door de actie van niet-mutagene tumorpromotors en zorgen deze ook voor mitogene stimulatie en inflammatie. (3)

Kanker treedt pas op wanneer in een aantal genen mutaties zijn opgetreden. Met elke mutatie is de kans op een nieuwe mutatie steeds groter. Om werkelijk kanker te ontwikkelen, moeten de mutaties optreden in genen die betrokken zijn in de regulatie van de celdeling waaronder proto-oncogenen, tumorsuppressorgenen, genen die de apoptose regelen en genen die de DNA-repair regelen. In kanker is er door de mutaties een activatie van oncogenen en een inactivatie van tumorsuppressorgenen wat de cel toelaat ononderbroken te delen. Bij elke deling is er ook telkens een nieuwe kans op het ontstaan van een mutatie. Door onderdrukking van de apoptosegenen kan de gemuteerde cel niet vernietigd worden. (3, 4)

3.3.3.2.2 Proto-oncogenen

Proto-oncogenen zijn groeiregulerende genen en zijn verantwoordelijk voor de groei en de deling van de cellen. Indien een mutatie optreedt in een proto-oncogen kan deze veranderen tot een oncogen. Een oncogen is een overactief proto-oncogen en zet de cel aan tot excessieve deling of zelfs onbeperkte groei wat kan ontaarden in een tumor en de proliferatie van kankercellen kan bevorderen. In het geval van de proto-oncogenen volstaat slechts één mutatie om kanker te ontwikkelen. (3, 4)

3.3.3.2.3 Tumorsuppressorgenen

Tumorsuppressorgenen, ook wel ‘gate keepers’ genoemd, zorgen er voor dat de cellen niet ongebreideld door kunnen gaan met delen. Wanneer in de tumorsuppressorgenen een mutatie optreedt, kan de controle van de celdeling verloren gaan en kan de cel ongehinderd verder gaan met delen. Verlies van tumorsuppressorgenen heeft slechts een invloed op het fenotype van de cel als beide kopieën van het gen verloren zijn gegaan. Het verlies van de tumorsuppressorgenfunctie kan ontstaan ofwel via genetische mutaties ofwel via epigenetische uitschakeling van de genen door hypermethylering van de promotorregio van het gen. In de ontwikkeling van kanker komt het verlies van tumorsuppressorgenen frequenter voor dan de activatie van oncogenen uit proto-oncogenen. De meest frequente mutatie is in het tumorsuppressorgen p53. (3, 4, 20)

3.3.3.2.4 Apoptosegenen

Wanneer een cel niet meer normaal functioneert, gaan de apoptosegenen ervoor zorgen dat de cel vernietigd wordt. Bij kanker zijn de apoptosegenen vaak uitgeschakeld waardoor abnormale cellen overleven. (4)

3.3.3.2.5 DNA-repairgenen

Alle lichaamscellen hebben DNA-repairgenen. Met deze DNA-repairgenen kunnen fouten in het DNA hersteld worden. Bij mutatie van een DNA-repairgen kunnen afwijkingen in het DNA onvoldoende hersteld worden waardoor er steeds meer defecten ontstaan in het DNA van die cel. (4)

3.3.3.3 Andere genmutaties

In het ontstaan van kanker blijft het echter niet bij de mutaties van bovengenoemde genen. Hoe verder in het kankerproces, hoe meer mutaties zullen optreden. Er kunnen nieuwe bloedvaten naar de tumor toe worden aangelegd door de vrijstelling van factoren zoals ‘*Vascular Endothelial Growth Factor*’ (VEGF). Dit wordt angiogenese genoemd en is een kritische snelheidsafhankelijke determinant van de groei van alle tumoren groter dan ongeveer 0,2 mm. (4)

De kankercellen kunnen omliggend weefsel invaseren of kunnen metastaseren naar een andere plaats in het lichaam. Invasie en metastasen zijn verantwoordelijk voor 90% van de kankergerelateerde mortaliteit. Vele stappen van de invasie-metastase-cascade worden uitgevoerd door de kankercellen die de '*epitheliale-mesenchymale transitie*' (EMT) activeren, welke normaal enkel gebruikt wordt tijdens de vroege embryogenese en gedurende de wondheling. Signalen die vrijgesteld worden door de omgeving van de kankercel samen met de genetische en epigenetische veranderingen in het kankercelgenoom, zijn verantwoordelijk voor de expressie van EMT-geïnduceerde transcriptiefactoren in de kankercel en dus de activatie van het EMT. Het EMT brengt het verlies van epitheliale celgenexpressie met zich mee en zorgt voor het verwerven van een mesenchymale celgenexpressie. De kankercellen kunnen zich verplaatsen via de lymfevaten naar de lymfeknopen alhoewel ze zich meestal via de hematogene weg verplaatsen. (4)

De ontaarde cellen kunnen 'onsterfelijk' worden. Terwijl een normale cel maximaal 60 keer kan delen, zullen kankercellen deze limiet niet kennen. Kankercellen zullen zich dan ook nauwelijks nog met hun oorspronkelijke functie bezighouden, maar al hun energie aanwenden om te kunnen delen. (4)

3.3.3.4 Complex 1- en 2-mutaties

Er is een correlatie tussen de mutaties in de mitochondriale genen die een weerslag vertonen in de complexen van de oxidatieve fosforylatie en specifieke soorten van kanker. Zo bijvoorbeeld wordt succinaat dehydrogenase (complex 2) geassocieerd in de carcinogenese van het erfelijke feochromocytoom, een tumor van het bijniermerg. In de meeste feochromocytomen was de succinaat-dehydrogenase-activiteit gereduceerd maar ook de activiteit van de andere oxidatieve-fosforylatiecomplexen was significant verlaagd in vergelijking met die activiteit in normaal nierweefsel. Er was dus een veralgemeende daling van de mitochondriale respiratie. Zelden is er enkel complex-1-verlies samen met een upregulatie van de overige complexen in feochromocytomen, welke het fenotype kenmerkend voor oncocytsche tumoren is. (26)

Een oncocytoom, een adenoom bestaande uit oncocyten, wordt gekenmerkt door een hyperproliferatie van de mitochondriën. Toch is er een verlies van complex 1 en een compensatoire upregulatie van de andere complexen wat leidt tot een verhoogde transcriptie van de subeenheden van de complexen. In de helft van de onderzochte oncocyten was er een volledige afwezigheid van complex 1 door mutaties in het mitochondriale DNA die coderen voor complex-1-subeenheden. Complex-1-deficiëntie samen met de upregulatie van de mitochondriën is typerend voor oncocyten. Daarom moet complex 1 worden toegevoegd aan de lijst van mitochondriale tumorsuppressoren. (27)

Ganglioneuromen, tumoren bestaande uit zenuwcellen, tonen een significante daling van de oxidatieve fosforylatie-enzymen-activiteit. Ook de citraatsynthase-activiteit was verminderd. Daarenboven was er

een verlies van mitochondriën in de ganglioneuromen. Dit in tegenstelling tot neuroblastomen, waar er ook een reductie was in de oxidatieve fosforylatie-enzymen-activiteit maar geen verlies van de mitochondriale massa. De kennis van het ontstaansmechanisme van het Warburgeffect in kankercellen is een start voor studies met als doel een mogelijke therapeutische strategie te vinden gericht op het herstel van het aërobe energiemetabolisme. (28)

3.3.4 Energieproductie

3.3.4.1 Het Warburgeffect

Normaal wordt in het lichaam energie geproduceerd door de oxidatieve fosforylatie in de mitochondriën. De winst is 36 ATP per glucose. Bij de meeste vaste tumors gebeurt het metabolisme van glucose enkel via de aërobe glycolyse. Doordat de vroege fase van de carcinogenese in een hypoxische omgeving gebeurt, kunnen de cellen in het begin enkel op de anaërobe glycolyse rekenen voor hun energieproductie. Door de vele tumorvoordelen die hiermee gepaard gaan zal ondanks het feit dat de tumor uiteindelijk gevasculariseerd wordt en de zuurstofconcentratie zal stijgen, het glycolytisch fenotype persisteren. Dit noemt men het Warburgeffect. Dit zou resulteren uit een mitochondriale disfunctie. (8, 9, 29)

De kankercel kan tot het 'Warburgeffect' komen via vele overlappende wegen. Mutaties in de respiratoire ketencomponenten en een zuurstofarme micro-omgeving met bijgevolg activatie van HIF-1 α zijn nodig. Ook voldoende oncogene signalen via P13K/AKT/ mTor, MYC and RAS zijn noodzakelijk voor een verschuiving naar een glycolytisch metabolisme. Dit glycolytische fenotype gaat waarschijnlijk gepaard met veranderingen in de genexpressie die leiden tot apoptoseresistentie en verhoogde metastasepotentialiteit. Therapeutisch mikken op deze wegen zou kunnen leiden tot antitumoractiviteit. Inhibitoren van glycolytische enzymen zoals hexokinase, fosfofructokinase en lactaatdehydrogenase werden reeds bestudeerd als potentiële antikankertherapie. (29-31)

Bij de glycolyse heeft men een winst van 2 ATP per glucose. Vermits dit beduidend minder is dan met de oxidatieve fosforylatie, gebeurt een upregulatie van glucosereceptoren en een stijgende glucose-opname in de kankercel. Hierdoor is er dus toch een grote energieproductie mogelijk. Met '*Positron Emission Tomography imaging*' (PET) kan gezien worden dat er meer glucose-opname en -metabolisatie is in kankercellen in vergelijking met normale weefsels. (8) De activiteit van de oxidatieve fosforylatie bepaalt de hoeveelheid glucose die gebruikt zal worden door de aërobe glycolyse. (18)

In het begin van de carcinogenese is er nog geen angiogenese en dus onvoldoende aanvoer van zuurstof in de cellen. Deze hypoxische toestand van de tumorcel activeert de transcriptiefactor HIF-1 α die de expressie van glucosetransporters en een upregulatie van glycolytische enzymen induceert waaronder een verhoogde expressie van PDK. Het glycolysemetabolisme is een adaptatiemechanisme

van de kankercel tegen de hypoxie. Upregulatie van glycolytische enzymen leidt tot een verhoogde omzetting van glucose naar pyruvaat en een verhoogde glycolytische productie van ATP. (8, 9)

Hypoxie maakt een kanker meer invasief, verhoogt zijn kans op metastasering en maakt de kanker resistent tegen chemotherapie en radiotherapie. Vele tumoren bevatten hypoxische regio's door een chaotische vascularisatiestructuur met oneven afgifte van zuurstof en door de bredere afstand tussen de capillairen. In goed geoxygeneerde cellen is zowel de concentratie als de activiteit van HIF-1 α beperkt. HIF-1-activiteit speelt een belangrijke rol in het ontstaan van het Warburgeffect en bevordert ook de compensatoire angiogenese via transcriptie van VEGF- en angiogeningenen. (32)

Testen uitgevoerd in een glucosemilieu hebben aangetoond dat de toevoeging van glycolyse-inhibitoren zoals iodoacetaat een grote daling van ATP tot gevolg heeft. In tegenstelling tot de glycolyse-inhibitoren hebben oxidatieve-fosforylatie-inhibitoren zoals oligomycine en atractyloside weinig effect op ATP. (33)

De glycolyse zorgt voor een snelle ATP-synthese. Bovendien dragen de bijproducten van de glycolyse, het lactaatzuur, bij tot de afbraak van de extracellulaire matrix. Dit vergemakkelijkt de celmobiliteit en verhoogt de invasie- en metastasemogelijkheid. Het teveel aan pyruvaat wordt gebruikt voor de lipidesynthese. De glycolyse zorgt voor groeivoordelen en vergemakkelijkt spreiding en metastasering. (9, 29, 33)

Oorspronkelijk zal er vooral anaërobe glycolyse zijn, die snel zal veranderen in aërobe glycolyse éénmaal de angiogenese op punt is gesteld. (8)

Door bij een colonkankercel oligomycine, een inhibitor van het mitochondriale H⁺-ATPase, toe te voegen, zal er een downregulatie zijn van β -F1-ATPase en zal er meer aërobe glycolyse ontstaan. Door toevoeging van 2-deoxyglucose, een inhibitor van de glycolyse, zal er een upregulatie zijn van β -F1-ATPase en zal er meer oxidatieve fosforylatie zijn. Het staat vast dat colonkankerprogressie enkel mogelijk is wanneer de kankercellen zowel de oxidatieve fosforylatie als de apoptose onderdrukken. Door de gedaalde mitochondriale functie zal er minder ROS-productie zijn en bijgevolg apoptoseresistentie en tumorproliferatie. (18)

In kankercellen is de β -F1-ATPase-expressie verminderd in vergelijking met normale weefsels. Soms gaat het gepaard met een verhoogde expressie van glycolysemerkers. Cellen met verminderde β -F1-ATPase-expressie hebben grote ultrastructurele veranderingen in de mitochondriën. Er is zowel een verandering in het aantal mitochondriën per cel als een verandering in de graad van bio-energetische differentiatie. H⁺-ATPase is de belangrijkste organisator van het binnenste mitochondrionmembraan en regelt de cristaevorming. (18)

Zowel de foetale cellen als de kankercellen halen hun meeste ATP uit de glycolyse. Sommige tumoren produceren ATP toch via de oxidatieve fosforylatie. Deze variatie is afhankelijk van het type tumor, de graad, de oorsprong van het weefsel en de lokalisatie binnen het weefsel. Een hoge lactaatproductie wordt eveneens niet in alle tumoren gezien. De oorzaak hiervan is een verminderde mitochondriale biogenese door onder andere een verminderde expressie van Bcl-2. (33)

3.3.4.2 Verhoogde PDK-expressie

Door HIF-1 wordt het PDK geactiveerd. Dit geactiveerd PDK inhibeert het PDHc waardoor er een verminderde stroom van pyruvaat naar de mitochondriën is. Bijgevolg is de oxidatieve fosforylatie in het mitochondrion onderdrukt. Hierdoor wordt er minder ROS geproduceerd. In het cytoplasma neemt de glycolyse de overhand. Dit leidt tot een transformatie van het mitochondrion waardoor de apoptose niet meer kan doorgaan. (8)

Transcriptiefactor HIF-1 α werkt direct en indirect om de kankeruitbreiding te bevorderen, de angiogenesefactoren te vermeerderen en de chemotherapieresistentie te induceren. In sommige kankers is HIF-1 α -activiteit ook verhoogd in aërobe omgevingen, waardoor de kanker moeilijker te behandelen is. (32)

Door het glycolytisch fenotype stijgt de hoeveelheid pyruvaat in het cytoplasma. Deze grote hoeveelheid pyruvaat wordt omgezet in lactaat. Lactatacidose is de algemene toestand van een kankercel. Dit melkzuur vergemakkelijkt de tumorgroei door de afbraak van de extracellulaire matrix. Dit leidt tot uitbreiding, tot verhoogde celmobiliteit en dus verhoogde metastasemogelijkheid. Ook leidt dit tot de activatie van de angiogenese samen met HIF-1. Hoge concentraties van extracellulair lactaatzuur kan leiden tot therapieresistentie. Ondanks de vascularisatie zal de aërobe glycolyse toch persisteren omdat deze metabolische hervorming een voordeel biedt voor de kankercellen. Daarom zouden behandelingen, die PDK inhiberen en bijgevolg PDHc reactiveren, celdood kunnen induceren via de herstelling van de ROS-productie en de daarop volgende oxidatieve schade. (8, 34)

3.3.5 Apoptoseresistentie

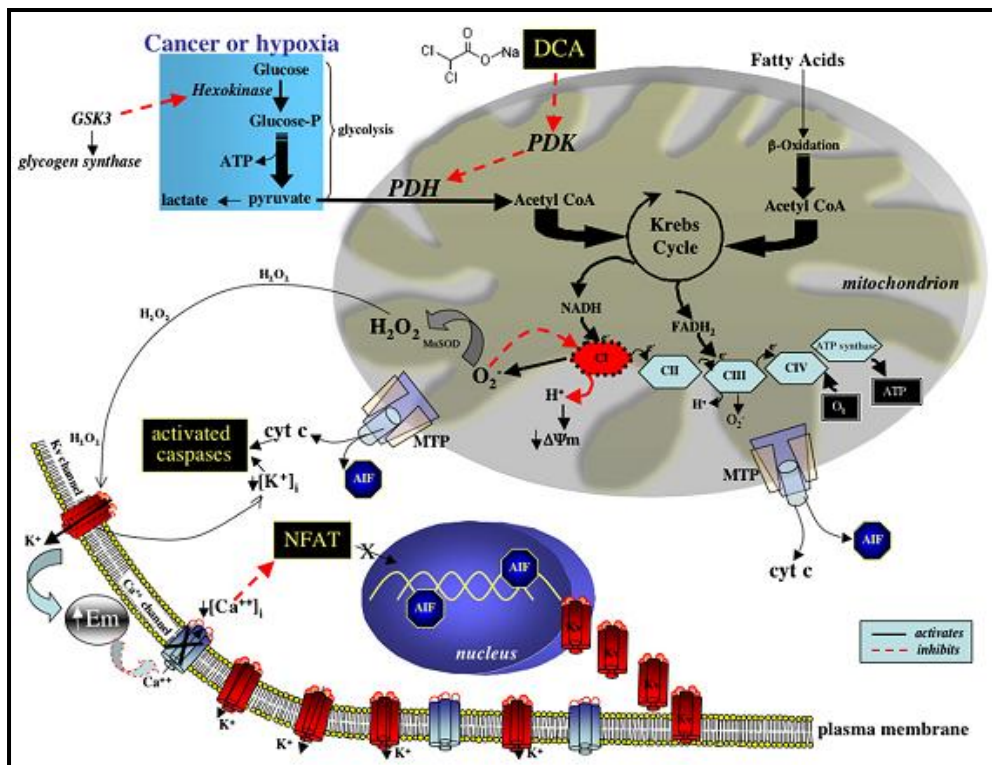
Apoptose is afhankelijk van de mitochondriale energieproductie. Vermits er een metabolische transformatie is van de mitochondriën in de kankercel door uitsluitend gebruik te maken van glycolyse, zijn de mitochondriale functies onderdrukt. Dit is een voordeel voor de kankercel want er kan geen apoptose meer plaatsvinden. (8)

Kankercellen kunnen deficiënt zijn onder andere in het complex 1 van de elektronentransportketen. Er zal minder oxidatieve fosforylatie plaatsvinden waardoor er een daling van de elektronenstroom is in de elektronentransportketen. Er is bijgevolg geen mitochondriale depolarisatie waardoor het

mitochondrion gehyperpolariseerd blijft. Ook zal de productie van ROS niet stijgen waardoor onder andere een tekort ontstaat van de productie van H_2O_2 . Hierdoor blijft het MTP-kanaal gesloten. Het cytochroom c en het AIF kunnen daardoor niet van het mitochondrion naar het cytosol stromen en kunnen dus ook geen apoptose induceren. De opening van deze MTP-kanalen wordt onder andere ook gereguleerd door de Bcl-2-gerelateerde anti-apoptotische en pro-apoptotische proteïnen. Dit leidt tot apoptoseresistentie. (8, 9)

Ook het K^+ -kanaal (Kv1.5 kanaal), een transmembraaneiwit die de doorgang van K^+ -ionen door het plasmamembraan toestaat, is geblokkeerd omdat er geen mitochondriale depolarisatie plaatsvindt en er geen productie is van H_2O_2 , een redelijk stabiel ROS, dat normaal geproduceerd wordt tijdens de oxidatieve fosforylatie. Doordat het K^+ -kanaal gesloten is, zullen de K^+ -ionen intracellulair in het cytosol stijgen. Deze oefenen een inhibitie op de caspases uit met onderdrukking van de apoptose tot gevolg. Bovendien zal door het grote aantal K^+ -ionen intracellulair, het plasmamembraan gedepolariseerd zijn. Dit zorgt voor het openen van Ca^{2+} -kanalen en een stijging van de intracellulaire Ca^{2+} -concentratie. Hetwelke zal leiden tot een stijgende proliferatie en activatie van transcriptiefactoren. Zo is NFAT₁, een Ca^{2+} -gevoelige transcriptiefactor, geactiveerd in kanker. Deze zorgt voor een stijging van het anti-apoptotische bcl-2 welke leidt tot een downregulatie van de K^+ -kanalen. Als gevolg hiervan ontstaat een proliferatievoordeel en dus tumorgroei. Hoe agressiever de kanker, hoe meer geactiveerd NFAT₁ aanwezig is. Het effect van NFAT₁ wordt versterkt door een positieve feedbacklus door de K^+ -kanalen-activiteit laag te houden. (8, 9)

Zowel de daling van de activiteit van de K^+ -kanalen als de MTP-kanalen leidt tot een anti-apoptotische kankercel wat te zien is op figuur 11. (8)



Figuur 11 Apoptoseresistentie in kankercel door metabolische hervorming (9)

Sommige enzymen die betrokken zijn in de glycolyse zijn ook regulatoren van de apoptose en de gentranscriptie. Dit kan ook leiden tot apoptoseresistentie. P53 regelt de expressie van de glycolytische enzymen en de expressie van een subeenheid van het cytochroom-c-oxidase, een belangrijke factor van het complex IV van de elektronentransportketen in de mitochondriën. Verlies van p53-functie in kankercellen induceren metabolische en mitochondriale veranderingen coherent met het glycolytische fenotype. Zo bijvoorbeeld is er een verhoogde expressie van hexokinase in de kankercel door p53-mutatie en HIF-1-activatie. Geactiveerd hexokinase inhibeert MTP-kanalen. Ook het oncoproteïne Akt is geactiveerd in vele kankers. De mitochondriale respiratoire deficiëntie leidt tot de activatie van Akt via de NADH-gemedieerde inactivatie van het tumorsuppressorgen PTEN, dat Akt in normale omstandigheden antagoneert. Het NADH zal in de kankercellen accumuleren omdat het in de normale cel verbruikt wordt in de oxidatieve fosforylatie. Akt induceert de expressie en activiteit van glycolytische enzymen waaronder hexokinase. Ook de c-myc-transcriptiefactor verhoogt de expressie van glycolyse-enzymen en kan dus het glycolytisch fenotype induceren. (8, 9, 34)

Mitochondriale disfunctie in kankercellen is reversibel. De normalisatie van het mitochondriale membraanpotentiaal leidt tot apoptoseverhoging en vermindering van tumorgroei. Hoe meer gehyperpolariseerd het mitochondriale membraan is, hoe agressiever de tumor is en hoe meer kans er op metastasering is. Er wordt verondersteld dat het behouden van een gehyperpolariseerd mitochondriale membraan essentieel is voor kankerceloverleving. (9, 30)

Organismen blokkeren de ontwikkeling van kanker via de acties van het p53-eiwit, welke geactiveerd wordt wanneer het regulerend mechanisme voor celproliferatie niet meer goed functioneert of de cel blootgesteld wordt aan fysiologische stress. Het geactiveerde p53-eiwit functioneert dan als transcriptiefactor en kan celcyclusstop veroorzaken via apoptose door de expressie van pro-apoptotische proteïnen. De omzetting van p53 wordt geblokkeerd door een variëteit aan signalen veroorzaakt door fysiologische stress of DNA-schade door mutaties. Het verlies van apoptotische functies door p53-afwijkingen laat de kankercel toe te overleven in tal van celfysiologische stresssituaties zoals anoxie en DNA-schade. Kankercellen vinden tal van wegen om het apoptosemechanisme van de cel te inactiveren. Een eerste weg is via de activatie van Akt waardoor er een stijging ontstaat van de anti-apoptotische Bcl-2-proteïnen. Een tweede weg is via de inactivatie van p53 door mutaties in het p53-gen. Een derde weg is via de methylering van verschillende promoverende pro-apoptotische genen welke interfereren met de cytochroom-c-loslating uit de mitochondriën. Een vierde weg is via de inhibitie van de caspases. (3)

3.3.6 Niet-oncogene genetische veranderingen

Door verlies van '*Mitochondrial Ribosomal Protein L28*' (MRPL28) in tumorcellen, als gevolg van genetische wijzigingen, is er meer glycolyse en minder mitochondriale activiteit. Dit werd onder andere ook gezien bij verlies van MRPL12 en cytochroom-c-oxidase. Ondanks de lagere energieproductie is er toch een groeivoordeel. Tumorgroei wordt gereguleerd door verandering in zuurstofgebruik als gevolg van niet-oncogene genetische veranderingen die het mitochondriale metabolisme regelen. (35)

Vermits het mitochondrion verantwoordelijk is voor het grootste O₂-verbruik in de cel, namelijk 70 à 90% van het totale zuurstofverbruik, zal een verminderde mitochondriale functie een groot effect hebben op het O₂-gebruik. Hoe minder MRPL28 aanwezig is, hoe minder het zuurstofverbruik en hoe groter de tumorgroei is. Verlies van MRPL28 geeft geen verschil in het aantal apoptotische kankercellen maar geeft wel een stijging van het aantal prolifererende cellen. (35)

3.3.7 Wisselende cellulaire omgeving

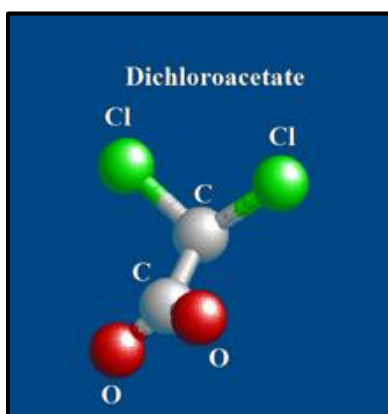
Een verhoogde glucoseconcentratie begunstigt de glycolyse terwijl een verhoogde oxygenatie ook meer zuurstofbijproducten geeft en daardoor het cellulair leven verkort. Hypoxie in de micro-omgeving van de tumor verhoogt het glycolytisch metabolisme door de activatie van de HIF-1-transcriptiefactor waardoor inductie ontstaat van PDK1 en PDK3 in de tumorcellen. De verhoogde glycolyse leidt tot verhoogde productie van lactaat welke bijdraagt tot de zure extracellulaire pH en de verdere veranderingen in de genexpressie. Er werden regio's van hypoxie en acidose gemeten in de tumoren wat betekent dat de tumorvaten geen constante omgeving behouden voor de groei van de

tumorcellen. De onvoldoende zuurstoflevering vanuit de tumorvaten initieert telkens een aangepast antwoord van de tumorcellen. (16)

3.4 Dichlooracetaat

3.4.1 Algemeen

DCA is een kleine molecule van 150 Dalton. Oraal kan het zelf tot 100% biologische beschikbaar bereiken. Na orale inname penetreert het DCA de meeste weefsels en zelfs de hersenen. Door zijn eenvoudige structuur (zie figuur 12) is DCA een goedkoop middel. (8)



Figuur 12 Molecule dichlooracetaat (36)

DCA kan alle 4 isoenzymen van PDK inhiberen maar met een variabele sensitiviteit. DCA heeft de hoogste sensitiviteit voor PDK-2 in de meeste weefsels. PDK-1 en PDK-4 zijn relatief gevoelig voor DCA en PDK-3 is de meest resistente isovorm. (8, 16, 29)

3.4.1.1 Omgevingsbronnen

DCA is één van de vele halogenen waar mensen al chronisch aan blootgesteld zijn geweest. Omgevingsbronnen van DCA zijn gechloreerd drinkwater en grondwater gecontamineerd door verschillende industriële solventen en andere gechloreerde precursoren.(37)

3.4.1.2 Gebruik in mitochondriale ziekten

Al meer dan 40 jaar wordt DCA op de mens gebruikt voor de hemodynamische gevolgen van lactaatacidose bij gecompliceerde malaria, sepsis, congestief hartfalen, cirrose, brandwonden, levertransplantaties en congenitale mitochondriale ziekten. Vooral bij patiënten met PDHc-deficiëntie is de behandeling van lactaatacidose met DCA positief. De dosissen voor de behandeling van lactaatacidose liggen tussen de 12,5-100 mg/kg/dag oraal of intraveneus. Met DCA wordt het lactaatsniveau verlaagd maar er is geen effect op de primaire oorzaak van de ziekte. (8, 12)

Primaire arteriële hypertensie is een neoplastische aandoening waarin er een mitochondriale disfunctie ontstaat met een hyperproliferatie van cellen in de pulmonaire vasculatuur. Dit kan leiden tot verhoogde pulmonaire vasculaire weerstand, falen van het rechter hartventrikel en premature dood. Er werd aangetoond dat DCA de mitochondriale schade en de cellulaire proliferatie kan omkeren met als gevolg een verbetering van de longfunctie. DCA zou de oxidatieve fosforylatie stimuleren en apoptose van de prolifererende cellen induceren. (38)

3.4.1.3 Effect op het lactaatsniveau

DCA vermindert de lactaatconcentratie in het plasma van patiënten met diabetes, verworven lactatacidose en erfelijke mitochondriale afwijkingen. Dit is het onmiddellijke gevolg van de inhibitie van PDK door DCA. (8, 22)

Het gebruik van DCA is optimaal voor het bereiken van het laagste lactaatsniveau in het bloed en het cerebrospinaalvocht. Bij een dosis DCA van 35-50 mg/kg gaat lactaat dalen tot 60% en activeert het PDH tot 3 à 6 maal. (8)

3.4.1.4 Farmacokinetiek

DCA werkt volgens een ééncompartimentsmodel. DCA inhibeert zijn eigen metabolisme waardoor de klaring van DCA vermindert na vele dosissen. Dit heeft geen biologisch effect. De eerste halfwaardetijd is minder dan 1 uur maar na vele dosissen kan het tot meerdere uren gestegen zijn en vervolgens blijft het in een plateau fase. Dit betekent dat bij chronische inname van DCA er geen continue stijging is van de halfwaardetijd. De inhibitie van PDK is niet onmiddellijk omkeerbaar waardoor bij daling van de DCA-concentratie het effect op het lactaatsniveau toch nog even blijft duren. (8)

3.4.1.5 Onderzoek

In één van de artikelen maken ze gebruik van iTRAQ om de fosforylatie van PDH te onderzoeken. Veranderingen in mitochondriale eiwitten is een dynamisch proces. Cyclussen van fosforylatie en defosforylatie van PDH wisselen elkaar af. iTRAQ is daarbij een kwantitatieve methode om de fosforylatie van PDH te onderzoeken en het effect van DCA op PDH. (39)

3.4.1.6 Effect afhankelijk van het type moleculaire abnormaliteit

Het effect van DCA is afhankelijk van het type moleculaire abnormaliteit. Een deficiënte PDHc-activiteit ten gevolge van een puntmutatie in E1 α zal door het gebruik van DCA gecompenseerd worden. Dit komt omdat DCA E1 α activeert zonder een effect te hebben op E1 β -kinase. (12)

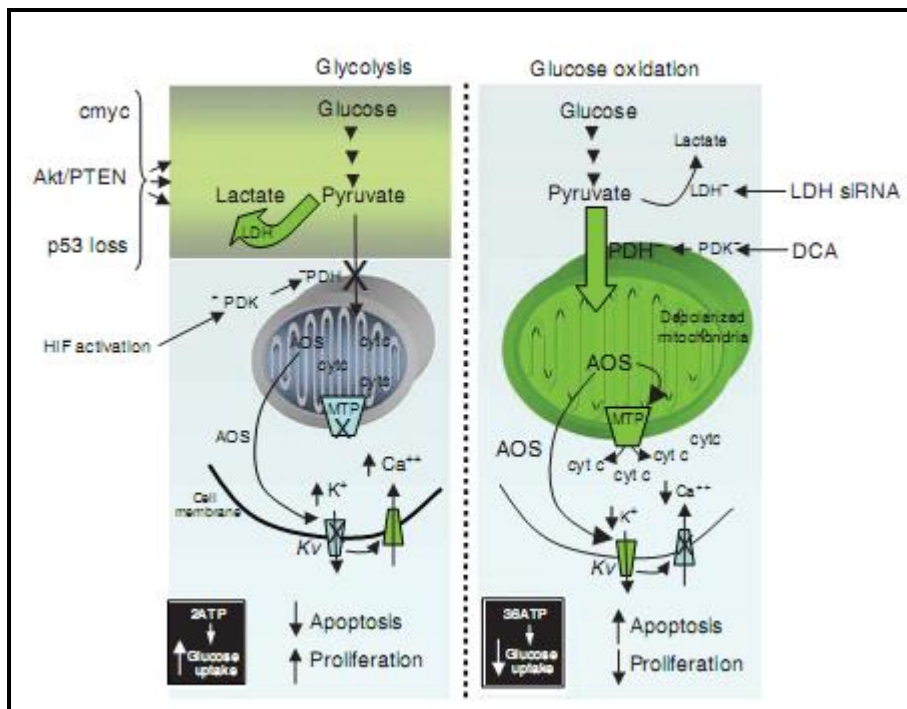
Het kortetermijneffect van DCA, binnen de 15 minuten, is de inhibitie van PDK en dus een stijgende activatie van PDHc. Het langetermijneffect van DCA, binnen de 3 tot 5 dagen, is de dalende E1 α -degradatie en dus de stijgende E1 α -hoeveelheid. E1 α is de enige subeenheid waar het steady-state-niveau significant gewijzigd wordt door chronische DCA-behandeling. Er is geen significant effect op de turn-over van de andere componenten van PDHc. (12)

3.4.2 Het effect op de kankercel

3.4.2.1 Inhibitie PDK

Een metabolische-elektrische remodellering regelt de apoptoseresistentie die vele menselijke kankers karakteriseert. DCA, een kleine molecule die zich richt op de mitochondriën, keert deze remodellering om. DCA induceert apoptose en vermindert de kankergroei zonder de niet-cancereuze cellen aan te vallen. De grootste actie van DCA gaat door in de matrix van het mitochondrion. DCA richt zich dus op de verandering van de metabolische hyperpolarisatie van de mitochondriën en op het elektrische van de gedownreguleerde K⁺-kanalen. DCA induceert apoptose via 2 wegen. De eerste weg is in het mitochondrion zelf en de tweede weg is in het plasmamembraan. (9, 38)

DCA inhibeert PDK. De inhibitie van PDK zal leiden tot de activatie van PDH waardoor het metabolisme van pyruvaat verandert van een zuurstofafhankelijke lactaatvorming in het cytosol tot een zuurstofafhankelijke vorming van acetyl-CoA in de mitochondriën. Door de verhoogde productie van NADH, een substraat van het complex-1 van de elektronentransportketen wordt de glucose-oxidatie bevorderd boven de glycolyse en de vetzuuroxidatie. Het mitochondriale membraan zal hierdoor snel depolariseren waardoor het gehyperpolariseerde membraanpotentiaal terugkeert naar die van een niet-cancereuze cel zonder invloed te hebben op de mitochondriën van de normale cellen. De DCA-geïnduceerde daling van het membraanpotentiaal wordt gelimiteerd door het '*voltage-dependent anion-selective channel*' (VDAC), een belangrijke component van MTP. Ook zal de oxidatieve fosforylatie zorgen voor een stijging van de ROS-productie en het H₂O₂ waardoor het K⁺-kanaal en het MTP-kanaal open zullen gaan (zie figuur 13). (8, 9, 37, 40, 41)



Figuur 13 Glycolyse versus door DCA-geïnduceerde oxidatieve fosforylatie (8)

Een blijvende verhoogde ROS-productie kan oxidatieve schade veroorzaken aan de elektronentransportketen en vooral aan het complex 1. Een ROS-geïnduceerde complex-1-disfunctie kan de efflux van H^+ beperken waardoor het membraanpotentiaal van de mitochondriën gaat dalen. Een vermindering van het mitochondriale membraanpotentiaal doen de MTP-kanalen opengaan via een stijgende expressie van Bax waardoor pro-apoptotische enzymen kunnen vrijkomen en apoptose induceren. Door de opening van het MTP-kanaal zal er een stroming zijn van cytochroom c en AIF uit het mitochondrion naar het cytosol. Deze zullen de caspasen-9 en -3 activeren. Dit zal de ROS-productie nog meer doen stijgen waardoor er een versterkende positieve feedbacklus ontstaat. Dit leidt tot inductie van mitochondriënafhankelijke apoptose. (9, 37)

DCA zal zorgen voor de activatie van de H_2O_2 -afhankelijk K^+ -kanalen wat leidt tot plasmamembraanhyperpolarisatie. Hierdoor worden Ca^{2+} -kanalen geïnhibeerd en zal het intracellulair Ca^{2+} dalen. Bijgevolg worden de transcriptiefactoren zoals NFAT₁ geïnactiveerd en de caspasen niet meer geïnhibeerd. In kanker is er een verhoogde intracellulaire Ca^{2+} -concentratie. Dit activeert calcineurin die NFAT activeert, waardoor het de gentranscriptie kan regelen. Calcineurin is geïnhibeerd door de hoge ROS-concentratie. Een upregulatie van de K^+ -kanalen verloopt via de desactivatie van NFAT₁. Dit leidt tot een daling van de proliferatie en tot omkering van de onderdrukte apoptose. DCA vermindert tumorgroei in vitro en in vivo. (8, 9, 30, 37, 40)

Er zal een daling van de lactaatconcentratie worden gezien bij DCA-toediening en een stijging van de intracellulaire pH. Dit zou eventueel kunnen leiden tot een daling van de tumorinvasiviteit. Survivin is

gedownreguleerd in DCA-behandelde ratten. DCA-behandeling zorgt ook voor een inhibitie van HIF-1 α , bevordert de p53-activatie en onderdrukt de angiogenese zowel in vitro als in vivo. (9, 41)

Bij gebruik van DCA stijgt de oxidatieve fosforylatie in de kankercel. Dit gaat gepaard met een hoger zuurstofgebruik met als gevolg een grotere hypoxische toestand. Bijgevolg is er minder proliferatie en tumorgroei mogelijk. (35)

Een middel dat enkel de glycolyse inhibeert, zou onvoldoende zijn. Bij gebrek aan influx van pyruvaat in de mitochondriën zouden de mitochondriën nog altijd inactief blijven. De cel zou een tekort aan ATP ondervinden en door necrose sterven. Bovendien zou dit toxisch zijn voor de niet-cancereuze cellen die afhankelijk zijn van de glycolyse voor hun energieproductie. Apoptose is een energieproces dat actieve mitochondriën vereist. Dit maakt duidelijk dat we een product nodig hebben die de koppeling tussen glycolyse en oxidatieve fosforylatie maakt, een product dat PDHc activeert zoals DCA of een product dat 'lactaatdehydrogenase' (LDH) inhibeert zoals siRNA. Zowel DCA als siRNA zorgen voor meer apoptose en minder proliferatie van de tumorcel (zie figuur 13). Ook is er een daling van het serumlactaat. (8, 12) Functionele mitochondriën kunnen geen tumorgroei bevorderen. Bij het herstel van de mitochondriale functie zal er tumorregressie zijn. (18)

3.4.2.2 In vivo en in vitro testen met DCA

Er wordt gesuggereerd dat door de stimulatie van de mitochondriale functie ten koste van de glycolyse het groeivoordeel van hoog glycolytische tumoren geblokkeerd wordt. DCA heeft een betere in vivo activiteit dan in vitro activiteit en dit suggereert dat het unieke groei- en metabolisme-aspect van vaste tumoren moeilijk te hernemen is in vitro en dit kan belangrijk zijn voor het bepalen van de effectiviteit van dit type middel. (16)

De vele signalen die een impact hebben op de PDH-activiteit in vivo hebben ook een grote invloed op het effect van DCA. Toediening van DCA tijdens de vasten zou een totaal ander effect kunnen hebben in vergelijking met toediening tijdens een welgevoede toestand. De antwoorden voor humorale condities zijn duidelijk verschillend voor verschillende weefsel- en tumorsoorten en dus moeilijk na te bootsen in vitro. Het testen op dieren zal dus altijd de beste manier zijn om DCA preklinisch te evalueren. (16)

3.4.2.3 Effect afhankelijk van de omgevingsfactoren

DCA vermindert de kankercelproliferatie zowel in hypoxie als in normoxie. Toch zou de uitgebreidheid van hypoxische en anoxische regio's in tumoren mogelijks het effect van DCA beïnvloeden. (29, 34)

Het effect van DCA is groter in weinig gedifferentieerde en gemetastaseerde tumoren dan in goed gedifferentieerde tumoren.(29)

3.4.3 Effect op de normale cel

DCA is aantrekkelijk door zijn selectiviteit. Het feit dat DCA het membraanpotentiaal herstelt, kan uitleggen waarom het effect eerder in cellen met een heel hoge mitochondriale membraanpotentiaal zoals kankercellen voorkomt dan op normale cellen. De specifieke inhibitie van PDK kan ook mee zijn selectiviteit verantwoorden. Vermits niet-maligne cellen normaal niet enkel van de glycolyse gebruik maken voor hun energieproductie en dus ook geen geactiveerd PDK hebben, heeft DCA weinig tot geen effect op de proliferatie en de apoptose van normale cellen. DCA richt zich op de veranderingen die tijdens de carcinogenese zijn ontstaan waardoor er dus geen toxiciteit is voor de normale cellen. (9, 31, 34, 40)

Met DCA vermindert de proliferatie via inductie van apoptose uitsluitend in de kankercellen. Een vermindering van het lactaatniveau en de defosforylatie van PDH-E1 α door DCA gebeurt in alle cellen. DCA geeft enkel een vermindering van het mitochondriale membraanpotentiaal in de kankercellen. (29)

De cytotoxiciteit van DCA in normale cellen is dosisafhankelijk. Vanaf een dosis van meer dan 50 mM per dag is er wel een effect op de groei van niet-maligne cellen. (29, 42)

3.4.4 Bijwerkingen

De veiligheid en doeltreffendheid van DCA is al geëvalueerd geweest in gevallen van congenitale en verworven lactaatacidose en tonen relatief weinig toxiciteit. De meest significante bijwerking is een reversibele perifere neuropathie. Toch werden enkele ‘randomised control trials’ vroegtijdig gestopt wegens significante neurotoxiciteit of omdat er geen klinisch voordeel gevonden werd in de behandeling van lactaatacidose. DCA werd ook al gebruikt in klinische trials voor cardiovasculaire aandoeningen waaronder congestief hartfalen en ischemische hartziekten met positieve resultaten en het bevorderen van de myocardiale functie. (16, 30, 37)

De therapeutische dosis van DCA ligt tussen de 20 en 50 mM per dag. Bijwerkingen treden op vanaf 100 mg/kg/dag op het zenuwstelsel en de lever. (29) Volgens een ander artikel blijken bijwerkingen van perifere neuropathie al op te treden bij dosissen van 25mg/kg/dag en in nog een ander artikel vanaf 50mg/kg/dag. (34, 43) Men ziet een milde asymptomatische stijging van de serumconcentraties van alanine-aminotransferase en/of aspartaat-aminotransferase wat uiteindelijk kan leiden tot hepatocellulaire schade. Sommige artikels suggereren dat er bij hoge dosissen van DCA een verhoogde kans is op leverkanker. (34) Ook werden bij supratherapeutische dosissen van DCA

neoplasie en huidkanker teruggevonden. (29, 34, 37) Levertoxiciteit en neoplasie zijn gekende bijwerkingen van onze huidige chemotherapeutica. (37) Als andere bijwerkingen werden ook hoofdpijn en een mild sedatief effect terug gevonden. (43)

Een andere potentiële bijwerking van DCA is de reversibele neurotoxiciteit op de perifere zenuwen beschreven zowel bij knaagdieren als bij honden en bij mensen. De ernst van de toxiciteit blijkt leeftijdsafhankelijk te zijn waarbij volwassen personen vatbaarder blijken te zijn dan kinderen. Dit zou mogelijk kunnen verklaard worden door een verschillende farmacokinetiek en metabolisme van DCA in deze twee leeftijdsgroepen. Er was een hogere incidentie bij mannen in vergelijking met vrouwen. Ook is er waarschijnlijk een verband met het al dan niet hebben van diabetes mellitus. Indien vooraf al neurotoxische chemotherapie werd toegediend, geeft dit een hogere kans op het ontstaan van perifere neuropathie bij het gebruik van DCA. Ook de ernst wordt door voorafgaande of gelijktijdige toediening van neurotoxische therapie beïnvloed. (8, 16, 38, 43, 44) Het is meestal een reversibele perifere neuropathie. Toch is het gebruik dosisgelimiteerd en moet langetermijngebruik vermeden worden. (12, 41)

Het gebruik van DCA voor de behandeling van mitochondriale ziekten is beperkt door het ontstaan van deze bijwerking op het zenuwstelsel. De klinische symptomen ervan zijn tactiele allodynie, tintelingen in vingers en tenen en pijn in de bovenste en onderste ledematen welke al ontstaan bij een lage dosis van 50 mg/kg/dag. Thermische hypoalgesie, zwakte van de gezichtsspieren en distale extremiteitspieren, paralyse, hypersensitiviteit en gevoelloosheid in de extremiteiten kunnen ontstaan bij hogere dosissen van 100-500 mg/kg/dag. Deze symptomen kunnen ontstaan door een perifere of centrale zenuwstoornis. Zowel de zenuwen van de bovenste als van de onderste ledematen kunnen worden aangetast, de benen vaker dan de armen. (31, 38, 43, 44)

Er kan ook een vertraging van motorische en sensorische zenuwgeleidingssnelheid en -sterkte optreden in de surale en tibiale zenuwen. Dit werd bij 50% van de onderzochte patiënten vastgesteld. De snelheid van alle zenuwen was significant gedaald, terwijl de amplitude enkel voor de motorische antwoorden significant was gezakt. Motorische zenuwen worden meer aangetast dan de sensibele. Soms wordt een accumulatie van oxidatieve stressmarkers in de zenuwen gevonden door stijgende lipidenperoxidatie in de perifere zenuwen. Ook ataxie werd af en toe vastgesteld. Er kan een dosisafhankelijke vermindering optreden van de gemiddelde axondiameter in de perifere gemyeliniseerde zenuwen. Een langdurige hoge dosis van DCA kan leiden tot oedeem en demyelinisatie van de hersenen en het ruggenmerg. Volwassenen met '*erfelijke Mitochondriale Encephalomyopathie, LactaatAcidose en Stroke-like episoden*' (MELAS) hebben een verhoogd risico op het ontwikkelen van perifere neuropathie. (31, 38, 43, 44)

Thiamine is gekend om het risico van perifere neuropathie te verminderen bij toediening van DCA. (45) Gelijktijdige toediening van 100mg/dag oraal thiamine gaf een significante daling van de

incidentie van zwakte in de ledematen en gedragswijzigingen typisch aan DCA-toxiciteit en thiaminedeficiëntie. Omdat DCA de thiamine-afhankelijke PDHc stimuleert, wordt er gesuggereerd dat chronische DCA-toediening een thiaminedeficiëntie induceert door een verhoogde aanvraag van deze vitamine. Toch blijkt de perifere neuropathie niet afkomstig te zijn van thiaminedeficiëntie want er ontstond nog altijd perifere neuropathie ondanks thiaminesupplement. De reden van deze perifere neuropathie is onbekend. Een alternatieve uitleg is dat DCA een direct toxisch effect heeft op de perifere zenuwen. Een andere hypothese is dat via de reactivatie van de oxidatieve fosforylatie er veel ROS ontstaat zoals superoxide. Deze vrije radicalen zouden de schade aan de zenuwen veroorzaken. Perifere neuropathie blijkt een gewoonlijke nevenwerking gedurende chronische DCA-behandeling, zelfs met de gelijktijdige toediening van oraal thiamine. Zenuwgeleiding zou moeten gevolgd worden gedurende DCA-behandeling. (43, 45)

Een mogelijke verklaring voor de hepatische en neurologische toxiciteit van DCA is gebonden aan de gevolgen van de biotransformatie. DCA wordt gemetaboliseerd tot glyoxylaat door het enzym '*glutathione transferase zeta 1/ maleylacetoacetaat isomerase*' (GSTz1/MAAI) dat ook een rol speelt in het fenylalanine/tyrosine-catabolische pad. DCA is ook een inhibitor van GSTz1/MAAI, wat kan resulteren in een laattijdige plasmaklaring van DCA en opstapeling van potentieel toxische tyrosine-intermediären. Genetische of DCA-geïnduceerde inhibitie van GSTz1/MAAI leidt tot de accumulatie van MAAI-substraten maleylacetone en maleylacetoacetaat. Herstel van GSTz1/MAAI-enzymactiviteit gebeurt over dagen tot maanden na het stopzetten van DCA afhankelijk van de blootstellingconcentratie. Men suggereert dat de accumulatie van MAAI-substraten met DCA-gebruik, net zoals bij de ziekte tyrosinemie type-1, leidt tot het verhoogde risico op hepatocellulaire carcinoma bij jonge kinderen. Een ander gevolg van tyrosinemie type-1 is de accumulatie van delta-aminolevulinaat, een neurotoxine die in vele perifere neuropathieën werden teruggevonden. Door de verhoogde concentraties van delta-aminolevulinaat is er een verstoring in het heam-metabolisme welke ook als mogelijke oorzaak van neurologische symptomen wordt aanzien. Bij kinderen onder chronische behandeling met DCA werden al verhoogde concentraties van maleylacetone en delta-aminolevulinaat gevonden. (38)

Leeftijd alleen is onvoldoende voor de volledige verklaring van de variabiliteit in de kinetieken en biotransformaties van DCA. Ook is er een verschil in variabiliteit tussen etnische groepen en rassen. Er zijn mensen met trage en snelle metabolisatie van DCA, gebaseerd op het GSTz1/MAAI-haplotype. De mensen welke traag DCA metaboliseren, hebben een vertraagde plasmaklaring en biotransformatie, een verhoogde excretie van het ongemetaboliseerde middel en een verhoogde accumulatie van maleylacetone en delta-aminolevulinaat. Chronische consumptie van hoge eiwitdiëten kan dit effect versterken. Er wordt gesuggereerd dat het GSTz1/MAAI-haplotype gedeeltelijk de toxicogenetieken van DCA kan voorspellen. Individuen met een aangeboren fout in het

fenylalanine/tyrosine-catabolische pad zouden bijwerkingen kunnen vertonen bij relevante dosissen van DCA. Ook mensen die vatbaar zijn voor hyperoxalurie hebben een potentieel risico. (38)

3.4.5 Orale toediening

Omdat DCA zo klein is, resulteert de orale inname in een uitstekende penetratie van de meeste weefsels waaronder ook het centraal zenuwstelsel. Wanneer DCA gegeven werd in 0,075mg/ml water was er meer tumorgroei-onderdrukking dan bij de parenterale toediening. Daarom wordt de orale toediening verkozen boven de parenterale. (9, 30)

3.4.6 Effect op specifieke kankers

3.4.6.1 Longkanker, borstkanker en glioblastoma

Door Bonnet et al. (2007) werden niet-kleincellig-longcarcinomen, glioblastoma en borstkanker bestudeerd. Het in vitro toevoegen van DCA aan de 3 kankercellijnen keerde de hyperpolarisatie van het mitochondriale membraan om naar een gewoon membraanpotentiaal waardoor apoptose bevorderd werd op een dosisafhankelijke manier. DCA-behandeling verhoogde de Ca^{2+} -concentratie in de meeste cellen. Ook dit leidde tot apoptose wat een contributie van de NFAT-Kv1.5-gemedieerde weg suggereert. DCA behandeling verhoogt '*p53 upregulated modulator of apoptosis*' (PUMA)-transcriptie in cellijnen die meer apoptose vertonen wat een bijdrage van het p53-PUMA-gemedieerde mechanisme suggereert. PUMA transloceert naar het mitochondriale membraan waar het anti-apoptotische Bcl-2-eiwitten antagoneert en cytochroom-c-vrijlating induceert wat leidt tot een verhoogde caspase-activiteit en apoptose. In vivo werden ratten met longkanker, glioblastoma en borstkanker behandeld met DCA. Er was een vermindering in tumorgroei geassocieerd met een verhoogde apoptose en verminderde proliferatie. (9)

3.4.6.2 Prostaatkanker

Anti-apoptotisch Bcl-2 is een oncogen die bij overexpressie de cellen beschermt tegen apoptose en de cel resistent maakt tegen radiotherapie. Door Cao et al. (2008) werd aangetoond dat DCA toch de apoptose in gang kan zetten bij prostaatkankercellen in vitro via de interactie met Bcl-2. Er werden cytotoxische effecten vastgesteld geassocieerd met celcyclusstop in G1 en een herstel van de apoptosefuncties. DCA verlaagde significant het mitochondriale membraanpotentiaal. Ondanks de overexpressie van Bcl-2 in deze prostaatkankercellen zou er dankzij voorafgaande behandeling met DCA een vergrote gevoeligheid zijn ontstaan voor de cytotoxische effecten van radiotherapie. Zowel prostaatcellen met en zonder overexpressie van Bcl-2 worden gesensibiliseerd door DCA voor celdood door radiatie. (37)

3.4.6.3 Endometriumkanker

Door Wong et al. (2008) wordt het gevolg van DCA op endometrische adenocarcinoomcellen in vitro getest. Dit effect is afhankelijk van de specifieke cellijnen. DCA bevordert apoptose in endometriale kankercellen via vermindering van de Ca^{2+} -concentratie in de cel en de depolarisatie van het mitochondriale membraan. Ook via stijging van de PUMA-expressie en vermindering van de survivininductie zorgt DCA voor meer apoptose en groei-inhibitie. Survivin (lid van de IAP-familie) is een inhibitor van de apoptose dat in antwoord op het verstoorde mitochondriale membraanpotentiaal van het mitochondrion naar het cytosol wordt gebracht waar het caspase-activiteit inhijbeert en bijgevolg ook apoptose en tumorprogressie bevordert. DCA is effectief in de sensibilisatie van de meeste lage en mild invasieve endometriumkankercellijnen voor apoptose via mitochondriale, NFAT-Kv1.5-gemedieerde en PUMA-gemedieerde mechanismen. (7)

3.4.6.4 Hoofd- en nekcarcinomen

Door Sun et al. (2009) werden bepaalde hoofd- en nekcarcinomen in vitro onderzocht op het effect van DCA. DCA zorgde voor een HIF-1 α -daling en inhijbeerde de tumorgroei. (46)

3.4.6.5 Pediatrische kanker

Door Heshe et al. (2010) werden 18 verschillende pediatrische kankercellijnen onderzocht op het effect van DCA. DCA was wel in staat selectief apoptose te initiëren in de pediatrische tumorcellijnen en niet in de niet-maligne cellen. Enkel bij zeer hoge concentraties van DCA werd meer apoptose teruggevonden in vitro. Er werd ook gezien dat DCA soms een invloed had op het antwoord van de kanker op chemotherapie. (40)

3.4.6.6 Cervicale kanker

Door Anderson et al. (2009) werden cervicale HeLa-kankercellen in vitro getest op de gevolgen van DCA. In normoxie werd een gereduceerde celproliferatie teruggevonden na de behandeling met DCA. Daarentegen werd onder hypoxische omstandigheden een groeivoordeel van de meeste HeLa-cellen teruggevonden. (47)

Door Xie et al. (2011) werden cervicale HeLa-kankercellen onderzocht in vitro om te zien of DCA effectief was. Er was een verschuiving van aërobe glycolyse naar glucose-oxidatie. Dit was te zien aan het verhoogde intracellulaire H_2O_2 en pH. Deze veranderingen in metabolisme leidden tot een daling van het mitochondriale membraanpotentiaal, een stijging van de apoptotische enzymen, een verminderde concentratie van intracellulair Ca^{2+} en een verhoogde Kv1.5-expressie. De combinatie van het chemotherapeuticum cisplatinum en DCA veroorzaakte een significante synergische inhibitie van de HeLa-cellen. (48)

3.4.6.7 Pancreascarcinoom

Blijkens Chen et al. (2009) waren de resultaten in de preklinische testen met DCA op knaagdieren met pancreastumoren goed. Ook werd aangetoond dat omdat DCA in staat is het zuurstofverbruik te verhogen, de tumorhypoxie gaat verhogen in pancreatische xenotransplantaten en ze gevoeliger maakt voor hypoxische cytokines. De DCA-behandeling van muizen met pancreatische xenograften veroorzaakten ook een significante tumorgroeivertraging. (35)

3.4.6.8 Colorectale kanker

Volgens het artikel van Madhok et al. (2010) zorgt DCA voor een dosisafhankelijke reductie in groei van colorectale kankercellijnen. Er was dus enkel apoptose bij heel hoge concentraties van DCA. (29)

Door Cairns et al. (2007 en 2009) werden de gevolgen van DCA op colorectale kanker getest in vivo. Er was weinig effect op de groei maar DCA verhoogde wel de tumorhypoxie wat de tumor gevoeliger maakt voor hypoxische cytokines. (49, 50)

Het artikel van Sánchez-Aragó et al. (2010) vermeldt de resultaten van DCA op colorectale kankercellen in vivo. Er was een significante inhibitie van de tumorgroei op de xenograften. De tumorregressie is het gevolg van de celcyclusstop veroorzaakt door de herstelde mitochondriale functie. (18)

Door Shahrzad et al. (2010) werden colorectale kankercellen zowel in hypoxie als in normoxie getest op de effecten van DCA. Angiogenese is een fundamentele stap in de tumororganisatie en -groei. In vaste tumoren zijn deze bloedvaten functioneel en structureel abnormaal omdat ze tijdelijk of chronisch blootgesteld zijn geweest aan ischemie en reperfusie leidend tot hypoxie/anoxie, fluctuaties in nutriëntenconcentraties, acidose, pH-verstoring en toxische hoeveelheden ROS. Er wordt verondersteld dat er een verschillend effect is van DCA op colorectale kankercellen in normoxie versus hypoxie. In hypoxische omstandigheden toonden de meeste colorectale kankercellen een verhoogde overleving in de aanwezigheid van DCA. Waarschijnlijk komt dit door HIF-1 α . Daarentegen toonde de behandeling van deze cellen met DCA aan dat er in normoxie wel apoptose optreedt. DCA geeft dus een cytoprotectief effect voor de kankercellen in hypoxie. (34)

De caspase-3-expressie in hypoxische cellen was verlaagd door DCA-blootstelling. DCA leidt tot verminderde HIF-1 α -concentratie onder hypoxische omstandigheden maar niet onder normoxie. Dit zou kunnen leiden tot verminderde PDK-productie, verhoogde PDH-activiteit en een verschuiving naar glucose-oxidatie. Daarentegen induceert HIF-1 α ook de synthese van pro-apoptotische proteïnen dus de reductie van HIF-1 α kan paradoxaal leiden tot verhoogde tumoroverleving. (34)

Volgens het artikel van Stockwin et al. (2010) toonde DCA in vitro een celgroei-inhibitie zonder apoptose-inductie. De 'in vivo'-experimenten op colorectaal-, borst-, long- en pancreaskanker toonden aan dat DCA vooral actief was tegen cellen met een deficiënte elektronentransportketen. (30)

3.4.6.9 Borstkanker en longmetastasen

Bij ratten met borstadenocarcinomen was er een reductie in het aantal macroscopische longmetastasen na een hoge dosis DCA-therapie. Deze reductie in celgroei werd blijkens het artikel van Sun et al. (2010) vastgesteld in vivo. (31)

Bij de behandeling van DCA op borstadenocarcinomen van ratten werd een inhibitie van proliferatie gevonden maar geen verhoogde celdood. Dit was desondanks een kleine maar significante verhoging van caspases 3- en 7-activiteit, welke de kankercellen gevoeliger kunnen maken voor andere apoptotische signalen. DCA heeft dus antiproliferatieve mogelijkheden in aanvulling van zijn pro-apoptotische eigenschappen. DCA is in borstadenocarcinoomcellen meer een antiproliferatief middel dan een apoptose-inducerend middel. Dit in tegenstelling tot verschillende studies waarin DCA-behandeling op endometrium-, prostaat- en longkankercellen een verhoogde apoptose gaf zonder effect op de celcyclusdistributie of samen met een proliferatievermindering. Dus voor borstkanker was er met DCA zowel een inhibitie van de xenotransplantaatgroei als van de longmetastasen. (31)

Een tekort aan apoptose in borstkankercellen kan eventueel verklaard worden door hoge concentraties van Bcl-2, survivin en PUMA. De expressie van deze overlevingsfactoren waren gereduceerd door DCA in prostaatkanker-, endometriumkanker- en longkankercellen. (31)

3.4.6.10 Glioblastoma multiforme

In het artikel van Michelakis et al. (2010) werden de eerste gegevens over de evaluatie van DCA bij de behandeling van glioblastoma multiforme op humane patiënten gerapporteerd. In die studie werd DCA gebruikt in combinatie met chirurgie, temozolomide en bestraling bij 5 patiënten met glioblastoma multiforme. Bij 4 van de 5 patiënten was er een verandering van het mitochondriale membraanpotentiaal, verhoogde hoeveelheden van gegenereerde zuurstofradicalen en verhoogde tumorcelapoptose. Zowel in vitro als in vivo werd dit aangetroffen. Ook werd er een geïnhibeerde HIF-1-signalering, geactiveerde p53 en verminderde angiogenese teruggevonden in vitro en in vivo. Deze gegevens suggereren een zeer positief effect van DCA maar uiteraard zou er een groter aantal patiënten getest moeten worden vooraleer men deze resultaten mag veralgemenen. (41)

3.4.7 Combinatie met andere middelen

In het artikel van Michelakis et al. (2008) en het artikel van Cairns et al. (2009) werd een verhoogde effectiviteit van chemotherapie en radiotherapie gesuggereerd door deze te combineren met DCA. Dit zou ook leiden tot een verminderde dosisbehoefte en bijgevolg het beperken van de toxiciteit van deze standaardtherapieën. Chemotherapie heeft immers ook negatieve gevolgen voor de normale cellen in tegenstelling tot DCA. Door de reactivatie van het mitochondrion door DCA zal het zuurstofgebruik in de kankercel verhogen. Hierdoor is er een stijgend effect van hypoxiespecifieke chemotherapieën. (8, 22)

In het artikel van Stockwin et al. (2010) wordt gesuggereerd dat DCA de activiteit van de chemotherapeutica, cisplatinum en topotecan, verhoogt indien deze gericht zijn naar de mitochondriën of het glucosemetabolisme inhiberen. Ook stelt men voor DCA te combineren met producten die de elektronentransportketendeficiëntie bevorderen omdat DCA een verhoogde gevoeligheid heeft voor cellen met een deficiënte elektronentransportketen. (30)

In het artikel van Heshe et al. (2010) suggereert men dat DCA de cytotoxiciteit van cisplatinum en doxorubicin verlaagt. DCA heeft daarentegen geen invloed op temozolomide. DCA onderdrukt caspase 3- en 7-activiteit ontstaan door cisplatinum en doxorubicin. In het artikel van Dhar et al. (2009) en in het artikel van Heshe et al. (2010) stelt men ook een nieuw middel, mitaplatin, voor. Dit is de combinatie van cisplatinum met DCA. De cytotoxiciteit van mitaplatin is lager dan die van cisplatinum alleen. (40, 51)

Oncolytische adenovirussen zoals ONYX-015 en ZD55-IL-24 vallen selectief de kankercellen aan en sparen de normale cellen. In het artikel van Xiao et al. (2010) bekijkt men de combinatie van deze virussen met DCA. Dit leidt tot een verhoging van de cytochroom-c-expressie maar er was geen verschil in de hoeveelheid Bcl-2. Beiden konden de translocatie van het Bax-eiwit van het cytoplasma naar de mitochondriën induceren om de vrijlating van cytochroom c te bevorderen en te resulteren in apoptose. Met DCA daalt de survivinhoeveelheid, met het adenovirus stijgt de survivintranscriptie. In vitro kan DCA de antitumorale effecten van ONYX-015 en ZD55-IL-24 versterken met een verhoogde apoptose tot gevolg. (42)

In het artikel van Papandreou et al. (2011) werden Akt-inhibitoren en een nieuwe generatie mTOR-inhibitoren als goede kandidaten beschouwd voor de combinatietherapie met DCA om zowel het aërobe en het hypoxische metabolisme te wijzigen. (16)

In het artikel van Fouque et al. (2003) wordt er een potentieel positief effect gesuggereerd van een chronische DCA-behandeling als adjuvans bij een ketogeen dieet en een vitaminebehandeling bij patiënten met een PDHc-deficiëntie en een DCA-gevoelige mutatie. Dit wil zeggen een puntmutatie in het E1 α -gen. (12)

4 Discussie

4.1 Behandeling kanker

De meest gebruikte behandelingen tegen kanker zijn chirurgie, radiotherapie en chemotherapie. Ondanks het feit dat chemotherapeutica zoals cisplatina wereldwijd worden gebruikt voor de bestrijding van maligne tumoren, zijn de ernstige bijwerkingen en de medicatieresistentie niet te onderschatten hindernissen in de kliniek. (42)

In 1931 kreeg Otto Warburg de Nobelprijs voor de ontdekking van het Warbureffect. Hij ontdekte dat in tegenstelling tot gezonde cellen die hun energie halen uit de oxidatieve fosforylatie in de mitochondriën, kankercellen energie produceren door middel van glycolyse en dit zelfs in aërobe omstandigheden. Een doorslaggevende ontdekking was dat kankercellen overschakelen op glycolyse door PDK te activeren. Hierdoor wordt het PDHc en bijgevolg ook de mitochondriën geïnactiveerd. Door de onderdrukking van de mitochondriën ontstaat er apoptoseresistentie. Daarenboven zal de kankercel meer glucose opnemen om de minder efficiënte glycolyse te compenseren. Deze glucose zal zorgen voor celvermeerdering en tumorgroei.

Het Warbureffect werd verwaarloosd totdat in 2007 onderzoeken met DCA aantoonde dat DCA de veranderde energieproductie kon ongedaan maken door PDK te inhiberen. Sindsdien wordt meer en meer gezocht naar nieuwe therapeutische middelen die dit unieke glycolysemetabolisme kunnen onderdrukken. Het herstel van de mitochondriale functie is het nieuwe doel geworden in de behandeling van kanker. DCA is één van de kandidaten die zich richt op de reactivatie van de mitochondriën.

4.2 Dichlooracetaat

4.2.1 Werking

De abnormale energievoorziening kan door DCA gecorrigeerd worden omdat DCA het PDK-1 inhibeert en bijgevolg de PDHc-activiteit herstelt. De verschuiving naar oxidatieve fosforylatie zorgt voor een vermindering van het mitochondriale membraanpotentiaal en een grote ROS-productie. Deze laatste zorgt voor de opening van de MTP-kanalen. Dit laat cytochroom c en AIF toe te transfereren naar het cytoplasma waar ze de caspasen zullen activeren. De caspasen induceren apoptose van de kankercellen. ROS zorgt ook voor de opening van de Kv1.5 K⁺-kanalen in het plasmamembraan. Dit hyperpolariseert de cel en vermindert de intracellulaire Ca²⁺-concentratie leidend tot een daling van de tonische inhibtie op de caspasen. DCA verhoogt dus het aantal actieve mitochondriën. Hierdoor zou DCA de tumorgroei kunnen afremmen en de apoptose van de kankercellen kunnen induceren.

4.2.2 Alle tumoren vatbaar?

Vaak vindt men bij kanker apoptoseresistentie, een glycolytisch fenotype en gehyperpolariseerde mitochondriën terug. In een vaste tumor is de glucose-opname bovendien ook verhoogd. Dit suggereert dat DCA in vele tumoren waaronder de niet-kleincellige longcarcinomen, de borstcarcinomen, de glioblastomas, de endometrische carcinomen en de prostaatcarcinomen doeltreffend zou kunnen zijn. (8)

Bepaalde kankers hebben evenwel weinig gehyperpolariseerde mitochondriën. Dit is het geval bij lymfomen, neuroblasten en sarcomen. Bij deze kankers wordt gesuggereerd dat DCA niet effectief zou zijn vermits DCA zich richt op inactieve mitochondriën. (8) DCA zou dus enkel effectief zijn bij vaste tumoren.

4.2.3 Specifieke kankers

4.2.3.1 In vitro studies

Longkankercellen, glioblastomacellen en borstkankercellen toonden meer apoptose bij toevoeging van DCA. (9) In prostaatkankercellen was er een groei-inhibitie door DCA en werden de cellen radiogevoeliger. (37) Ook in de endometriale kankercellen en de hoofd- en nekkankercellen was er een groei-inhibitie. (7, 46) Bij de pediatrie kankercellen was er enkel apoptose bij zeer hoge concentraties. DCA heeft ook soms een invloed op het chemotherapieantwoord van de kankercellen. (40) In de studies op cervicale kanker met DCA werd een groeivoordeel gezien in zuurstofarme omstandigheden. (47) In normale omstandigheden was er inductie van apoptose. (48) Bij colorectale kanker induceerde DCA apoptose bij heel hoge concentraties. (29)

4.2.3.2 In vivo studies

Longkanker-, glioblastoma-, borstkanker- en pancreaskankerxenotransplantaten toonden een groei-inhibitie na behandeling met DCA. Ook was er een vermindering van het aantal longmetastasen. (9, 31, 35)

De colorectale kankerxenograften toonden weinig effect op de groei maar maakten de kankers wel gevoeliger voor hypoxische cytokines. (49, 50) Volgens een andere studie op colorectalkanker was er wel een groei-inhibitie. (18) Een studie toonde zelfs aan dat DCA de groei bevorderde van colorectale kanker in hypoxische omstandigheden. (34)

Een studie op colorectale kanker, borstkanker, longkanker en pancreaskanker toonde aan dat DCA vooral actief is tegen cellen met een defecte elektronentransportketen. (30)

4.2.3.3 Menselijke patiëntenstudies

De enige studie op menselijke patiënten toonde aan dat de behandeling van glioblastoma multiforme door DCA een verhoogde apoptose, een verminderde HIF-1 α -expressie en een verhoogde p53-inductie tot gevolg had. (41)

4.2.4 Resultaten

Uit deze studies blijkt dat de meeste resultaten voor de behandeling van kanker met DCA positief zijn waarbij vooral een groei-inhibitie wordt aangetoond. Toch is er één studie in vitro en één studie in vivo, blijkens dewelke een verhoogde tumorgroei ontstond na de behandeling met DCA. Dit gebeurt blijkbaar wanneer de tumor zich in hypoxische omstandigheden bevindt. Verder onderzoek dringt zich dan ook op daar tumoren vaak een wisselende cellulaire omgeving hebben met regio's van hypoxie en normoxie.

Volgens sommige studies induceerde DCA enkel apoptose bij heel hoge dosissen (>25mM/48u). Blijkens de ene studie induceerde DCA zowel groeisuppressie als apoptose maar blijkens anderen enkel groeisuppressie zonder apoptose. Ook was er een onderzoek waarbij DCA enkel actief werd bevonden op cellen met defecten in de elektronentransportketen.

In het artikel van Stockwin et al. (2010) wordt aangetoond dat DCA niet selectief is omdat het een gelijkaardige activiteit vertoont op normale cellen. Er is namelijk celgroeionderdrukking maar geen apoptose-inductie. Daarentegen toonde DCA een verhoogde activiteit tegen cellen met mitochondriale defecten zoals een verstoorde elektronentransportketen. Daarom suggereerde men dat een klinische evaluatie van DCA nuttig zou zijn bij een selectieve patiëntenpopulatie of gecombineerd met andere middelen. (30)

In hun artikel beweren Sun et al. (2010) dat de stijging in caspase-activiteit onvoldoende is voor de inductie van apoptose. Er zouden wel aanwijzingen zijn dat DCA de kankercellen gevoeliger maakt voor apoptotische signalen zoals hypoxie, radiatie of andere chemotherapeutische middelen. (31)

4.2.5 Toxicologie

DCA is gekend bij milieuwetenschappers als een product dat in gechloreerd water teruggevonden wordt en als metaboliet van industriële oplossingsmiddelen. Zij gaan ervan uit dat DCA potentieel gevaarlijk voor de mens. Door klinische onderzoekers wordt DCA daarentegen bestudeerd voor potentieel therapeutisch gebruik in een aantal levensbedreigende aandoeningen zoals genetische mitochondriale ziekten, pulmonaire arteriële hypertensie en kanker. Zo wordt DCA controversieel beschouwd als oorzaak van kanker en als mogelijke behandeling ervan. De menselijke bevolking wordt door haar omgeving al generaties blootgesteld aan DCA, vooral via het drinken van

gechlorineerd water. DCA wordt ook beschouwd als metabooliet van 'trichloorethyleen' (TCE). Blootstelling aan TCE en zijn oxidatieve metaboolieten leidt tot toxiciteit van de nier, lever, zenuwstelsel, immuunstelsel en reproductieve systemen. In welke mate een blootstelling aan DCA daadwerkelijk een risico voor de mens inhoudt is evenwel onbekend. Hepatotoxiciteit in knaagdieren door DCA werd alleen verkregen bij dosissen duizenden maal groter dan de dosis DCA-blootstelling in het milieu. Er wordt gesuggereerd dat DCA-blootstelling door het milieu geen gevaar betekent voor de mens. (38)

De veiligheid en doeltreffendheid van DCA werd al geëvalueerd in gevallen van congenitale en verworven lactaatacidose en toont relatief weinig toxiciteit. De therapeutische dosis van DCA ligt tussen de 20 en 50 mM per dag. De dosis waarbij bijwerkingen zouden optreden verschilt naargelang de studies. Deze dosis varieert van 25mg/kg/dag tot 100mg/kg/dag. De voornaamste en meest voorkomende bijwerking is een reversibele perifere neuropathie die zou worden veroorzaakt bij continue DCA-blootstelling. Er is een hogere incidentie van perifere neuropathie bij mannen, bij ouderen, bij patiënten met diabetes mellitus of MELAS en bij het gelijktijdig toedienen van neurotoxische chemotherapie.

Ondanks dat DCA relatief weinig toxiciteit vertoont is het gebruik dosisgelimiteerd en moet langetermijngebruik vermeden worden. Zenuwgeleiding zou moeten opgevolgd worden gedurende de DCA-behandeling.

4.3 Blik op de toekomst

4.3.1 Combinatie van DCA met andere middelen

Er wordt een verhoogde doeltreffendheid gesuggereerd van radiotherapie en chemotherapeutica zoals cisplatinum en topotecan bij combinatie met DCA. Dit zou ook leiden tot een verminderde dosisbehoefte en bijgevolg tot een beperking van de toxiciteit van deze standaardtherapieën. (8, 22, 30) Bovendien wordt een nieuw middel 'mitaplatin' geïntroduceerd. Dit is een combinatie van cisplatinum met DCA. De cytotoxiciteit van mitaplatin is lager dan die van cisplatinum. (40, 51)

Er werd aangetoond dat DCA de antitumorale effecten van de adenovirussen ONYX-015 en ZD55-IL-24 kan versterken met een verhoogde apoptose tot gevolg. (42) Ook Akt-inhibitoren en de nieuwe generatie mTOR-inhibitoren worden als goede kandidaten beschouwd voor een combinatietherapie met DCA teneinde zowel het aërobe als het hypoxische metabolisme te wijzigen. (16)

4.3.2 Alternatieve medicatie

Genetische studies op xenografttumoren tonen aan dat PDK-inhibitie een goede manier is voor therapeutische targeting. Naast DCA zouden andere PDK-inhibitoren kunnen gezocht worden. (5)

Een voorbeeld van een andere strategie voor PDK-inhibitie is siRNA. Deze inhibeert LDH waardoor pyruvaat niet meer wordt omgezet in lactaat. Dit stimuleert het transport van pyruvaat naar de mitochondriën. Dit leidt tot PDK-2-inhibitie. siRNA bootst de werking van DCA na. Het toevoegen van DCA aan de siRNA-behandelde cellen gaf geen bijkomend effect. (9)

Vermits kankercellen veel energie opeisen, zouden middelen die zowel de glycolyse als de oxidatieve fosforylatie onderdrukken, leiden tot een excessieve vermindering in ATP-productie. Hierdoor worden de kankercellen gevoelig aan celdood. Lonidamine en 2-deoxyglucose zijn voorbeelden van potentiële inhibitoren van de glycolyse en oxidatie. (20)

Kankercellen worden gevoelig gemaakt voor apoptose door ROS. Resveratrol, LY30 en 2-methoxyestradiol zijn producten die zorgen voor ROS-productie. Ze inhiberen het superoxide dismutase, een essentieel enzym dat de zuurstofradicalen verwijdert, waardoor er een O_2^- -accumulatie ontstaat. Dit leidt tot een verhoogde ROS-productie waardoor apoptose wordt geïnduceerd. (20)

Antitumoreffecten werden ook aangetoond in PK11195 die het mitochondriale membraanpotentiaal doet dalen en zorgt voor de vrijstelling van cytochroom c. (20)

De Bcl-2-familie heeft een kritische rol in de regeling van het evenwicht tussen celoverleving en -dood. Om overwegend celdood te veroorzaken in de kankercellen zouden de anti-apoptotische Bcl-2-factoren onderdrukt moeten worden of de pro-apoptotische Bcl-2-eiwitten gepromoot. HA14-1 is een inhibitor van de anti-apoptotische Bcl-2-enzymen en zorgt dat de kankercellen chemotherapie- en radiotherapieresistentie overwinnen. ABT-737 bootst het pro-apoptotische Bcl-2-enzym Bad na. Hierdoor worden de anti-apoptotische Bcl-2-enzymen geïnhibeerd. Er is een efficiënte apoptose-inductie in de aanwezigheid van Bax en Bak. ABT-737 sensibiliseert de kankercellen tot apoptose geïnduceerd door chemotherapeutica. (20)

4.4 Besluit

De ontdekking van mitochondriën als nieuw doelwit voor het herstel van de apoptosefunctie in kankercellen is een heel aantrekkelijk concept in de antikankertherapie. Deze apoptoseweg is vaak verstoord in de kankercellen hetgeen soms ook leidt tot chemotherapieresistentie. Men kan via tal van wegen de mitochondriën reactiveren. DCA richt zich op de mitochondriën door het unieke metabolisme gevonden in vaste tumoren te corrigeren. (20)

Het voordeel van DCA is dat het goedkoop is en al jaren gebruikt werd voor de behandeling van mitochondriale ziekten. DCA is ook aantrekkelijk door zijn selectiviteit, daar vooral de tumorcellen worden aangevallen en niet de normale cellen. Perifere neuropathie is een veel voorkomende bijwerking van DCA maar is reversibel. Een analyse van de gepubliceerde rapporten over de effecten

van DCA wijst op soms tegenstrijdige uitkomsten. De meeste onderzoeken geven positieve resultaten aan maar vermits er weliswaar zeldzaam een negatief effect wordt bekomen, komt verder onderzoek onontbeerlijk voor. Bovendien is er een groot aantal kankersoorten en is er nog maar één klinische trial geweest op echte kankerpatiënten. Ook al waren de resultaten van dat ene onderzoek hoopgevend is dit uiteraard onvoldoende om algemene conclusies te trekken over de doeltreffendheid en veiligheid van DCA in de behandeling van kanker. Analyses van deze antikankertherapie zullen een verdere experimentele aanpak vereisen, zowel in vitro als in vivo. Hiervoor heeft men industriële steun nodig. Jammergenoeg is het financieel niet aantrekkelijk voor farmaceutische bedrijven om onderzoeken te laten uitvoeren op DCA voor de behandeling van kanker. Op DCA, dat een generisch middel is, kan immers geen patent worden verkregen. (8)

Besluitend kan gesteld worden dat DCA veelbelovend is maar dat meer onderzoek is vereist. DCA zou potentieel ook synergisch kunnen werken met andere reeds bestaande behandelingen zoals chemotherapeutica.

Nog verschillende andere kleine moleculen zijn ontworpen om pro-apoptotische enzymen te activeren en anti-apoptotische eiwitten te blokkeren. Deze moleculen zijn momenteel nog onder klinische evaluatie. De resultaten van de klinische trials zullen bepalen of deze nieuwe strategieën voor een verbetering in de behandeling van kanker zullen zorgen. Het onderzoek op alternatieve middelen, die zich via andere wegen dan die van DCA op de mitochondriën richten, zou eventueel wel gefinancierd kunnen worden door farmaceutische of biotech bedrijven.

Als besluit kan gesteld worden dat mitochondriën in de nabije toekomst interessante doelen zullen worden voor de ontwikkeling van nieuwe en hopelijk succesvolle kankertherapieën.

Referenties

1. Matthys D. Maligne aandoeningen: uit CURSUS PEDIATRIE EN ADOLESCENTIE. Universiteit Gent, 2010; 86-89
2. Pinkhof Geneeskundig woordenboek. 11 ed. Houten: Bohn Stafleu van Loghum; 2006.
3. Weinberg RA. The biology of cancer. New York: Garland Science; 2007.
4. Kanker. Online 2011. opgehaald op 15 februari 2011, van <http://nl.wikipedia.org/wiki/Kanker>.
5. McFate T, Mohyeldin A, Lu H, Thakar J, Henriques J, Halim ND, et al. Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. J Biol Chem. 2008 Aug 15;283(33):22700-8.
6. Singh KK, Kulawiec M. Mitochondrial DNA polymorphism and risk of cancer. Methods Mol Biol. 2009;471:291-303.
7. Wong JY, Huggins GS, Debidda M, Munshi NC, De Vivo I. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. Gynecol Oncol. 2008 Jun;109(3):394-402.
8. Michelakis ED, Webster L, Mackey JR. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. Br J Cancer. 2008 Oct 7;99(7):989-94.
9. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. Cancer Cell. 2007 Jan;11(1):37-51.
10. Lodish HF. Molecular cell biology. 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2003.
11. De glycolyse. opgehaald op 13 februari 2011, van <http://www.biocarta.com/pathfiles/glycolysispathway.asp>.
12. Fouque F, Brivet M, Boutron A, Vequaud C, Marsac C, Zabot MT, et al. Differential effect of DCA treatment on the pyruvate dehydrogenase complex in patients with severe PDHC deficiency. Pediatr Res. 2003 May;53(5):793-9.
13. The Pyruvate Dehydrogenase Complex Playbook. opgehaald op 10 december 2009, van <http://www.mitosciences.com/playbooks.html>.
14. Petr Hajek PD. Pyruvate Dehydrogenase Regulation. From Cancer to Diabetes, and Beyond. MitoNews. 2009; 5(5): Available from: http://www.mitosciences.com/mitonews_05_05.html.
15. Pyruvate Dehydrogenase. Online 2010. opgehaald op 10 april 2010, van http://en.wikipedia.org/wiki/Pyruvate_dehydrogenase.
16. Papandreou I, Goliasova T, Denko NC. Anticancer drugs that target metabolism: Is dichloroacetate the new paradigm? Int J Cancer. 2011 Mar 1;128(5):1001-8.
17. De oxidatieve fosforylatie. opgehaald op 10 februari 2011, van <http://home.kpn.nl/b1beukema/mitochondrien.html>.
18. Sanchez-Arago M, Chamorro M, Cuezva JM. Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. Carcinogenesis. 2010 Apr;31(4):567-76.

19. Apoptosis. Online 2010. opgehaald op 5 december 2010, van <http://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>.
20. Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Mar 29.
21. Bellance N, Lestienne P, Rossignol R. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Front Biosci*. 2009;14:4015-34.
22. Kasibhatla S, Tseng B. Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol Cancer Ther*. 2003 Jun;2(6):573-80.
23. Lifetime risk of developing or dying from cancer. Online 2010. opgehaald op 5 april 2011, van <http://www.cancer.org/Cancer/CancerBasics/lifetime-probability-of-developing-or-dying-from-cancer>.
24. 10 facts about cancer. opgehaald op 5 april 2011, van <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/en/index.html>.
25. Feiten en cijfers over kanker. Online 2010. opgehaald op 5 april 2011, van <http://www.wcrf-nl.org/onderzoek/feitenencijfers.php>.
26. Feichtinger RG, Zimmermann FA, Mayr JA, Neureiter D, Ratschek M, Jones N, et al. Alterations of respiratory chain complexes in sporadic pheochromocytoma. *Front Biosci* 2011;3:194-200.
27. Zimmermann FA, Mayr JA, Feichtinger R, Neureiter D, Lechner R, Koegler C, et al. Respiratory chain complex I is a mitochondrial tumor suppressor of oncogenic tumors. *Front Biosci* 2011;3:315-25.
28. Feichtinger RG, Neureiter D, Mayr JA, Zimmermann FA, Berthold F, Jones N, et al. Loss of mitochondria in ganglioneuromas. *Front Biosci* 2011;3:179-86.
29. Madhok BM, Yeluri S, Perry SL, Hughes TA, Jayne DG. Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *Br J Cancer*. 2010 Jun 8;102(12):1746-52.
30. Stockwin LH, Yu SX, Borgel S, Hancock C, Wolfe TL, Phillips LR, et al. Sodium dichloroacetate selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC. *Int J Cancer*. 2010 Dec 1;127(11):2510-9.
31. Sun RC, Fadia M, Dahlstrom JE, Parish CR, Board PG, Blackburn AC. Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Feb;120(1):253-60.
32. McCarty MF, Barroso-Aranda J, Contreras F. Practical strategies for suppressing hypoxia-inducible factor activity in cancer therapy. *Med Hypotheses*. 2010 May;74(5):789-97.
33. Bellance N, Benard G, Furt F, Begueret H, Smolkova K, Passerieux E, et al. Bioenergetics of lung tumors: alteration of mitochondrial biogenesis and respiratory capacity. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Dec;41(12):2566-77.
34. Shahrzad S, Lacombe K, Adamcic U, Minhas K, Coomber BL. Sodium dichloroacetate (DCA) reduces apoptosis in colorectal tumor hypoxia. *Cancer Lett*. 2010 Nov 1;297(1):75-83.

35. Chen Y, Cairns R, Papandreou I, Koong A, Denko NC. Oxygen consumption can regulate the growth of tumors, a new perspective on the Warburg effect. *PLoS One*. 2009;4(9):e7033.
36. Dichlooracetaat. opgehaald op 7 november 2010, van <http://www.dca.med.ualberta.ca/home>.
37. Cao W, Yacoub S, Shiverick KT, Namiki K, Sakai Y, Porvasnik S, et al. Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. *Prostate. [In Vitro]*. 2008 Aug 1;68(11):1223-31.
38. Stacpoole PW. The dichloroacetate dilemma: environmental hazard versus therapeutic goldmine-both or neither? *Environ Health Perspect*. 2011 Feb;119(2):155-8.
39. Boja ES, Phillips D, French SA, Harris RA, Balaban RS. Quantitative mitochondrial phosphoproteomics using iTRAQ on an LTQ-Orbitrap with high energy collision dissociation. *J Proteome Res*. 2009 Oct;8(10):4665-75.
40. Heshe D, Hoogestraat S, Brauckmann C, Karst U, Boos J, Lanvers-Kaminsky C. Dichloroacetate metabolically targeted therapy defeats cytotoxicity of standard anticancer drugs. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011 Mar;67(3):647-55.
41. Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, Webster L, Haromy A, Niven E, et al. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med*. 2010 May 12;2(31):31ra4.
42. Xiao L, Li X, Niu N, Qian J, Xie G, Wang Y. Dichloroacetate (DCA) enhances tumor cell death in combination with oncolytic adenovirus armed with MDA-7/IL-24. *Mol Cell Biochem*. 2010 Jul;340(1-2):31-40.
43. Spruijt L, Naviaux RK, McGowan KA, Nyhan WL, Sheean G, Haas RH, et al. Nerve conduction changes in patients with mitochondrial diseases treated with dichloroacetate. *Muscle Nerve*. 2001 Jul;24(7):916-24.
44. Calcutt NA, Lopez VL, Bautista AD, Mizisin LM, Torres BR, Shroads AL, et al. Peripheral neuropathy in rats exposed to dichloroacetate. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009 Sep;68(9):985-93.
45. Kerr DS. Treatment of mitochondrial electron transport chain disorders: a review of clinical trials over the past decade. *Mol Genet Metab*. 2010 Mar;99(3):246-55.
46. Sun W, Zhou S, Chang SS, McFate T, Verma A, Califano JA. Mitochondrial mutations contribute to HIF1alpha accumulation via increased reactive oxygen species and up-regulated pyruvate dehydrogenase kinase 2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009 Jan 15;15(2):476-84.
47. Anderson KM, Jajeh J, Guinan P, Rubenstein M. In vitro effects of dichloroacetate and CO2 on hypoxic HeLa cells. *Anticancer Res*. 2009 Nov;29(11):4579-88.
48. Xie J, Wang BS, Yu DH, Lu Q, Ma J, Qi H, et al. Dichloroacetate shifts the metabolism from glycolysis to glucose oxidation and exhibits synergistic growth inhibition with cisplatin in HeLa cells. *Int J Oncol*. 2011 Feb;38(2):409-17.
49. Cairns RA, Bennewith KL, Graves EE, Giaccia AJ, Chang DT, Denko NC. Pharmacologically increased tumor hypoxia can be measured by 18F-Fluoroazomycin arabinoside positron emission tomography and enhances tumor response to hypoxic cytotoxin PR-104. *Clin Cancer Res*. 2009 Dec 1;15(23):7170-4.

50. Cairns RA, Papandreou I, Sutphin PD, Denko NC. Metabolic targeting of hypoxia and HIF1 in solid tumors can enhance cytotoxic chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 29;104(22):9445-50.
51. Dhar S, Lippard SJ. Mitaplatin, a potent fusion of cisplatin and the orphan drug dichloroacetate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Dec 29;106(52):22199-204.