



# **ΟΠΙΟΕΙΔΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΑΡΙΑ-ΕΛΕΝΗ ΚΑΜΠΑ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002**

**στην οικογένεια μου**

που πίστεψε σε μένα,  
και με στήριξε όλα αυτά τα χρόνια...

Για την ολοκλήρωση της παρούσης διατριβής συνέβαλε είτε άμεσα είτε έμμεσα και ένα σύνολο ανθρώπων, καθηγητές, συνεργάτες και φίλοι, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διατριβής μου, Καθηγητή Εργαστηριακής Ενδοκρινολογίας κ. Ηλία Καστανά χωρίς τη βοήθεια του οποίου (επιστημονική, ηθική και οικονομική), η διατριβή αυτή δεν θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής:

κον Αχιλλέα Γραβάνη Καθηγητή Φαρμακολογίας

κον Βασίλη Γεωργούλια Καθηγητή Ογκολογίας

κον Ανδρέα Μαργιωρή Καθηγητή Κλινικής Χημείας

κα Κυριακή Θερμού Αναπλ. Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

κον Ηλία Κουρούμαλη Καθηγητή Γαστρεντερολογίας

κα Αναστασία Χατζόγλου Λέκτορα Εργαστηριακής Ενδοκρινολογίας

για τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν και όσους μου συμπαραστάθηκαν όλα αυτά τα χρόνια, συνεργάτες και φίλους: Άννα Βασιλάκη, Ρένα Δερμιτζάκη, Γιάννα Καλλέργη, Γιώργο Βρέντζο, Ρένα Βλαχάκη, Γιώργο Νότα, Αλίκη Σταθοπούλου, Σταθούλα Μπακογεώργου, Αθηνά Δαμιανάκη, Κλαυδία Γεμετζή, Λίτσα Παπακωνσταντή, Μαρία Βενυχάκη, Μαρία Νινιράκη, Χρυσάνθη Χρόνη, Νίκη Μαστροδήμου, Δέσποινα Παπασάββα, Στέλλα Γιακουμάκη, Κωνσταντίνα Νταμπάκη, Στέλλα Αποστολάκη, Χρύσα Μαυρουδή, Περράκη Μαρία, Γεωργία Σαλούστρου και τον Λέκτορα Κλινικής Χημείας κο Χρήστο Τσατσάνη.

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο **ΚΑΜΠΑ** Μαρία Ελένη  
Ημερομηνία Γέννησης 25 Μαρτίου 1972  
Τόπος Γέννησης Βόλος  
Εθνικότητα Ελληνική  
Διεύθυνση κατοικίας: Εθνικής Αντιστάσεως 13, 71306, Ηράκλειο Κρήτης  
Τηλ.0810 326538  
Διεύθυνση εργασίας: Εργαστήριο Εργαστηριακής Ενδοκρινολογίας, Τομέας  
Εργαστηριακής Ιατρικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο  
Κρήτης, 71110, Ηράκλειο Κρήτης  
Τηλ.0810 394586  
e-mail: kampa@med.uoc.gr

### **ΣΠΟΥΔΕΣ**

**1994** Πτυχίο Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Sunderland,  
Μεγάλη Βρετανία.

### **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

Αγγλικά  
Γαλλικά

### **ΠΑΡΟΥΣΑ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ**

**1995-σήμερα** Υποψήφια Διδάκτορας, Εργαστήριο Εργαστηριακής  
Ενδοκρινολογίας, Τομέας Εργαστηριακής Ιατρικής, Ιατρική  
Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης  
Θέμα: «*Οπιοειδές σύστημα και καρκίνος του προστάτη*»

### **ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

**1995-1999** Βοηθός Εργαστηρίων Εργαστηριακής Ιατρικής, Τομέας  
Εργαστηριακής Ιατρικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

### **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ**

**1992-1993** “*Comparison of Elisa and Dot Blot Hybridisation for the  
detection of a plant virus*” Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Βιοχημείας  
και Ανοσολογίας, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και  
Βιοτεχνολογίας, Ηράκλειο Κρήτης.

**1993-1994** “*Development of an ELISA assay for proteases*”, *Laboratory of  
Pharmacology, School of Health Sciences, University of  
Sunderland, U.K.*

### **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**

Kampa M., Loukas S., Hatzoglou A., Martin P., Martin P-M., Castanas E. (1996) Identification of a novel opioid peptide derived from alpha-S1 human casein (alpha-S1 casomorphin, and alpha-S1 casomorphin-amide) *Biochem. J.* 319, 903-908.

Kampa M., Bakogeorgou E., Hatzoglou A., Damianaki A., Martin P-M., Castanas E. (1997) Opioid alkaloids and casomorphin peptides decrease prostatic cancer cell line (LNCap, PC3 and DU145) proliferation through a partial interaction with opioid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 335, 255-266.

Kampa M., Margioris A.N., Hatzoglou A., Dermitzaki E., Gravanis A., Henry J-F., Oliver C., Castanas E. (1999) Kappa1 are the dominant opioid binding sites in surgical specimens of human pheochromocytomas and a human pheochromocytoma (KAT45) cell line. *Eur. J. Pharmacol.* 364, 255-262.

Kampa M., Hatzoglou A., Thermos K., Castanas E. (1999) Direct interaction of opioids with  $\alpha 1$  adrenergic receptors in the human prostate cancer cell line LNCaP. Action on cell proliferation. *HSBMB Newslet.* 46, 30-35.

Damianaki A., Bakogeorgou E., Kampa M., Notas G. Hatzoglou A., Panagiotou S., Gemetzi C., Kouroumalis E., Martin P-M., Castanas E. (2000) Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 78, 429-441.

**Kampa M., Hatzoglou A., Notas G., Damianaki A., Bakogeorgou E., Gemetzi, C., Kouroumalis E., Martin P-M., Castanas E. (2000) Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr. Cancer* 37, 105-115.**

Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Kampa M., Panagiotou S., Martin P-M., Loukas S., Castanas E. (2000) Somatostatin and Opioid Receptors in mammary tissue: Role in cancer cell growth. *Adv. Exper. Med. Biol.* 480, 55-63.

Kampa M., Notas G., Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Damianaki A., Kouroumalis E., Castanas E. (2000) Opioids inhibit Nitric Oxide Synthase in T47D human breast cancer cells. HSBMB Newsletters 47, 254-259.

Kampa M., Hatzoglou A., Notas G., Niniraki M., Kouroumalis E., Castanas E. (2001) Opioids are non-competitive inhibitors of nitric oxide synthase in T47D human breast cancer cells. Cell Death Differ. 8, 943-952

Kampa M., Loukas S., Tsapis A., Castanas E. (2001) Receptorphin: A conserved peptide derived from the sequence of the opioid receptor with opioid displacement activity and potent antiproliferative actions in tumor cells. BMC Pharmacology, 1, 9(1).

Kampa M., Fraidakis M., Farmakides G., Niniraki M., Gravanis A., Castanas E. Changes in the immune responses of peripheral lymphocytes from patients with spontaneous abortion or miscarriage. (submitted)

Kampa, M., Papakonstanti E.A., Hatzoglou A., Stathopoulos E.N., Stournaras C., Castanas E. The human prostate cancer cell line LNCaP bears function membrane testosterone receptors, which increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton. (submitted).

#### **Άρθρα Ανασκοπήσεως - Κεφάλαια σε Βιβλία**

Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Kampa M., Panagiotou S., Martin P-M., Loukas S., Castanas E. (1999) Somatostatin and Opioid Receptors in mammary tissue: Role in cancer cell growth. Mammary Gland Biology, Raven Press, 55-63.

**Hatzoglou A., Kampa M., Castanas E. (2000) Wine antioxidants as antiproliferative agents in hormone-dependent tumors. Minutes of the meeting of the Scientific Board of the Association “Vin et Sante” (in press)**

## **Ανακοινώσεις**

Kampa M., Loukas S., Hatzoglou A., Martin P., Martin P-M., Castanas E. (1996) Identification of a novel opioid peptide derived from alpha-S1 human casein (alpha-S1 casomorphin, and alpha-S1 casomorphin-amide). 21<sup>st</sup> Meeting of the International Association for Breast Cancer Research, Paris, France.

Panagiotou S., Kampa M., Wallet F., Martin P-M., Castanas E. (1996) Modulation of estrogen receptor expression in hormone-sensitive breast cancer cell lines (MCF7 and T47D) by opioid agonists. 21<sup>st</sup> Meeting of the International Association for Breast Cancer Research, Paris, France.

Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Kampa M., Panagiotou S., Berthois Y., Martin P-M., Castanas E. (1997) Epithelial-stromal interactions in breast and prostate neoplasia. VII EuroCellPath, European School of Oncology, Μέτσοβο (Προσκεκλημένη ομιλία).

Hatzoglou A. Bakogeorgou E., Kampa M., Ouafik L'H., Thermos K., Castanas E. (1997) Interaction of opioid alkaloids and peptides with opioid receptors. 23th meeting of the French Neuroendocrine Society, Marseilles. Ann. Endocrinol.

Hatzoglou A. Bakogeorgou E., Kampa M., Ouafik L'H., Thermos K., Castanas E. (1997) Interaction of opioid alkaloids and peptides with opioid receptors. 8<sup>th</sup> meeting of the European Neuroendocrine Association, Marseille.

Hatzoglou A. Bakogeorgou E., Kampa M., Martin P-M., Castanas E. (1997) Opioid system and hormone-dependent cancer. IFR Jean Roche, Marseille, Προσκεκλημένη ομιλία.

Hatzoglou A., Mpakogeorgou E., Kampa M., Panagiotou S., Martin P-M., Loukas S., Castanas E. (1999) Somatostatin and Opioid Receptors in mammary tissue: Role in cancer cell growth. Mammary Gland Biology, Tours, France.

Kampa M., Hatzoglou A., Thermos K., Castanas E. (1999) Direct interaction of opioids with  $\alpha 1$  adrenergic receptors in the human prostate cancer cell line LNCaP.

Action on cell proliferation. 51<sup>η</sup> Συνεδρία της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας.

Hatzoglou A., Kampa M., Castanas E. (2000) Wine and olive oil polyphenols, and their antiproliferative effect on human breast and prostate cancer cells. First meeting of the scientific council of the European Institute of Wine and Health. Montpellier, France

Hatzoglou A., Kampa M., Castanas E. (2000) Wine antioxidants as antiproliferative agents in human hormone dependent tumors. 6<sup>th</sup> International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology, Heraklion.

Fraidakis M., Kampa M., Farmakides G., Niniraki M., Gravanis A., Castanas E. (2000) Immunological changes in normal and pathological fertility states. 1<sup>st</sup> International meeting of the International Society of Perinatal Obstetricians, Athens.

Kampa M., Notas G., Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Damianaki A., Kouroumalis E., Castanas E. (2000) Opioids inhibit Nitric Oxide Synthase in T47D human breast cancer cells. 52<sup>η</sup> Συνεδρίαση της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Θεσσαλονίκη

Boskou D., Nistikaki A., Kampa M., Hatzoglou A., Blekas G., Castanas E. (2001) Inhibition of human breast and prostate cancer cell lines by olive oil phenolic acids. 2<sup>nd</sup> International Conference of the Society of Free Radical Research-Africa, Ile Maurice.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ .....	
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>1</b>
<b>ΠΡΟΣΤΑΤΗΣ .....</b>	<b>2</b>
ΚΑΛΟΗΘΗΣ ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΟΥ .....	2
ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΟΥ .....	2
<u>Επιδημιολογία</u> .....	3
<u>Σταδιοποίηση</u> .....	5
<u>Διάγνωση του καρκίνου του προστάτου</u> .....	5
<u>Θεραπεία</u> .....	6
<u>Ανδρογόνα, ανδρογονικοί υποδοχείς και καρκίνος του προστάτου</u> .....	8
<i>Ανδρογόνα</i> .....	8
<i>Ανδρογονικοί υποδοχείς</i> .....	10
<i>Ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA)</i> .....	15
<b>ΟΠΙΟΕΙΔΗ .....</b>	<b>17</b>
<u>Ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια</u> .....	17
<u>Καζομορφίνες</u> .....	21
<u>Οπιοειδείς υποδοχείς</u> .....	23
<u>Σχέση οπιοειδών και καρκίνου</u> .....	28
<b>ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ .....</b>	<b>29</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>30</b>
<b>ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ .....</b>	<b>31</b>
<b>ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>32</b>
1. Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών .....	32
2. Μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων με την τεχνική του μεταβολισμού του MTT .....	34
3. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford .....	35
4. Μελέτες δέσμησης για την ανίχνευση υποδοχέων .....	36
<u>A. Ανίχνευση, ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός οπιοειδών υποδοχέων στις καρκινικές σειρές του προστάτου.</u> .....	36
<i>Μελέτη των ιδιοτήτων των οπιοειδών υποδοχέων σε ολόκληρα κύτταρα.- Μελέτες δέσμησης (κορεσμού).</i> .....	36
<i>Μελέτη των ιδιοτήτων των οπιοειδών υποδοχέων σε μεμβρανικά παρασκευάσματα κυττάρων LNCaP.- Μελέτες δέσμησης (κορεσμού).</i> .....	37
<i>Ανίχνευση τύπων και υποτύπων των οπιοειδών υποδοχέων</i> .....	39
<u>B. Μελέτες δέσμησης οπιοειδών πεπτιδίων στους οπιοειδείς υποδοχείς καρκινικών κυτταρικών σειρών του προστάτου</u> .....	42
<u>Γ. Ανίχνευση υποδοχέων σωματοστατίνης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτου.</u> .....	45
<u>Δ. Μελέτες δέσμησης οπιοειδών σε υποδοχείς σωματοστατίνης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτου.</u> .....	46
<u>Ε. Μελέτες δέσμησης οπιοειδών στους α<sub>1</sub> αδρενεργικούς υποδοχείς στα κύτταρα LNCaP</u> .....	47
<u>ΣΤ. Μέτρηση των υποδοχέων των ανδρογόνων στην καρκινική κυτταρική σειρά του προστάτου LNCaP</u> .....	49
<u>Z. Μελέτες ανίχνευσης μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων σε παρασκευάσματα των κυττάρων LNCaP</u> .....	50

5. Μέτρηση της παραγόμενης ποσότητας NO <sup>•</sup> από καρκινικά κύτταρα μετά από επίδραση με οπιοειδή .....	52
6. Μελέτη της επίδρασης των οπιοειδών στη συνθήκη της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NOS).....	53
7. Ανοσοϊστοχημεία για την ανίχνευση ανδρογονικών υποδοχέων στα κύτταρα LNCaP.....	55
8. Κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων στα κύτταρα LNCaP.....	56
9. Μικροσκοπία συνεστίασης για την ανίχνευση μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων στα κύτταρα LNCaP.....	58
10. Μέτρηση της εκκρινόμενης ποσότητας του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) από την κυτταρική σειρά LNCaP.....	59
11. Μικροσκοπία συνεστίασης για την παρατήρηση των μικροϊδίων ακτίνης στα κύτταρα LNCaP.....	59
12. Προσδιορισμός της μονομερούς (G) και της πολυμερούς (F) ακτίνης στα κύτταρα LNCaP .....	61
A. Προετοιμασία κυτταρικών εκχυλισμάτων .....	61
B. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).....	62
Γ. Μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης .....	63
Δ. Ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη.....	64
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>66</b>
<b>ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΤΑΤΗ</b> .....	<b>67</b>
<b>A. Εξωγενή Οπιοειδή</b> .....	<b>67</b>
Επίδραση οπιοειδών αγωνιστών παρουσία ή απουσία ανταγωνιστή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.....	67
Επίδραση του οπιοειδούς ανταγωνιστή, διπρενορφίνη, στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων DU-145, PC3 και LNCaP .....	71
<b>B. Καζομορφίνες</b> .....	<b>74</b>
Επίδραση των καζομορφινών στον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών DU-145, PC3 και LNCaP παρουσία ή απουσία της οπιοειδούς διπρενορφίνης.....	74
<b>Γ. Συνθετικά ανάλογα καζομορφινών</b> .....	<b>79</b>
Επίδραση αναλόγων των καζομορφινών στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων DU-145, PC3 παρουσία ή απουσία ανταγωνιστή.....	79
<b>ΣΥΝΔΕΣΗ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ</b> .....	<b>83</b>
<b>A. Δέσμευση των οπιοειδών στους οπιοειδείς υποδοχείς</b> .....	<b>83</b>
Ανίχνευση ειδικών θέσεων δέσμευσης (υποδοχέων) για τα οπιοειδή σε καρκινικά κύτταρα του προστάτου .....	83
Δέσμευση των καζομορφινών και των αναλόγων τους σε ειδικές θέσεις σύνδεσης (υποδοχείς) των οπιοειδών στα καρκινικά κύτταρα του προστάτου (DU-145) .....	85
<b>B. Επίδραση των οπιοειδών σε άλλα συστήματα μεμβρανικών υποδοχέων</b> ..	<b>89</b>
Αλληλεπίδραση με το σύστημα υποδοχέων σωματοστατίνης .....	90
Ανίχνευση υποδοχέων σωματοστατίνης στα καρκινικά κύτταρα του προστάτου (DU-145, PC3 και LNCaP).....	90
Αλληλεπίδραση οπιοειδών πεπτιδίων με υποδοχείς σωματοστατίνης .....	91
Αλληλεπίδραση με το σύστημα των αδρενεργικών υποδοχέων.....	92

<u>Επίδραση του οπιοειδούς αγωνιστή ΕΚC στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό παρουσία ανταγωνιστή των αδρενεργικών στα κύτταρα LNCaP.....</u>	92
<u>Αλληλεπίδραση οπιοειδών πεπτιδίων με αδρενεργικούς υποδοχείς .....</u>	93
<b>ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΝΕΩΝ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΟΠΙΟΕΙΔΗ ΔΡΑΣΗ.....</b>	95
<b><u>A. Ταυτοποίηση μιας νέας καζομορφίνης (<math>\alpha_{s1}</math> καζομορφίνη και το αμίδιο της).....</u></b>	95
<u>Έλεγχος της πιθανής οπιοειδούς δράσης της <math>\alpha_{s1}</math> καζομορφίνης και του αμιδίου της.....</u>	96
<u>Δέσμευση της <math>\alpha_{s1}</math> καζομορφίνης σε ειδικές θέσεις σύνδεσης (υποδοχείς) των οπιοειδών σε μεμβράνες εγκεφάλου επίμυος και στα καρκινικά κύτταρα μαστού T47D .....</u>	96
<u>Επίδραση της <math>\alpha_{s1}</math> καζομορφίνης στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων T47D .....</u>	100
<u>Μελέτη της δράσης της <math>\alpha_{s1}</math> καζομορφίνης και του αμιδίου της στις καρκινικές σειρές του προστάτου DU-145, PC3 και LNCaP.....</u>	101
<u>Δέσμευση της <math>\alpha_{s1}</math> καζομορφίνης σε ειδικές θέσεις σύνδεσης (υποδοχείς) των οπιοειδών σε καρκινικά κύτταρα προστάτου .....</u>	101
<u>Επίδραση της <math>\alpha_{s1}</math> καζομορφίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων DU-145, PC3 και LNCaP.....</u>	102
<b><u>B. Ρεσεπτορφίνη - Ένα νέο πεπτίδιο με οπιοειδή δράση.....</u></b>	105
<u>Δέσμευση της Ρεσεπτορφίνης σε υποδοχείς των οπιοειδών.....</u>	105
<u>Επίδραση της Ρεσεπτορφίνης στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων DU-145, PC3 και LNCaP .....</u>	107
<b>ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΕΩΣ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.....</b>	109
<b><u>A. Μελέτη πιθανής αλληλεπίδρασης οπιεργικού συστήματος και ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NO).....</u></b>	109
<u>Παραγωγή της NO από τα κύτταρα T47D.....</u>	110
<u>Επίδραση των οπιοειδών στη παραγωγή της NO .....</u>	110
<u>Επίδραση των οπιοειδών στη συνθάση της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου μονοξειδίου (NOS).....</u>	112
<u>Παραγωγή της NO από καρκινικά κύτταρα προστάτου .....</u>	113
<b><u>B. Μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης οπιοειδών και ανδρογόνων σε καρκινικά κύτταρα του προστάτου .....</u></b>	114
<u>Επίδραση των οπιοειδών στην επαγόμενη από τα ανδρογόνα έκκριση του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) από την ορμονοευαίσθητη καρκινική κυτταρική σειρά του προστάτου LNCaP.....</u>	114
<u>Μελέτη της πιθανής επίδρασης των οπιοειδών στους ενδοκυττάρους ανδρογονικούς υποδοχείς που φέρουν τα κύτταρα LNCaP.....</u>	115
<u>Μελέτη της πιθανής μη γενωμικής δράσης των ανδρογόνων στην καρκινική κυτταρική σειρά του προστάτου LNCaP- Πιθανός τρόπος δράσης.....</u>	116
<u>Ανίχνευση μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων στα κύτταρα LNCaP.....</u>	116
<u>Ανίχνευση θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων στην επιφάνεια των κυττάρων LNCaP με κυτταρομετρία ροής.....</u>	116
<u>Ανίχνευση θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων στην επιφάνεια των κυττάρων LNCaP με μικροσκοπία συνεστίασης .....</u>	118

<i>Ανίχνευση και μελέτη των ιδιοτήτων των θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων με πειράματα δέσμευσης σε μεμβρανικά παρασκευάσματα των κυττάρων LNCaP</i> .....	118
<i>Ανίχνευση μόνο του κλασσικού ενδοκυττάρου υποδοχέα των ανδρογόνων με ανοσοϊστοχημεία</i> .....	120
<i>Ταχεία, μη γενωμική, δράση των ανδρογόνων στην έκκριση του ειδικού προστατικού αντιγόνου από τα κύτταρα LNCaP</i> .....	121
<i>Μελέτη της ταχείας επίδρασης των ανδρογόνων στον κυτταροσκελετό των κυττάρων LNCaP</i> .....	123
<i>Επίδραση της κυτοχλασίνης στην ταχέως επαγόμενη έκκριση του ειδικού προστατικού αντιγόνου από τα ανδρογόνα, στα κύτταρα LNCaP</i> .....	123
<i>Επίδραση των ανδρογόνων στη δυναμική ισορροπία μεταξύ μονομερούς και πολυμερούς ακτίνης</i> .....	124
<i>Μορφολογική μελέτη της επίδρασης των ανδρογόνων στην οργάνωση των ινιδίων ακτίνης</i> .....	125
<b>Επίδραση των οπιοειδών, στην ταχέως επαγόμενη από τα ανδρογόνα, έκκριση του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) από κύτταρα LNCaP</b>	<b>127</b>
<b>Μελέτη της επίδρασης των οπιοειδών στις επαγόμενες από τα ανδρογόνα αλλαγές στον κυτταροσκελετό στα καρκινικά κύτταρα του προστάτου (LNCaP)</b> .....	<b>128</b>
<b>Μελέτη της πιθανής επίδρασης των οπιοειδών στις μεμβρανικές θέσεις σύνδεσης των ανδρογόνων που φέρουν τα κύτταρα LNCaP</b> .....	<b>131</b>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>133</b>
<b>Επίδραση των οπιοειδών στο ρυθμό πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων προστάτου</b> .....	<b>134</b>
<b>Προέλευση των οπιοειδών στον προστάτη</b> .....	<b>138</b>
<b>Πιθανός τρόπος δράσης των οπιοειδών</b> .....	<b>145</b>
<b>Γενικά Συμπεράσματα-Προοπτικές</b> .....	<b>155</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>157</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>161</b>
<b>BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>164</b>

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

<b>ACTH</b>	<b>Adrenocorticotropin Hormone</b> (Αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη)
<b>AJCC</b>	<b>American Joint Committee on Cancer</b>
<b>APS</b>	<b>Ammonium peroxodisulfate</b> (Υπερθειικό αμμώνιο)
<b>ARE</b>	<b>Androgen-Response Elements</b> (Ανδρογονοανταποκρινόμενα στοιχεία)
<b>ATCC</b>	<b>American Type Culture Collection</b>
<b>AUA</b>	<b>American Urological Association</b>
<b>ATP</b>	<b>Adenosine Triphosphate</b> (Τριφωσφορική αδενοσίνη)
<b>BSA</b>	<b>Bovine serum albumin Fraction V</b> (Αλβουμίνη ορού βοός)
<b>cAMP</b>	<b>Cyclic adenosine monophosphate</b> (Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη)
<b>CD4</b>	<b>Constant Domain 4</b>
<b>CD8</b>	<b>Constant Domain 8</b>
<b>CLSM</b>	<b>Confocal Laser Scanning Microscope</b>
<b>DADLE</b>	<b>(D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>) Εγκεφαλίνη</b>
<b>DAGO</b>	<b>(D-Ala<sup>2</sup>-N-Me-Phe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol) Εγκεφαλίνη</b>
<b>DAF</b>	<b>Diaminofluoroscein</b> (Διαμινοφλουορσκεΐνη)
<b>DAF-DA</b>	<b>Diaminofluoroscein diacetate</b> (Διοξεική Διαμινοφλουορσκεΐνη)
<b>DHEA</b>	<b>Dihydroepiandrosterone</b> (Διδροεπιανδροστερόνη)
<b>DHEAS</b>	<b>Dihydroepiandrosterone</b> (Θειϊκή Διδροεπιανδροστερόνη)
<b>DHT</b>	<b>Dihydrotestosterone</b> (Διδροτεστοστερόνη)
<b>DMEM</b>	<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium</b> (Θρεπτικό Υλικό)
<b>DMSO</b>	<b>Dimethyl sulfoxide</b> (Διμεθυλσουλφοξύδιο)
<b>DNA</b>	<b>Desoribonucleic acid</b> (Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ)
<b>DPDPE</b>	<b>(D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>) Εγκεφαλίνη</b>
<b>DSLET</b>	<b>(D-Ser<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>) Εγκεφαλίνη</b>
<b>DTT</b>	<b>Dithiothreitol</b> (Διθειοθρεϊτόλη)
<b>DU-145</b>	Κυτταρική σειρά προερχόμενη από μετάσταση προστατικού αδενοκαρκινώματος στον εγκέφαλο
<b>ECL</b>	<b>Enhanced Chemiluminescence</b> (Ενισχυμένη χημειοφωταύγεια)
<b>EDTA</b>	<b>Ethylenediaminetetraacetic acid</b> (Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)
<b>EGF</b>	<b>Epidermal Growth Factor</b> (Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας)
<b>EGTA</b>	<b>Ethylene glycol-bis (beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</b>
<b>EKC</b>	<b>Ethylketocyclazocine</b> (Αιθυλκετοκυκλαζοσίνη)
<b>ELISA</b>	<b>Enzyme-linked immunosorbent assay</b> (Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσοφική Μέτρηση)
<b>ERK</b>	<b>Extracellular Regulated Kinase</b> (Κινάση ρυθμιζόμενη από εξωκυτάρια ερεθίσματα)
<b>FAD</b>	<b>Flavin Adenine Dinucleotide</b> (Φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο)
<b>FBS</b>	<b>Fetal bovine serum</b> (Ορός εμβρύου βοός)

<b>FGF</b>	<b>Fibroblast Growth Factor</b> (Ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας)
<b>FITC</b>	<b>Fluorescein isothiocyanate</b> (Ισοθειοκυανιούχος φλουοροσκεΐνη)
<b>FMN</b>	<b>Flavin Mononucleotide</b> (Φλαβινομονονουκλεοτίδιο)
<b>GDP</b>	<b>Guanosine diphosphate</b> (Διφωσφορική γουανοσίνη)
<b>GF/B</b>	<b>Glass fibre filters</b> (Φίλτρα ινών υάλου)
<b>GM-CSF</b>	<b>Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor</b>
<b>GTP</b>	<b>Guanosine triphosphate</b> (Τριφωσφορική γουανοσίνη)
<b>HRP</b>	<b>Horseradish Peroxidase</b> (Υπεροξειδάση του ραπανιού)
<b>HSP</b>	<b>Heat Shock Protein</b> (Πρωτεΐνη θερμικού σοκ)
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>Inhibitory Concentration</b> (Μέση κατασταλτική συγκέντρωση)
<b>IGF</b>	<b>Insulin like growth factor</b> (Αυξητικός Παράγοντας Ινσουλίνης)
<b>IgG</b>	<b>Immunoglobulin G</b> (Ανοσοσφαιρίνη G)
<b>IL6</b>	<b>Interleukin 6</b> (Ιντερλευκίνη)
<b>kb</b>	<b>kilobases</b>
<b>Kd</b>	<b>Kilodalton</b>
<b>K<sub>D</sub></b>	<b>Dissociation constant</b> (Σταθερά διάστασης)
<b>ΚΝΣ</b>	<b>Κεντρικό Νευρικό Σύστημα</b>
<b>LHRH</b>	<b>Luteinizing Hormone –Releasing Hormone</b> (Εκλυτική Ορμόνη της Ωχρινοποιητικής Ορμόνης)
<b>LNCaP</b>	<b>Lymph Node Prostate Cancer</b> (Κυτταρική σειρά προερχόμενη από μετάσταση προστατικού αδενοκαρκινώματος στους λεμφαδένες)
<b>MAP</b>	<b>Mitogen Activated Protein</b> (Πρωτεΐνη που ενεργοποιείται από μιτογόνους παράγοντες)
<b>mRNA</b>	<b>messenger RNA</b> (Αγγελιοφόρος RNA)
<b>MSH</b>	<b>Melanin Stimulating Hormone</b> (Μελανοτροπίνη)
<b>MTT</b>	(3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Βρωμιούχο (3-(4,5-διμεθυλ θιαζολ-2-yl)-2,5-διφαινυλ τετραζόλιο)
<b>β-NADPH</b>	<b>β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</b> (Αναγμένη μορφή του φωσφορικού νικοταμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου)
<b>NGF</b>	<b>Nerve Growth Factor</b> (Νευρικός αυξητικός παράγοντας)
<b>NO</b>	<b>Nitric Oxide</b> (Ελεύθερη ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου)
<b>NOS</b>	<b>Nitric Oxide Synthase</b> (Συνθετάση της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου)
<b>ORL<sub>1</sub></b>	<b>Opioid Receptor-Like Protein 1</b>
<b>PBS</b>	<b>Phosphate Buffer Saline</b> (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών)
<b>PC3</b>	Κυτταρική σειρά προερχόμενη από μετάσταση προστατικού αδενοκαρκινώματος στο μυελό των οστών
<b>PCA</b>	<b>Polymerase Chain Acid</b> (Υπεργλωρικό οξύ)
<b>PCR</b>	<b>Polymerase Chain Reaction</b>
<b>PDGF</b>	<b>Platelet Derived Growth Factor</b>

---

<b>PEI</b>	<b>Polyethylenimine</b> (Πολυαιθυλενιμίνη)
<b>PFA</b>	<b>Paraformaldehyde</b> (Παραφορμαλδεΐδη)
<b>PMSF</b>	<b>Phenylmethylsulfonyl fluoride</b> (Φαινυλο μεθυλ σουλφονυλο φθορίδιο)
<b>POMC</b>	<b>Pro-opiomelanocortin</b> (Προ-οπιομελανοκορτίνη)
<b>PSA</b>	<b>Prostate Specific Antigen</b> (Ειδικό προστατικό Αντιγόνο)
<b>PKA</b>	<b>Protein Kinase A</b> (Πρωτεϊνική Κινάση A)
<b>RNA</b>	<b>Ribonucleic Acid</b> (Ριβονουκλεϊκό οξύ)
<b>RPMI</b>	<b>RPMI Medium 1640</b> (Θρεπτικό υλικό)
<b>SDS</b>	<b>Sodium Dodecyl Sulfate</b> (Μετά νάτριου άλας του θειϊκού δωδεκυλίου) <b>Steroid Hormone Binding Globulin</b> (Σφαιρίνη που συνδέεται με τις στεροειδείς ορμόνες)
<b>SHBG</b>	
<b>SRIF</b>	<b>Somatotropin Release Inhibitory Factor</b> (Σωματοστατίνη)
<b>Sst</b>	<b>Somatostatin Receptor</b> (Υποδοχείς σωματοστατίνης)
<b>T47D</b>	Κυτταρική σειρά προερχόμενη από καρκίνωμα μαστού
<b>TBS</b>	<b>Tris Buffered Saline</b> (Ρυθμιστικό διάλυμα Tris) <b>N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine</b> (N,N,N',N'-Τετρα-μεθυλενο αιθυλοδιαμίνη)
<b>TEMED</b>	
<b>TGF</b>	<b>Transforming Growth Factor</b> (Εξαλλακτικός αυξητικός παράγοντας)
<b>TNF</b>	<b>Tumor Necrosis Factor</b> (Ογκονεκρωτικός παράγοντας)
<b>UICC</b>	<b>Union Internationale Contre le Cancer</b>
<b>β-LPH</b>	<b>β-Lipotropin Hormone</b> (Λιποτρόπος ορμόνη)

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## ΠΡΟΣΤΑΤΗΣ

Ο προστάτης, ένας αδένας απαραίτητος για την γονιμότητα, αποτελεί ουσιαστικό μέρος του αναπαραγωγικού συστήματος του άνδρα. Εκκρίνει ένα λεπτόχροο γαλακτόχρουν υγρό, το προστατικό υγρό, το οποίο αποτελεί το 1/3 του σπέρματος και το οποίο ενισχύει τη θρέψη, την κινητικότητα και την ανθεκτικότητα των σπερματοζωαρίων ενώ παράλληλα έχει και αντιμικροβιακή δράση. Κατά την εκσπερμάτιση, μετά από σύσπαση του αδένου, το προστατικό υγρό προστίθεται στο σπέρμα.

Ανατομικά βρίσκεται κάτω από την ουροδόχο κύστη πίσω από το ηβικό οστό και μπροστά από το ορθό και περιβάλλει την ουρήθρα. Έχει σχήμα και μέγεθος καστανού. Καθόλη τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας το μέγεθος του προστάτου μένει σχετικά μικρό αλλά κατά την εφηβεία, με την επίδραση της τεστοστερόνης αρχίζει να μεγαλώνει. Σε ηλικία 20 χρόνων το μέγεθος του σχεδόν σταθεροποιείται. Η τεστοστερόνη παίζει καθοριστικό ρόλο όχι μόνο στην ανάπτυξη και στην διαφοροποίηση του προστατικού αδένου αλλά και στη διατήρηση της δομής και της λειτουργικότητας του.

Παθήσεις οι οποίες αφορούν τον προστάτη επηρεάζουν τόσο το ουροποιητικό όσο και το αναπαραγωγικό σύστημα του άνδρα. Η ηλικία παίζει σημαντικό ρόλο. Μέχρι το 50ο έτος οι περισσότερες παθήσεις που αφορούν τον προστάτη είναι απλά φλεγμονές. Μετά το 50ο έτος παρουσιάζονται παθήσεις οι οποίες είναι πιο σοβαρές και η συχνότητα εμφάνισής τους είναι ανάλογη με την ηλικία. Οι πιο συχνές είναι η καλοήγητος υπερπλασία του προστάτου που συνήθως εμφανίζεται μετά τα 50 και το προστατικό αδενοκαρκίνωμα (ή καρκίνος του προστάτου) που συνήθως εμφανίζεται μετά τα 60.

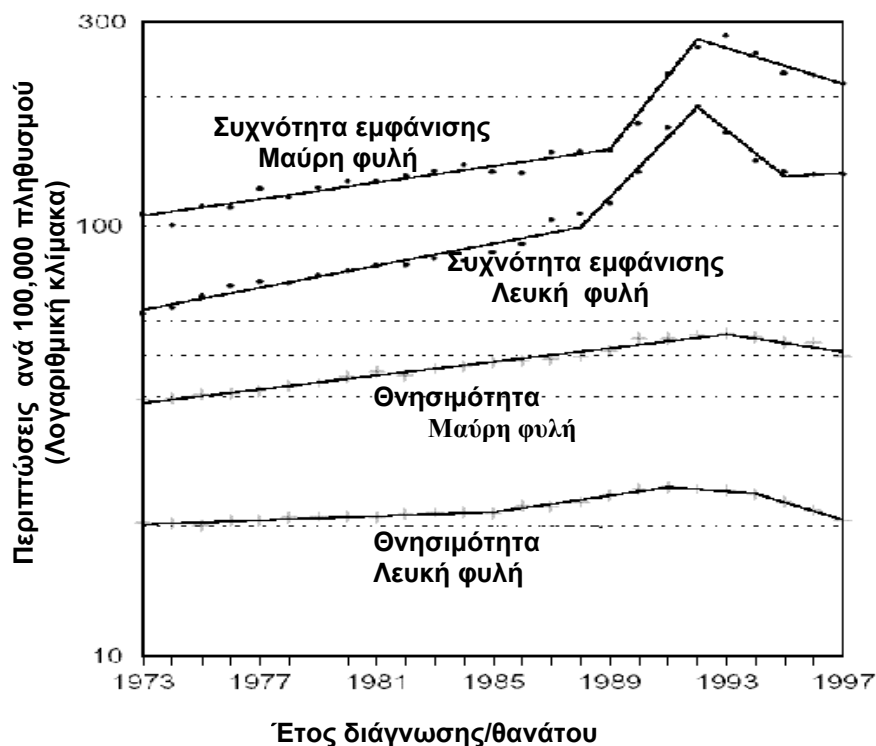
## ΚΑΛΟΗΘΗΣ ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΟΥ

Είναι η πιο συχνή μορφή πάθησης στον άνδρα. Η συχνότητα εμφάνισης αυξάνει δραματικά μετά τα 50 και φτάνει το 90 % σε ηλικία 80 ετών.

## ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΟΥ

Επιδημιολογία

Αποτελεί τον πιο συχνό καρκίνο στους άνδρες και τη δεύτερη αιτία θανάτου μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Η θνησιμότητα από καρκίνο του προστάτου σε όλο τον κόσμο ανέρχεται στις 300.000 το χρόνο, είναι συγκρίσιμη με αυτή του καρκίνου του μαστού και συνεχώς αυξάνει. Η συχνότητα εμφάνισης και η θνησιμότητα από καρκίνο του προστάτου αυξάνονται ραγδαία με την πάροδο της ηλικίας. Έχει παρατηρηθεί σταδιακή αύξηση των περιστατικών και των θανάτων με καρκίνο του προστάτου τα τελευταία 50 χρόνια, ενώ είναι πολύ πιο συχνός στις αναπτυγμένες χώρες από ότι στις αναπτυσσόμενες. Τα μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης έχουν βρεθεί στην Ευρώπη στην Βόρεια Αμερική και στην Αυστραλία. Σύμφωνα με στοιχεία τα οποία αφορούν τη 25ετία 1973-1998 (SEER Cancer Statistics Review, National Cancer Institute) (Σχήμα-1) ο αριθμός των νέων διαγνώσεων στις Ηνωμένες Πολιτείες ανέρχεται πάνω από τις 200.000 περιπτώσεις ενώ ο αριθμός των θανάτων από τη νόσο πάνω από τις 30.000. Παρατηρείται επίσης, ότι ο αριθμός των νέων περιστατικών και των θανάτων είναι αρκετά υψηλότερος στους άνδρες της μαύρης φυλής. Ανάλογα είναι και τα ποσοστά στην Ευρώπη.



Σχήμα-1. Στατιστικά στοιχεία για τον καρκίνο του προστάτου στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής τη δεκαεπενταετία 1973-1978. (National Cancer Institute)

Σημαντικό μέρος των νέων διαγνωσθέντων περιστατικών οφείλεται στην ευρεία χρήση νέων διαγνωστικών μεθόδων συμπεριλαμβανομένης της μέτρησης του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) και της χρήσης του διορθικού υπερηχογραφήματος (Cooper et al. 1990). Περισσότερο από το  $\frac{1}{4}$  των ανδρών στους οποίους έχει διαγνωστεί καρκίνος του προστάτου πεθαίνουν από την αρρώστεια μέσα σε δέκα χρόνια και περισσότεροι από τα  $\frac{2}{3}$  παρουσιάζουν τοπική ή συστηματική νόσο.

Ιστολογικά ο καρκίνος του προστάτου είναι πολύ πιο συχνός από ότι κλινικά. Περίπου το 30% των ανδρών άνω των 50 ετών έχουν καρκινικές εστίες χωρίς όμως τα κλινικά συμπτώματα, ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό (1-2%) θα εξελιχθεί σε καρκίνο του προστάτου (McNeal et al. 1986; Scardino et al. 1992).

Παρά τις τόσο ανησυχητικές στατιστικές μόνον λίγοι προδιαθεσικοί παράγοντες έχουν βρεθεί να συμμετέχουν στην ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτου (Spitz et al. 1991). Αναμφισβήτητα η οικογενειακή και η κληρονομική προδιάθεση παίζουν πρωτεύοντα ρόλο. Συγγενείς ασθενών έχουν 4 φορές αυξημένη πιθανότητα να εμφανίσουν καρκίνο του προστάτου κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Ένας κοινός γενετικός μηχανισμός σε οικογένειες με καρκίνο του προστάτου είναι η απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων (p53) (Kallioniemi and Visakorpi, 1996). Η συχνότητα εμφάνισης του, παρουσιάζει γεωγραφικές, φυλετικές και εθνικές διαφορές. Για παράδειγμα ο καρκίνος του προστάτου είναι πιο συχνός στους μαύρους της Αμερικής ενώ οι μαύροι της Αφρικής παρουσιάζουν χαμηλή συχνότητα εμφάνισης (Mebane et al. 1990). Χαμηλή είναι η συχνότητα εμφάνισης στην Ασία αλλά αυξάνει στους Ασιάτες μετανάστες των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (Muir et al. 1991; Shimizu et al. 1991). Από μελέτες έχει προκύψει η πιθανότητα να σχετίζεται η ανάπτυξή του με καρκινογόνες χημικές ουσίες στον εργασιακό χώρο (π.χ. κάδμιο) καθώς και με διάφορους διατροφικούς παράγοντες, γεγονός που ισχύει και σε άλλα είδη καρκίνου, κυρίως βέβαια σε αυτούς της πεπτικής οδού (Giovannucci 1999).

Οι διατροφικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στις βιολογικές διεργασίες που έχουν ως αποτέλεσμα τη ανάπτυξη και εμφάνιση ενός καρκίνου. Υπάρχουν ουσίες που μπορεί να δρουν ανασταλτικά και άλλες οι οποίες να προάγουν τη δημιουργία και ανάπτυξη ενός όγκου. Μπορεί να εμπλέκονται τόσο σε πρώιμα στάδια συμβάλλοντας στη καρκινογένεση (π.χ. αρωματικοί υδρογονάνθρακες που προκαλούν μεταλλάξεις στο DNA) όσο και σε ενδιάμεσα στάδια αύξησης και εξέλιξης του όγκου. Για παράδειγμα η κατανάλωση υψηλής ποσότητας λίπους

(Giovannucci et al. 1993) έχει ως αποτέλεσμα τη παραγωγή ενεργών μεταβολιτών όπως ελεύθερες ρίζες οξυγόνου οι οποίες προκαλούν μεταλλάξεις στο DNA. Από την άλλη, οι αντιοξειδωτικές ουσίες που υπάρχουν στις φυτικές τροφές μειώνουν την δημιουργία των ελεύθερων ριζών οξυγόνου μειώνοντας έτσι την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου (Fleshner and Klotz 1998).

Στον καρκίνο του προστάτου, από τους διατροφικούς παράγοντες που φαίνεται ότι αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισής του είναι η αυξημένη κατανάλωση ζωικού λίπους μέσω των ανδρογόνων και της δημιουργίας των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (de Jong et al. 1991; Ross and Gibson 1992; Fleshner and Klotz 1998) καθώς και επηρεάζοντας τη σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης (Ip et al. 1980). Αντίθετα η βιταμίνες D και E και το σελήνιο φαίνεται ότι παίζουν προστατευτικό ρόλο (Fleshner and Kucuk 2001; Zhao and Feldman 2001).

### **Σταδιοποίηση**

Η ακριβής σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτου είναι απαραίτητη για την πρόγνωση και θεραπεία του. Ιστολογική σταδιοποίηση γίνεται με την κλίμακα Gleason η οποία βασίζεται στο βαθμό διαφοροποίησης του προστατικού αδένου όσον αφορά την αρχιτεκτονική του δομή και είναι το σύστημα που χρησιμοποιείται ευρέως σε όλο τον κόσμο. Στην κλίμακα Gleason ο βαθμός αυξάνει παράλληλα με την αποδιοργάνωση της αρχιτεκτονικής του αδένου και την αύξηση της στρωματικής διήθησης. Άλλη μία κλίμακα για την κλινική όμως σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτου είναι η Whitmore-Jewett. Πάνω σε αυτήν την κλίμακα βασίζεται και το σύστημα σταδιοποίησης της American Urological Association (AUA). Πρόσφατα η American Joint Committee on Cancer (AJCC) και η Union Internationale Contre le Cancer (UICC) συμφώνησαν σε ένα κοινό σύστημα σταδιοποίησης το TNM (Montironi et al 2001). Η σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτου είναι απαραίτητη πριν τη θεραπεία του ασθενούς.

### **Διάγνωση του καρκίνου του προστάτου**

Η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του προστάτου είναι καθοριστική για την θεραπεία του. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι:

1. Η δακτυλική εξέταση μέσω του ορθού, με την οποία ο γιατρός κάνει ψηλάφηση στον προστάτη και μπορεί να εκτιμήσει το μέγεθος και τη σύστασή του.
2. Το διορθικό υπερηχογράφημα. Σπάνια χρησιμοποιείται μόνο για την ανίχνευση του καρκίνου του προστάτου αλλά κυρίως για να γίνει βιοψία σε άτομα που, είτε έχει βρεθεί κάτι με την δακτυλική εξέταση, είτε έχουν μη φυσιολογικά επίπεδα PSA στον ορό.
3. Το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA) το οποίο είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο (σερίνη πρωτεάση) που παράγεται από τα φυσιολογικά κύτταρα του προστάτου (Stamey et al. 1989) αλλά περνάει στον ορό το αίματος μόνο σε παθολογικές καταστάσεις. Αυξημένα επίπεδα στον ορό μπορούν να παρατηρηθούν όχι μόνο σε περιπτώσεις καρκίνου αλλά και στην καλοήγη υπερπλασία του προστάτου καθώς και σε απλές φλεγμονές. Όταν η συγκέντρωση του PSA είναι έως 4 ng/ml στον ορό, ανάλογα βέβαια και με τη ηλικία του ασθενούς, τότε θεωρείται φυσιολογική. Οι περισσότεροι ασθενείς με συγκέντρωση PSA στον ορό άνω των 10 ng/ml έχουν καρκίνο του προστάτη, ενώ σε περιπτώσεις ασθενών που τα επίπεδα του PSA στον ορό είναι μεταξύ των 4-10 ng/ml ένα ποσοστό 20%, έχει διαγνωστεί, μετά από βιοψία, με καρκίνο του προστάτου. Σε αυτή την περίπτωση η μέτρηση του ελευθέρου κλάσματος του PSA αποτελεί χρήσιμη διαγνωστική προσθήκη.

### Θεραπεία

Όταν ο καρκίνος είναι εντοπισμένος στον προστάτη τότε η θεραπεία μπορεί να επιτευχθεί με ολική προστατεκτομή (Middleton and Larsen 1990), ακτινοθεραπεία (Bagshaw et al. 1990), η κρυοχειρουργική, ενώ η ορμονοθεραπεία χρησιμοποιείται ευρέως σε περιπτώσεις μεταστατικού καρκίνου του προστάτου:

1. **Ολική προστατεκτομή.** Είναι ο πιο ενδεδειγμένος τρόπος και περιλαμβάνει τη χειρουργική αφαίρεση όλου του προστάτου μαζί με την κάψα του και τις σπερματοδόχους κύστες που είναι προσκολλημένες στον αδένα. Μετά την ολική προστατεκτομή τα επίπεδα του PSA στον ορό πρέπει να είναι μηδέν. Ο χρόνος επιβίωσης του ασθενούς ανέρχεται στα 10 ίσως και τα 15 χρόνια. Ως μετεγχειρητικές επιπλοκές μπορεί να παρατηρηθεί ακράτεια ούρων ή αδυναμία στύσης.
2. **Ακτινοθεραπεία.** Είναι η εναλλακτική θεραπεία στην ολική προστατεκτομή. Πραγματοποιείται είτε με ακτινοβολία του προστάτου από εξωτερική πηγή ακτινοβολίας είτε με εμφύτευση στον προστάτη ραδιενεργών μικρών πηγών ( $^{125}\text{I}$ ) με

στόχο την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Ο χρόνος επιβίωσης είναι συγκρίσιμος με αυτόν της ολικής προστατεκτομής. Προσωρινά μπορεί να ερεθιστεί η κύστη ή το ορθό ενώ ένα μικρό ποσοστό μπορεί να παρουσιάσει ακράτεια ούρων και αδυναμία στύσης.

3. **Κρυοχειρουργική.** Είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για δεκαετίες όμως τα αποτελέσματά της δεν είναι ικανοποιητικά λόγω των πολλών επιπλοκών της και την αυξημένη συχνότητα επανεμφάνισης της νόσου.
4. **Ορμονοθεραπεία.** Η συντριπτική πλειοψηφία περιπτώσεων καρκίνου του προστάτου εξαρτάται από τα ανδρογόνα για την ανάπτυξη τους. Έτσι μετά την παρατήρηση το 1941 από τους Huggins και Hodges ότι η έλλειψη των ανδρογόνων προκαλούσε καταστολή της νόσου, η φαρμακευτική ή χειρουργική στέρηση των ανδρογόνων χρησιμοποιείται ευρέως. Ο κύριος στόχος είναι η μείωση των επιπέδων τεστοστερόνης στον ορό. Χειρουργικά επιτυγχάνεται με ορχεκτομή. Φαρμακευτικά με την μηνιαία χορήγηση ενός αναλόγου της LHRH (Garnick 1986; Smith 1986; Swanson et al. 1988) που αναστέλλει την παραγωγή τεστοστερόνης και αντικατάστησε την χορήγηση οιστρογόνων τα οποία προκαλούσαν σοβαρές καρδιαγγειακές επιπλοκές. Χρησιμοποιούνται επίσης αντιανδρογόνα (flutamide) (Labrie 1991) σε συνδυασμό με την ορχεκτομή ή το ανάλογο του LHRH για την εξουδετέρωση των ανδρογόνων που παράγονται από τα επινεφρίδια. Με την ορμονοθεραπεία παρατηρείται μείωση του μεγέθους του καρκινικού όγκου καθώς και των μεταστάσεων (Smith 1987). Παράλληλα, τα επίπεδα του PSA στους περισσότερους ασθενείς μειώνονται κατά 90% και στο 50% των περιπτώσεων αγγίζουν τα φυσιολογικά. Σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο και μεταστάσεις στα οστά παρατηρείται γρήγορη και θεαματική ανακούφιση από τον πόνο. Οι παρενέργειες από την ορμονοθεραπεία είναι αποτέλεσμα της μείωσης των επιπέδων τεστοστερόνης. Έτσι μπορεί να παρατηρηθεί μείωση του λίμπιντο και ανικανότητα. Παρά την άριστη ανταπόκριση του προστατικού καρκίνου στην ορμονοθεραπεία, με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται εξέλιξη της νόσου. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη ορμονοάντοχων καρκινικών κυττάρων τα οποία επιβιώνουν στην έλλειψη των ανδρογόνων. Παρ'ολ'αυτά, αποτελεί την καλύτερη θεραπευτική αγωγή σε περιπτώσεις ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτου. Η ύφεση της νόσου μπορεί να διαρκέσει για μεγάλο χρονικό διάστημα.

## **Ανδρογόνα, ανδρογονικοί υποδοχείς και καρκίνος του προστάτου**

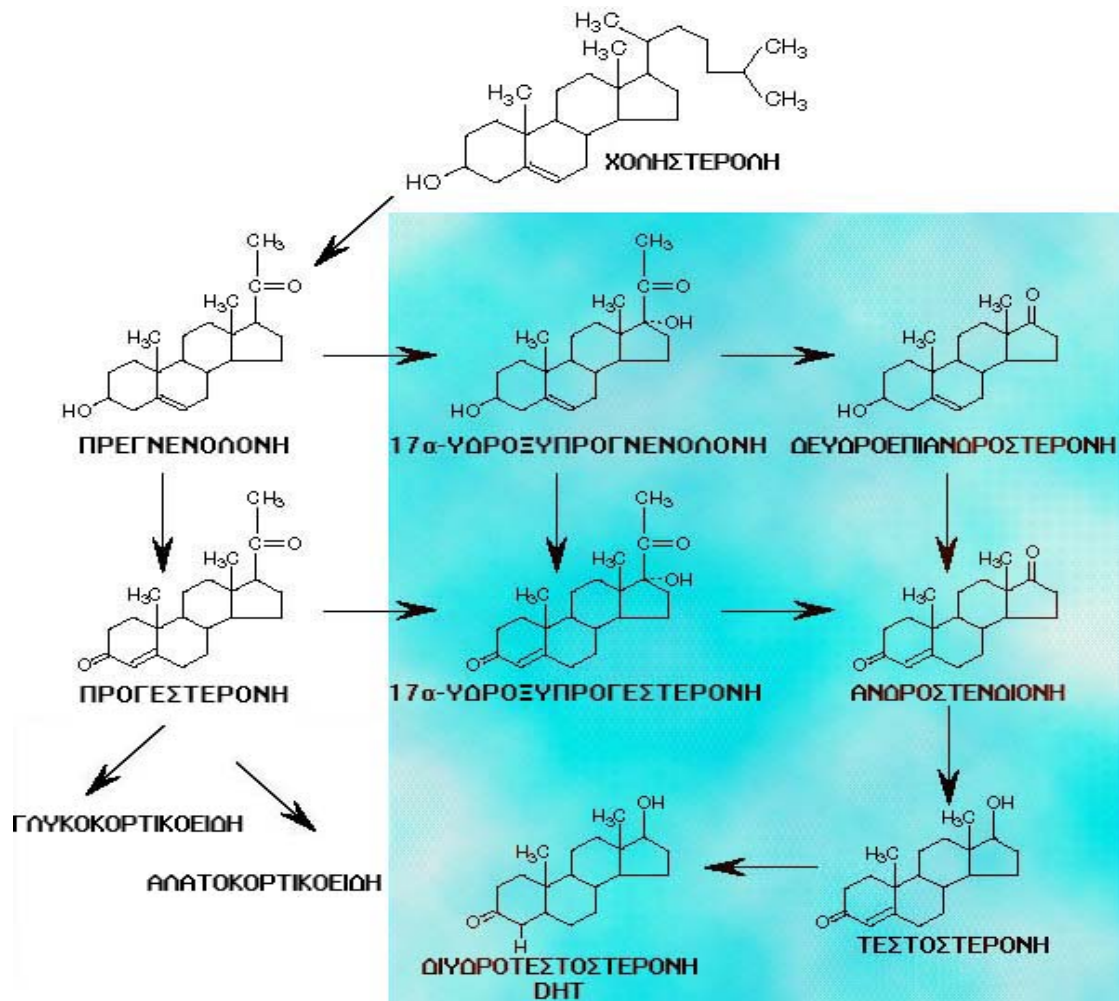
### ***Ανδρογόνα***

Τα ανδρογόνα είναι στεροειδείς ορμόνες, υπεύθυνες για την ανάπτυξη των γεννητικών οργάνων στον άνδρα αλλά και των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου. Παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αύξηση και διαφοροποίηση του προστατικού αδένου τόσο κατά την εμβρυική περίοδο όσο και κατά την εφηβεία (Cunha et al. 1987; Luke and Coffey 1994).

Η αιτιολογία του καρκίνου του προστάτου είναι άγνωστη. Πιστεύεται όμως ότι η δράση των ανδρογόνων συμμετέχει στη δημιουργία του. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ευνούχοι άνδρες, οι οποίοι παρουσιάζουν χαμηλές συγκεντρώσεις τεστοστερόνης στο αίμα, δεν εμφανίζουν καρκίνο του προστάτου και από το γεγονός ότι η πειραματική πρόκληση καρκινογένεσης σε πειραματόζωα απαιτεί ανδρογόνα (Ross et al. 1983; Wilding 1992; Whittemore 1994). Παρ'ολ'αυτά δεν είναι γνωστό εάν και σε ποιο στάδιο της καρκινογένεσης εμπλέκονται τα ανδρογόνα, εάν παίζουν ρόλο στην εξέλιξη της νόσου, ή εάν απλά προκαλούν τον πολλαπλασιασμό των προστατικών καρκινικών κυττάρων. Τα ανδρογόνα παράγονται κυρίως από τους όρχεις και σε μικρότερο ποσοστό από τον φλοιό των επινεφριδίων. Στην κυκλοφορία, το 90% των ανδρογόνων προέρχεται από τους όρχεις ενώ στον προστάτη το 60% προέρχεται από αυτούς. Τα κύρια ανδρογόνα είναι η τεστοστερόνη, και η 5α – διϋδροτεστοστερόνη (DHT), με την τελευταία να αποτελεί την κύρια μορφή με την οποία τα ανδρογόνα κυκλοφορούν στο αίμα και βιολογικά την πιο δραστική στον προστατικό ιστό. Άλλα ανδρογόνα είναι η διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και η θειϊκή DHEA (DHEAS), η Δ4 ανδροστενεδιόνη, η Δ5 ανδροστενεδιόλη.

Η σύνθεση των ανδρογόνων ξεκινά με την μετατροπή της 17 υδροξυπρογεστερόνης σε διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και ακολουθεί ο σχηματισμός της θειϊκής διϋδροεπιανδροστερόνης (DHEAS), της ανδροστενεδιόνης, της τεστοστερόνης η οποία μετατρέπεται σε 5α-διϋδροτεστοστερόνη(DHT). Το ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για την μετατροπή της τεστοστερόνης σε DHT είναι η 5α –αναγωγάση (Harper et al. 1974; Labrie et al. 1987; Geller et al. 1988).

Πρόσφατα, ως εναλλακτική μορφή ορμονοθεραπείας, δοκιμάζονται αναστολείς της 5α-αναγωγάσης αναστέλλοντας έτσι τη μετατροπή της τεστοστερόνης στο δραστικό της ανάλογο, DHT στο επίπεδο του ιστού-στόχου (Steers 2001).



Σχήμα-2. Η πορεία σύνθεσης των ανδρογόνων

Τα ανδρογόνα όπως έχει προαναφερθεί είναι στεροειδείς ορμόνες άρα μικρά λιποδιαλυτά μόρια με ικανότητα να περνούν εύκολα την κυτταρική μεμβράνη. Έτσι η δράση τους απαιτεί την σύνδεσή τους με διαλυτό πρωτεϊνικό υποδοχέα. Οι υποδοχείς των στεροειδών ανήκουν στη οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και σε αντίθεση με τους μεμβρανικούς υποδοχείς, βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου. Στο κυτταρόπλασμα, απουσία ανδρογόνων, ενώ επί παρουσία τους, προκαλείται μετατόπιση των ανδρογονικών υποδοχέων στον πυρήνα (Chang et al. 1988b; Evans 1988). Οι ανδρογονικοί υποδοχείς είναι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι επάγουν ή αναστέλλουν τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων (Kumar and Tindall 1998). Το



ανδρογόνο με την μεγαλύτερη συγγένεια για τον ανδρογονικό υποδοχέα είναι η DHT (Zhou et al. 1994).

### ***Ανδρογονικοί υποδοχείς***

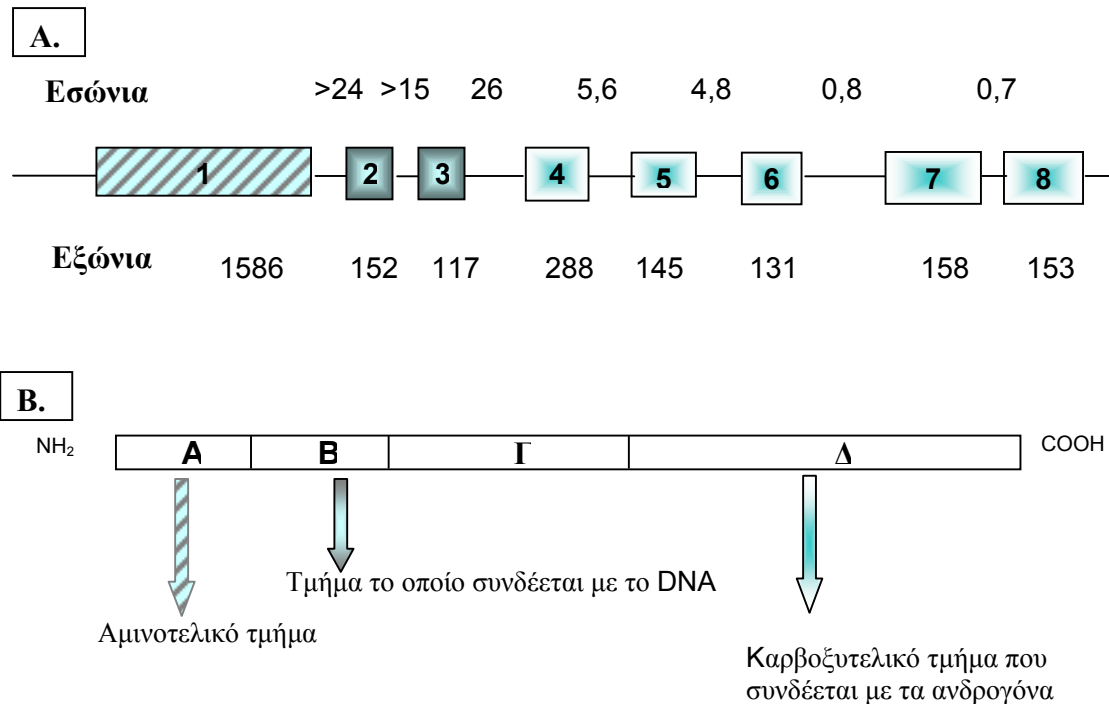
Ο υποδοχέας των ανδρογόνων είναι μία μονή πρωτεϊνική αλυσίδα και έχει μοριακό βάρος 110 kDa και αποτελείται από τέσσερα τμήματα A, B, Γ και Δ (Σχήμα-3B), από το αμινοτελικό προς το καρβοξυλικό άκρο. Το τμήμα A φαίνεται ότι είναι σημαντικό για τον καθορισμό του ιστού-στόχου και της ενεργοποίησης των γονιδίων-στόχων (Tora et al. 1988) (π.χ. το γονίδιο του ειδικού προστατικού αντιγόνου, PSA). Το τμήμα που ακολουθεί (B) αποτελεί τη θέση σύνδεσης του υποδοχέα με το DNA. Αποτελείται από 70 αμινοξικές ομάδες και εμφανίζει μία χαρακτηριστική οργάνωση κυστεϊνικών ομάδων με δομή δύο δακτυλίων που σταθεροποιείται από ιόντα  $Zn^{2+}$ , τους “δακτυλίους-ψευδαργύρου” (“Zn-fingers”) (Miller et al. 1985; Berg 1988). Το τμήμα αυτό καθορίζει το βαθμό εξειδίκευσης της δράσης του υποδοχέα στα ανδρογονορυθμιζόμενα στοιχεία των γονιδίων στόχων (ARE Androgen-Response Elements). Το τμήμα Γ συνδέει τα τμήματα B και Δ και δεν φαίνεται να μεταφέρει κάποια πληροφορία μεταξύ τους. Τέλος το τμήμα Δ είναι αυτό που συνδέεται με τα ανδρογόνα. Μερικές λειτουργίες χρειάζονται περισσότερα από ένα τμήματα και κάθε τμήμα επηρεάζει τη λειτουργία των άλλων. Για παράδειγμα η μετατόπιση του ανδρογονικού υποδοχέα στον πυρήνα ελέγχεται από αλληλουχίες που βρίσκονται και στο αμινοτελικό τμήμα καθώς και στο τμήμα που συνδέεται με τα ανδρογόνα. Από το αμινοτελικό τμήμα ελέγχεται ο διμερισμός και η σύνδεση του ανδρογονικού υποδοχέα με το DNA του πυρήνα (Lubahn et al. 1988; Rundlett et al. 1990; Zhou et al. 1994). Απουσία ανδρογόνων οι υποδοχείς βρίσκονται υπό την ανενεργή μορφή συμπλόκων με την πρωτεΐνη θερμικού σοκ HSP-90 σε αναλογία 2:1. Η παρουσία ανδρογόνων οδηγεί στην ενεργοποίηση τους. Ειδικότερα, μετά από τη σύνδεση των ανδρογόνων στο τμήμα Δ των ανδρογονικών υποδοχέων, απομακρύνονται οι HSP-90 με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των “Zn-fingers” περιοχών ενώ παράλληλα οδηγεί και σε διμερισμό του υποδοχέα. Το νέο σύμπλοκο είναι ικανό να περάσει στον πυρήνα, αναγνωρίσει και να δεσμευτεί με υψηλή συγγένεια στα AREs που εντοπίζει στα χρωμοσώματα, μεταφέροντας τελικά την ορμονική δράση στο μεταγραφικό επίπεδο (Beato and Klug 2000).

Οι ανδρογονικοί υποδοχείς παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου του προστάτου αφού οι περισσότερες περιπτώσεις ανταποκρίνονται στην

ορμονοθεραπεία, η οποία περιλαμβάνει την στέρηση των ανδρογόνων είτε με ορχεκτομή ή τη χορήγηση οιστρογόνων, αντιανδρογόνων, ή αναλόγων LHRH (Scott et al. 1980; Catalona 1986). Η έκταση και η διάρκεια της ανταπόκρισης διαφέρει, δεν είναι προβλέψιμη. Η περαιτέρω εξέλιξη της νόσου, θα οδηγήσει σε ορμονοάντοχο καρκίνο του προστάτου (Scott et al. 1980). Δυστυχώς δεν μπορεί να γίνει συσχέτιση μεταξύ υψηλού τίτλου υποδοχέων και ορμονοευαισθησίας. Μελέτες δείχνουν ότι οι ανδρογονικοί υποδοχείς μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη σε ορμονοαντοχή, αφού οι περισσότεροι όγκοι που δεν ανταποκρίνονται στην ορμονοθεραπεία εκφράζουν υποδοχείς ανδρογόνων (van der Kwast et al. 1991; Ruizeveld de Winter et al. 1994) ενώ η μεταγραφική δραστηριότητα του φυσιολογικού υποδοχέα μπορεί να ενεργοποιηθεί χωρίς την παρουσία ανδρογόνων, (Culig et al. 1994) εάν ενεργοποιηθούν ενδοκυττάρια μονοπάτια φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών όπως της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) από πεπτιδικούς αυξητικούς παράγοντες (Denner et al. 1990; Power et al. 1991; Aronica and Katzenellenbogen 1993; Culig et al. 1994).

Χαρακτηριστικό του ανδρογονικού υποδοχέα είναι ότι στο αμινοτελικό του τμήμα περιέχει επαναλαμβανόμενες περιοχές από γλουταμίνες, προλίνες και γλυκίνες. Το μέγεθος του τμήματος με τις γλουταμίνες στον ανδρογονικό υποδοχέα διαφέρει στον γενικό πληθυσμό (La Spada et al. 1991; Edwards et al. 1992) και επηρεάζει την μεταγραφική δραστηριότητά του. Όσο πιο μικρό είναι σε μέγεθος τόσο πιο ενεργός είναι ο υποδοχέας (Mhatre et al. 1993; Chamberlain et al. 1994; Kazemi-Esfarjani et al. 1995). Άρα εφόσον επηρεάζουν την λειτουργία του ανδρογονικού υποδοχέα, τα τμήματα αυτά ίσως καθορίζουν και την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στα επίπεδα της DHT στον ιστό.

Το γονίδιο του ανδρογονικού υποδοχέα αποτελείται από 8 εξόνια (Σχήμα-9Α) όπως και όλα τα μέλη της οικογένειας των στεροειδών υποδοχέων και βρίσκεται πάνω στο χρωμόσωμα X.



**Σχήμα-3. Ανδρογονικός υποδοχέας.** (A) Το γονίδιο του ανδρογονικού υποδοχέα αποτελείται από 8 εξώνια. Το μήκος των εσωνίων είναι σε κιλοβάσεις (kb) ενώ των εξωνίων σε ζεύγη βάσεων (pb). (B) Ο ανδρογονικός υποδοχέας αποτελείται από τέσσερα τμήματα.

Πολλοί όγκοι έχουν μεταλλαγμένους ανδρογονικούς υποδοχείς εξηγώντας έτσι γιατί κάποιοι όγκοι δεν ανταποκρίνονται στην ορμονοθεραπεία παρόλο που εκφράζουν τον ανδρογονικό υποδοχέα (van der Kwast et al. 1991). Μεταλλάξεις στο αμινοτελικό τμήμα καθιστά τον ανδρογονικό υποδοχέα μεταγραφικά ανενεργό (Jenster et al. 1991; Simental et al. 1991) ενώ διατηρεί την ικανότητα σύνδεσης με τα ανδρογόνα. Αντίθετα μεταλλάξεις στο καρβοξυλικό άκρο κατά κύριο λόγο καταστρέφουν αδύνατη τη σύνδεση με τα ανδρογόνα (Rundlett et al. 1990; Jenster et al. 1991; Simental et al. 1991), ενώ επηρεάζουν και άλλες λειτουργίες όπως τον διμερισμό του υποδοχέα, τη μεταγραφική ενεργοποίηση, ή την εντόπισή τους στον πυρήνα.

Η πρώτη μετάλλαξη που βρέθηκε στο γονίδιο του ανδρογονικού υποδοχέα στον καρκίνο του προστάτου, ήταν στην καρκινική κυτταρική σειρά LNCaP (Veldscholte et al. 1990; Kokontis et al. 1991; Veldscholte et al. 1992a). Το αμινοξύ 877 στο τμήμα του υποδοχέα που συνδέεται με τα ανδρογόνα είναι αλανίνη αντί της θρεονίνης. Ο ανδρογονικός υποδοχέας που προκύπτει έχει την ίδια συγγένεια σύνδεσης με τα ανδρογόνα με τον φυσιολογικό υποδοχέα. Το αποτέλεσμα της αλλαγής του αμινοξέος είναι ότι ο μεταλλαγμένος υποδοχέας συνδέεται όχι μόνο με

τα ανδρογόνα αλλά και με τα οιστρογόνα, τη προγεστερόνη και τα αντιανδρογόνα (Veldscholte et al. 1992a).

Μεταλλάξεις του ανδρογονικού υποδοχέα έχουν βρεθεί σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνου του προστάτου αλλά όχι σε όλες. Επιπρόσθετα βρέθηκαν και σε αρχικά στάδια της ασθένειας (Newmark et al. 1992) αλλά και σε προχωρημένο καρκίνο του προστάτου (Culig et al. 1993; Suzuki et al. 1993; Taplin et al. 1995), η διαφορά όμως μεταξύ τους ίσως έγκειται στη συχνότητα εμφάνισης. Η πιθανότητα ύπαρξης μεταλλαγμένων ανδρογονικών υποδοχέων στα αρχικά στάδια της νόσου ίσως υποδηλώνει έναν επιθετικό όγκο. Το γεγονός πάντως ότι μεταλλαγμένοι ανδρογονικοί υποδοχείς δεν έχουν βρεθεί σε όλες τις περιπτώσεις καρκίνου του προστάτου υποδηλώνει ότι και ο φυσιολογικός ανδρογονικός υποδοχέας πιθανώς να εμπλέκεται στον καρκίνο του προστάτου. Σημαντικό ρόλο παίζουν και τα επίπεδα των κυκλοφορούντων ανδρογόνων καθώς και της 5α- αναγωγήσης. Δεν πρέπει βέβαια να αγνοούμε την πιθανότητα δημιουργίας διαφορετικών μορφών του ανδρογονικού υποδοχέα από ένα φυσιολογικό γονίδιο λόγω διαφορετικού ματίσματος σε αναλογία με τους υποδοχείς οιστρογόνων στον καρκίνο του μαστού. (Fuqua et al. 1991; Castles et al. 1993). Καταλαβαίνουμε λοιπόν ότι σε ότι αφορά την ενδοκρινική θεραπεία, υψηλά επίπεδα ανδρογονικών υποδοχέων ενός όγκου δεν σχετίζονται πάντα με την ανταπόκρισή του σε αυτήν, δεδομένου ότι η λειτουργικότητα του υποδοχέα είναι σημαντική. Ο πιο καλός δείκτης της λειτουργικότητας των ανδρογονικών υποδοχέων είναι η γνώση της ακεραιότητας του γονιδίου και του προϊόντος του.

Ο κλασικός τρόπος δράσης των ανδρογόνων όπως περιγράφηκε παραπάνω έχει χαρακτηριστεί ως γενωμικός αφού επηρεάζει τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων. Έχει όμως διαπιστωθεί ότι οι στεροειδείς ορμόνες εμφανίζουν μερικές φορές πολύ γρήγορες επιδράσεις που αρχίζουν μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα ή λεπτά από την ορμονική έκθεση και δεν περιλαμβάνουν σύνθεση RNA ή πρωτεΐνης. Ταχείες αποκρίσεις έχουν περιγραφεί για όλες τις κατηγορίες των στεροειδών ορμονών (McEwen 1991; Wehling 1997; Watson and Gametchu 1999a; Borski 2000; Falkenstein et al. 2000). Στις περισσότερες περιπτώσεις συμμετέχουν και συστήματα δεύτερων αγγελιοφόρων ή κανάλια ιόντων που υπάρχουν στη πλασματική μεμβράνη (Aronica et al. 1994). Τα παραπάνω ευρήματα οδήγησαν στην υπόθεση ότι οι στεροειδείς ορμόνες αλληλεπιδρούν και με υποδοχείς στην πλασματική μεμβράνη για

την έναρξη της ταχείας δράσης τους παράλληλα με το κλασσικό τρόπο δράσης τους μέσω ενδοκυττάρων υποδοχέων σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Επιπλέον, η συνολική δράση των στεροειδών είναι αποτέλεσμα της διπλής δράσης τους (γενωμικό και μη γενωμικό) (Wehling 1997; Christ et al. 1999; Falkenstein et al. 2000). Πράγματι, μεμβρανικοί υποδοχείς ανιχνεύθηκαν για διάφορες στεροειδείς ορμόνες όπως η προγεστερόνη, τα οιστρογόνα και τα γλυκοκορτικοειδή (Brann et al. 1995; Grazzini et al. 1998; Nadal et al. 1998; Nemere and Farach-Carson 1998). Δέσμευση των στεροειδών σε αυτούς έχει ως αποτέλεσμα ταχεία δράση όπως μεταβολές στο κανάλι ασβεστίου, στο cAMP, στην έκκριση, και το κυτταροσκελετό (Koukouritaki et al. 1996) ενώ έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας πικοιλίας κινασών όπως για παράδειγμα κινάσες τυροσίνης, σερίνης/θρεονίνης, MAP κινάσες, κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα (ERKs) (Mendoza et al. 1995; Di Domenico et al. 1996; Migliaccio et al. 1996; Morey et al. 1997) και την επακόλουθη μεταβολή της κατάστασης φωσφορυλίωσης σημαντικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών όπως οι κυκλίνες (Nigg 1995).

Τα ανδρογόνα ήταν το τελευταίο μέλος της οικογένειας των στεροειδών ορμονών για τα οποία βρέθηκε μη γενωμική δράση τόσο σε κύτταρα που φέρουν (Lieberherr and Grosse 1994; Armen and Gay 2000) όσο και σε κύτταρα που δεν φέρουν (Benten et al. 1997; Benten et al. 1999a; Benten et al. 1999b) κυτταροπλασματικούς ανδρογονικούς υποδοχείς.

Μεμβρανικοί υποδοχείς, έχουν ανιχνευθεί σε οστεοβλάστες αρουραίου και σε T λεμφοκύτταρα και μακροφάγα ποντικού (Bentel et al. 1999). Διαφέρουν από τους κυτταροπλασματικούς ανδρογονικούς υποδοχείς και ανήκουν στην ομάδα των μεμβρανικών υποδοχέων που συζευγνύονται με την φωσφολιπάση C μέσω των G πρωτεϊνών οι οποίες είναι ευαίσθητες στην τοξίνη του κοκκύτη. Δέσμευση της τεστοστερόνης σε αυτούς του υποδοχείς προκαλεί αύξηση του ελεύθερου ενδοκυττάρου αβεστίου και σχηματισμό 1,4,5 τριφωσφορικής ινοσιτόλης (Lieberherr and Grosse 1994).

### ***Ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA)***

Ένα από τα γονίδια η έκφραση του οποίου ελέγχεται από τα ανδρογόνα είναι αυτό του ειδικού προστατικού αντιγόνου. Το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA) είναι μία πρωτεάση, με μοριακό βάρος 34 kDa η οποία συντίθεται στην εσωτερική

στοιβάδα του επιθηλίου του ώριμου προστάτου (Wang et al. 1979; Stamey et al. 1989). Είναι μία από τις κύριες πρωτεΐνες του προστατικού υγρού, απαραίτητη για την ρευστοποίηση του σπέρματος μετά την εκσπερμάτιση. Πρόκειται για μία γλυκοπρωτεΐνη η οποία αποτελείται από 1 πολυπεπτιδική αλυσίδα 240 αμινοξέων και 8% υδατάνθρακες. Το γονίδιο που κωδικοποιεί το PSA έχει μήκος 6 kb αποτελείται από 4 εσώνια και 5 εξώνια και βρίσκεται πάνω στο χρωμόσωμα 19 (Lundwall and Lilja 1987; Riegman et al. 1989; Henttu et al. 1990). Ενεργοποίηση του ανδρογονικού υποδοχέα από τα ανδρογόνα έχει ως αποτέλεσμα τη σύνδεση του υποδοχέα των με ειδικές περιοχές στο DNA, ARE (androgen response element) στη περιοχή του υποκινητή του γονιδίου του PSA ενεργοποιώντας έτσι τη μεταγραφή του.

Φυσιολογικά με την πάροδο της ηλικίας και πιθανώς λόγω της αύξησης του μεγέθους του προστάτου αυξάνει η ποσότητα του PSA που περνάει στον ορό του αίματος, η οποία όμως παραμένει σε χαμηλά επίπεδα ( $< 4\text{ng/ml}$ ). Αντίθετα σε παθολογικές καταστάσεις του προστάτου, η συγκέντρωση του PSA που περνάει στον ορό του αίματος αυξάνει. Στον ορό συναντάται σε τρεις μορφές (Lilja et al. 1991; Stenman et al. 1991): (α) ενωμένο με τον αναστολέα  $\alpha_1$  αντιχυμοθρυψίνη, περίπου το 80% (το ποσοστό ποικίλει από 45-95%) του συνολικού PSA, (β) ενωμένο με την  $\alpha_2$  μακροσφαιρίνη η οποία σκεπάζει τους διάφορους επίτοπους του PSA και γι' αυτό το λόγο και δεν είναι ανιχνεύσιμο και τέλος (γ) σε ελεύθερη μορφή η οποία είναι ανενεργή.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης του PSA στο ορό αποτελεί σημαντικό δείκτη για τη μετεγχειρητική παρακολούθηση των ασθενών, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ολική προστατεκτομή για ανίχνευση της υπολειπόμενης καρκινικής μάζας καθώς επίσης και για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης του προστατικού καρκίνου στην εφαρμοζόμενη θεραπεία. Πολύ σημαντικός είναι επίσης και ο ρόλος του στη διάγνωση του καρκίνου του προστάτου σε πολύ αρχικό στάδιο.

Εκτός από τη μέτρηση του ολικού PSA στον ορό, μελέτες έδειξαν ότι είναι και η μέτρηση του ελεύθερου PSA κυρίως στη διάγνωση του καρκίνου του προστάτου και διαχωρισμό του από την καλοήγησ υπερπλασία του προστάτου. Σε περιπτώσεις όπου η τιμή του ολικού PSA κυμαίνεται μεταξύ 4 και 10 ng/ml η μέτρηση του ελεύθερου PSA βοηθάει στον διαχωρισμό εκείνων των ατόμων στα οποία πρέπει να γίνει βιοψία (Catalona et al. 1998). Έχει βρεθεί ότι όταν το ποσοστό του ελεύθερου PSA είναι μικρότερο από 25% της συνολικής ποσότητας, είναι

απαραίτητο να γίνει βιοψία, ανιχνεύοντας προστατικό καρκίνο σε ποσοστό 95%. Άλλες μελέτες αναφέρονται στη χρήση του λόγου ελεύθερου προς ολικού PSA για να γίνει διαχωρισμός μεταξύ καλοήθους υπερπλασίας και καρκίνου. Ο λόγος ελεύθερο προς ολικό PSA φαίνεται να είναι μεγαλύτερος στην καλοήθη υπερπλασία του προστάτου απ' ό τι στον καρκίνο (Lilja 1993; Bjork et al. 1994).

Μέχρι πριν από μερικά χρόνια, επικρατούσε η άποψη ότι το PSA παραγόταν μόνο από επιθηλιακά κύτταρα του προστάτου (από όπου πήρε και το όνομά του) φυσιολογικά ή καρκινικά. Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι μικρές ποσότητες PSA παράγονται και από καρκινικά κύτταρα μαστού, εντέρου, πνεύμονα, οωθηκών, ήπατος, δέρματος και σιελογόνων αδένων (Clements and Mukhtar 1994; Diamandis and Yu 1995), ενώ παράγεται και από φυσιολογικά κύτταρα ενδομητρίου, μαστού μετά από ενεργοποίηση με στεροειδή και έχει ανιχνευθεί στο μητρικό γάλα και στο αμνιακό υγρό. Επίσης η συγκέντρωση του PSA είναι αυξημένη στον ορό των εγκύων και σε αυτές με υψηλή συγκέντρωση ανδρογόνων. Παρά ταύτα όμως η κύρια πηγή παραγωγής PSA εξακολουθεί να είναι ο προστάτης.

Το PSA έχει βρεθεί ότι απελευθερώνει την ενεργή μορφή του IFGI (Cohen et al. 1992; Cohen et al. 1994) και ενεργοποιεί τον β εξαλλακτικό αυξητικό παράγοντα (TGF-β). Παρουσιάζει σημαντική μιτογονική δραστηριότητα σε οστεοβλάστες, ινοβλάστες και άλλα κύτταρα σε καλλιέργεια (Killian et al. 1993)

## ΟΠΙΟΕΙΔΗ

Στις αρχές της δεκαετίας του '70, βιοχημικά δεδομένα έδειξαν ότι η δράση των αλκαλοειδών του οπίου (π.χ. μορφίνη) επιτελείται με την πρόσδεσή τους σε ειδικές θέσεις, τους οπιοειδείς υποδοχείς. Αυτό οδήγησε τους ερευνητές στη διερεύνηση της πιθανής ύπαρξης ενδογενών ουσιών που θα δρούσαν μετά από πρόσδεσή τους σε αυτούς τους υποδοχείς. Το 1975 απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από τους Hughes και Kosterlitz, δύο πενταπεπτίδια, η μεθειονίνη εγκεφαλίνη και η λευκίνη εγκεφαλίνη. Έκτοτε έχει βρεθεί και απομονωθεί ένας σημαντικός αριθμός ενδογενών πεπτιδίων όπως οι ενδορφίνες, οι δυναρφίνες και οι νεο-ενδορφίνες (Hollt 1983). Εκτός από τα ενδογενή οπιοειδή υπάρχουν και οπιοειδή πεπτίδια τα οποία είναι συνθετικά (εξωγενή οπιοειδή πεπτίδια) όπως η [D-ala<sup>2</sup>, D-leu<sup>5</sup>]-Εγκεφαλίνη (DADLE), η [D-Ser<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>]-Εγκεφαλίνη, Thr<sup>6</sup> (DSLET), η [D-Ala<sup>2</sup>, N-Me-Phe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol]-Εγκεφαλίνη (DAGO) κ.α., καθώς και πεπτίδια με οπιοειδή δράση που προέρχονται από τη διάσπαση της α (Loukas et al. 1983) και β καζεΐνης (Brantl et al. 1979; Lottspeich et al. 1980; Chang et al. 1981) (καζομορφίνες). Η βιολογική δράση των οπιοειδών πεπτιδίων επιτελείται μετά από δέσμευσή τους σε ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς.

### Ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια

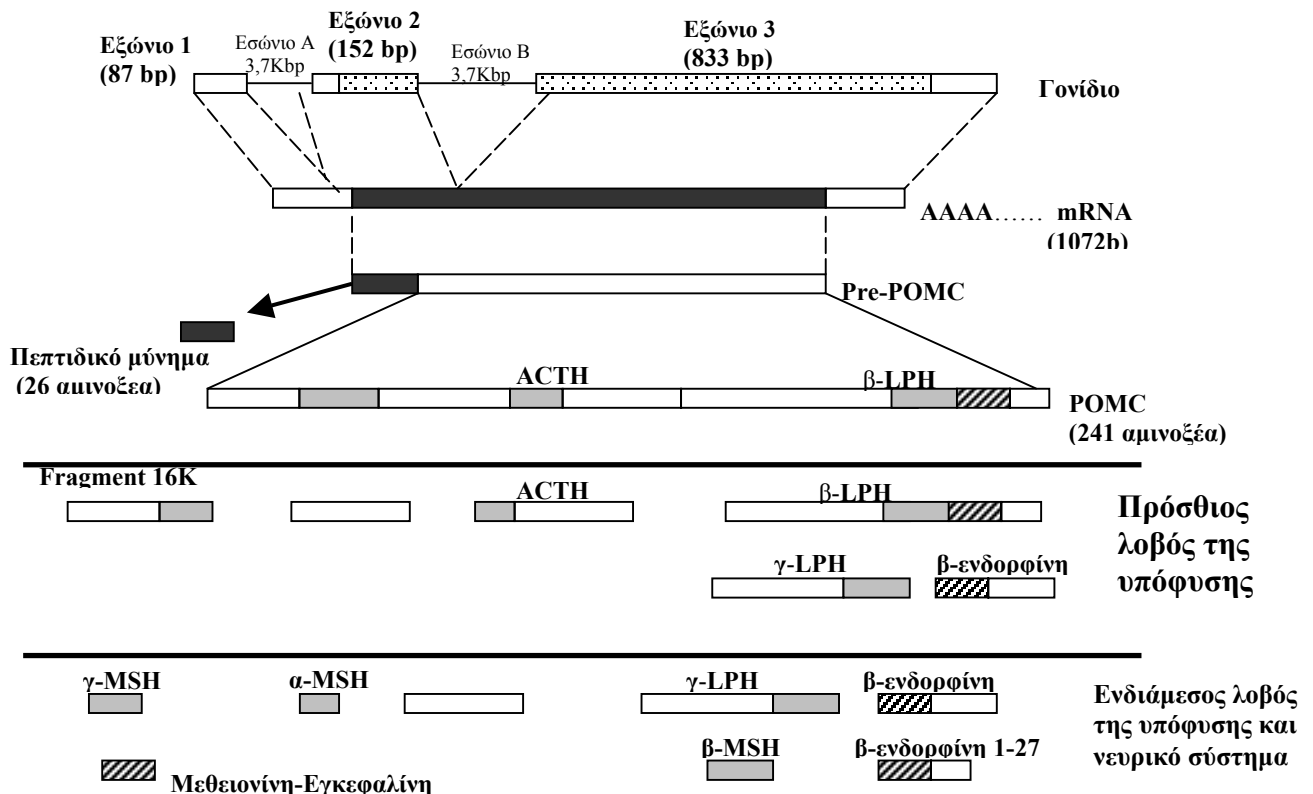
Ένας μεγάλος αριθμός οπιοειδών πεπτιδίων έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα. Το σύνολο των ενδογενών οπιοειδών πεπτιδίων ανήκει σε τρεις διαφορετικές οικογένειες: τις εγκεφαλίνες, τις ενδορφίνες και τις δυναρφίνες (Hughes and Kosterlitz 1983). Η δράση των πεπτιδίων αυτών που μπορεί να είναι ανάλογη των νευροδιαβιβαστών, των νευροορμονών ή των κλασικών ορμονών και εξαρτάται από την περιοχή στην οποία παράγονται και εκκρίνονται, καθώς και από τα κύτταρα στόχους.

Τα ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια προκύπτουν από την πρωτεολυτική διάσπαση τριών διαφορετικών πρόδρομων πρωτεϊνών τα οποία προέρχονται από τρία διαφορετικά γονίδια:

1. Τη Προ-οπιομελανοκορτίνη (POMC) (Σχήμα-4). Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στην πρόσθια υπόφυση και σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε

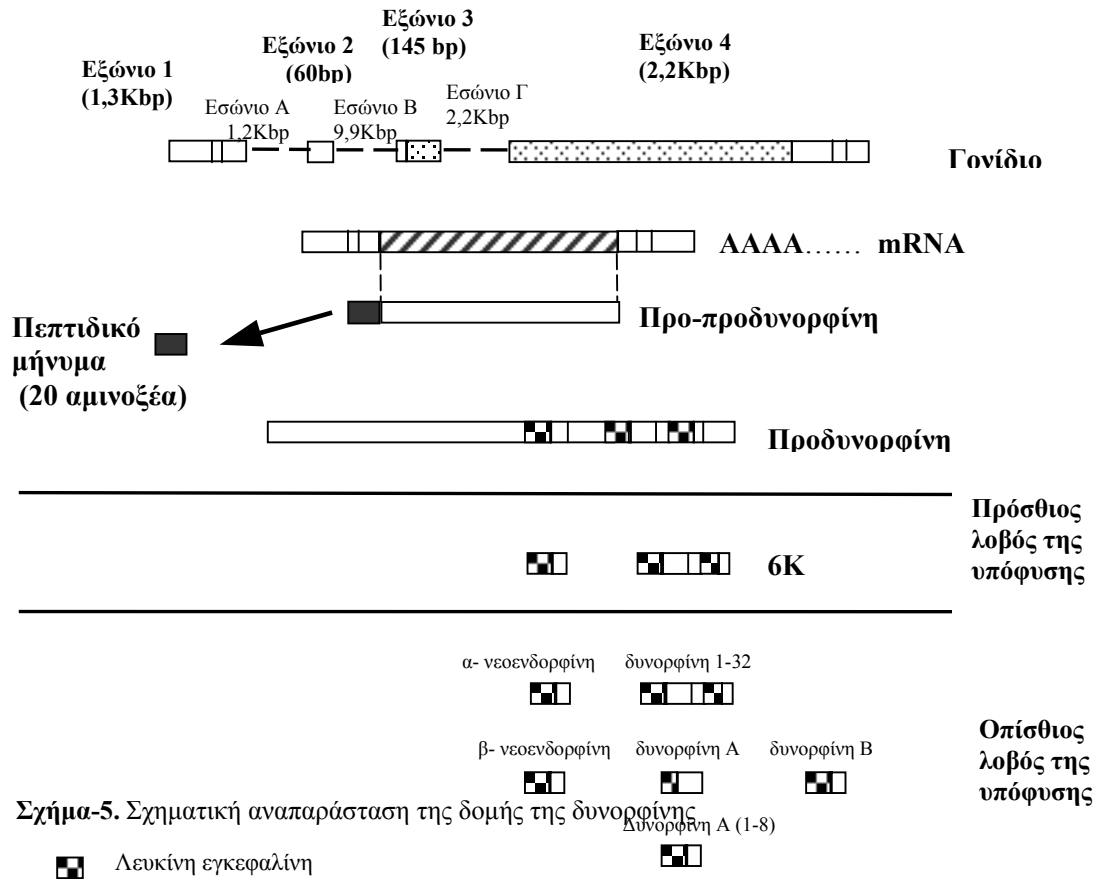


άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Ανάλογα με τη περιοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος στην οποία ανιχνεύεται, από τη διάσπαση της προκύπτουν η αδενοκορτικοτρόπος ορμόνη (ACTH), η β-LPH, η β-ενδορφίνη και οι μελανοτρόπους ορμόνες ( $\alpha$  -  $\beta$  -  $\gamma$  και  $\gamma$ 3 MSH) (Eipper and Mains 1980; Drouin et al. 1985).



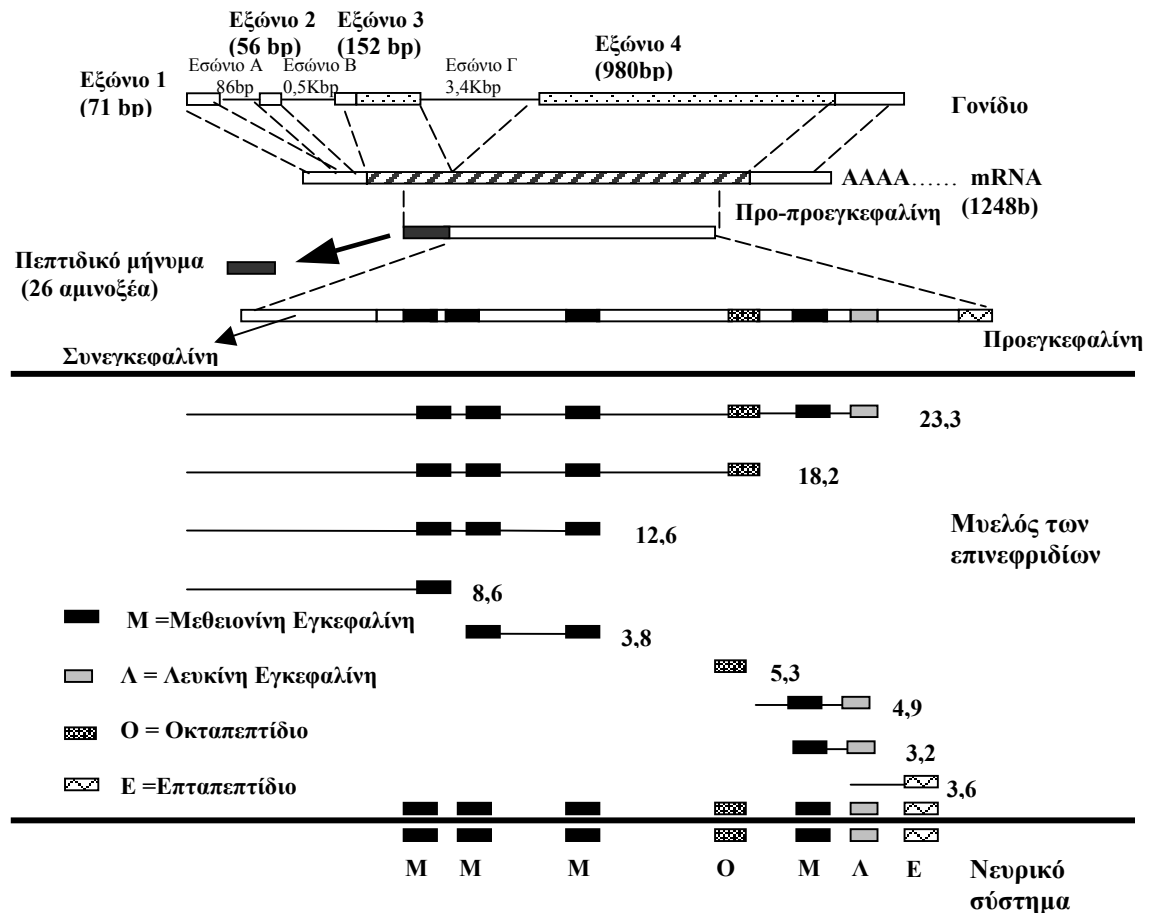
**Σχήμα-4.** Σχηματική αναπαράσταση της δομής της POMC (Περιλαμβάνει ένα μόνο οπιοειδές πεπτίδιο, την β ενδορφίνη)

- Τη Προδουνορφίνη (Σχήμα-5) η οποία βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε επιλεγμένες περιοχές του ΚΝΣ όπως ο υποθάλαμος. Απο τη διάσπαση της προδουνορφίνης παράγονται η  $\alpha$ -νεοενδορφίνη, η  $\beta$ -νεοενδορφίνη, η δουνορφίνη Α, η δουνορφίνη Α(1-8), η δουνορφίνη Α(1-7) και η δουνορφίνη Β. (Seizinger et al. 1984; Civelli et al. 1985).



**Σχήμα-5.** Σχηματική αναπαράσταση της δομής της δυναρφίνης

3. Τη Προεγκεφαλίνη Α (Σχήμα-6) η οποία βρίσκεται στο επίπεδο του κεντρικού νευρικού συστήματος και σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις στο μυελό των επινεφριδίων (Fleminger et al. 1983; Wilson 1991a). Προϊόντα της πρωτεολυτικής διάσπαση της είναι η Μεθειονίνη-εγκεφαλίνη, η Λευκίνη-εγκεφαλίνη, η Μεθειονίνη-εγκεφαλίνη-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>, το επταπεπτίδιο Μεθειονίνη-εγκεφαλίνη -Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> και το Πεπτίδιο Ε.



Σχήμα-6. Σχηματική αναπαράσταση της δομής της προεγκεφαλίνης

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη διάσπαση των πρόδρομων μορίων των οπιοειδών πεπτιδίων, έχουν κλωνοποιηθεί και έχει καθοριστεί η αλληλουχία των αμινοξέων τους. Η κατανομή αυτών των ενζύμων στους διάφορους ιστούς δεν είναι καθορισμένη, εξαρτάται από το είδος και τη φύση του ιστού, όπως φαίνεται και στα σχήματα 3-5 (Hollt 1983; Numa 1984).

Τα ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια εκφράζονται όχι μόνο σε ιστούς νευρικής προέλευσης αλλά και σε μια πληθώρα ιστών μη νευρικής προέλευσης.

Ο κύριος ρόλος των ενδογενών πεπτιδίων είναι στη ρύθμιση του πόνου, ενώ συμμετέχουν στην έκκριση ορμονών και νευροπεπτιδίων, στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος και άλλων καρδιακών λειτουργιών, στην αναπνευστική καταστολή, στον έλεγχο της αναπαραγωγής, ενώ επηρεάζουν και την λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Olson et al. 1985; Hemmick and Bidlack 1990; Gravanis et al. 1999). Μελέτες έδειξαν ότι το οπιοειδές σύστημα είναι από τα κύρια ανασταλτικά συστήματα του οργανισμού, μειώνοντας την δραστηριότητα και/ή την ανάπτυξη των

κυττάρων (Plyinsky et al. 1987). Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν ανασταλτική δράση σε καρκινικά κύτταρα (Kikuchi et al. 1989; Zagon and McLaughlin 1989a; Hatzoglou et al. 1996a).

### **Καζομορφίνες**

Η κύρια λειτουργία των πρωτεϊνών που λαμβάνονται με την τροφή είναι να παρέχουν στον οργανισμό μας τα απαραίτητα αμινοξέα. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος καθώς και άλλες ζωικές αλλά και φυτικές πρωτεΐνες (αιμοσφαιρίνη, καζεΐνες, γλουτένη) αποτελούν επιπλέον, πηγή βιολογικά ενεργών πεπτιδίων (Schlimme and Meisel 1995). Τα πεπτίδια αυτά αποτελούν προϊόντα μερικής ενζυματικής διασπάσεως (πέψης) των παραπάνω πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος αποτελούν κύρια πηγή βιολογικά ενεργών πεπτιδίων όπως οι εξορφίνες (καζομορφίνες), φωσφοπεπτίδια και ανοσοπεπτίδια (Meisel et al. 1995). Μεγάλο ποσοστό των πρωτεϊνών του γάλακτος (80% του γάλακτος των μηρυκαστικών, 40% του ανθρώπινου γάλακτος) καταλαμβάνουν οι καζεΐνες οι οποίες, συντίθενται από τα επιθηλιακά κύτταρα θηλαζόντων μαστών σε όλα τα θηλαστικά. Πρόκειται για φωσφοπρωτεΐνες οι οποίες σχηματίζουν σταθερά μυκίλλια με ασβέστιο. Η σύνθεση και η έκκρισή τους βρίσκονται κάτω από πολυορμονικό έλεγχο, ο οποίος περιλαμβάνει τις στεροειδείς ορμόνες, την προλακτίνη και την αυξητική ορμόνη και μία πληθώρα νευροπεπτιδίων και νευροδιαβιβαστών και αυξητικών ή τροποποιητικών παραγόντων. Στο αγελαδινό γάλα διακρίνονται τέσσερα είδη καζεϊνών, η  $\alpha_{s1}$  καζεΐνη, η  $\beta$  καζεΐνη, η  $\alpha_{s2}$  και η  $\kappa$ -καζεΐνη με αυτή τη σειρά βρίσκονται και τα γονίδια που τις κωδικοποιούν πάνω στο χρωμόσωμα 4 των βοοειδών (Hayes et al. 1993). Η  $\beta$ -καζεΐνη, η οποία είναι η μεγαλύτερη σε μέγεθος (209 αμινοξέα με 5 θέσεις φωσφορυλιώσεως) αποτελεί το συνηθέστερο μόριο καζεΐνης σε όλα τα μελετηθέντα είδη και στον άνθρωπο αποτελεί την κυριότερη καζεΐνη στο γάλα (30% των ολικών πρωτεϊνών και 70% των συνολικών καζεϊνών) (Anderson et al. 1982; Lonnerdal 1985). Η πρωτεΐνη αυτή έχει πλήρως ταυτοποιηθεί (Greenberg et al. 1984) καθώς και έχει απομονωθεί και μελετηθεί η δομή του γονιδίου της (Hansson et al. 1994). Παράλληλα με τη  $\beta$ -καζεΐνη, προ 20αετίας ανιχνεύθηκε και η παρουσία της  $\kappa$ -καζεΐνης η δομή της οποίας καθώς και του αντίστοιχου γονιδίου έχει παράλληλα ταυτοποιηθεί (Waugh and Talbot 1971; Chobert et al. 1976; Brignon et al. 1985; Bergstrom et al. 1992). Μέχρι τις αρχές της

δεκαετίας του 90 επικρατούσε η άποψη ότι το ανθρώπινο γάλα δεν περιέχει α-καζεΐνες (Chtourou et al. 1985; Kunz and Lonnerdal 1990) παρόλο που στο αγελαδινό γάλα οι καζεΐνες αυτές αποτελούν περίπου το 50% των συνολικών καζεϊνών (Ribadeau-Dumas 1993). Σχετικά πρόσφατα όμως, ανακοινώθηκε η παρουσία της  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης στο ανθρώπινο γάλα (Johnsen et al. 1995).

Διάφορα βιοδραστικά πεπτιδία, συμπεριλαμβανομένων και οπιοειδών πεπτιδίων, μπορούν να απελευθερωθούν από τις καζεΐνες με τη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων *in vitro* και *in vivo* όπως για παράδειγμα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τροφίμων (από ένζυμα βακτηρίων της ζύμωσης του γάλακτος, *Lactococcus Lactis*) και της πέψης αντίστοιχα (Meisel and Bockelmann 1999). Δράση οπιοειδών αγωνιστών έχουν παρουσιάσει πεπτιδία όπως οι εξορφίνες προερχόμενες από την α-καζεΐνη (τα τμήματα 90-95 και 90-96 της βόειας α καζεΐνης) (Zioudrou et al. 1979; Loukas et al. 1983) και οι β-καζομορφίνες προερχόμενες από την αλληλουχία 60-66 της βοείου β-καζεΐνης (Teschemacher and Coch 1991; Teschemacher et al. 1997). Η ανθρώπινη β-καζεΐνη, σε ανάλογη θέση περιέχει επίσης ένα αντίστοιχο επταπεπτιδίο με αξιόλογη οπιοειδής δραστηριότητα (Brantl 1984). Πεπτιδία τα οποία προέρχονται από την α ή β καζεΐνη έχει βρεθεί ότι συνδέονται με τους οπιοειδείς υποδοχείς στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού T47D και αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Hatzoglou et al. 1996a).

Η φυσιολογική σημασία των πεπτιδίων που απελευθερώνονται με την πρωτεόλυση των καζεϊνών έγκειται στη πιθανή *in vivo* παρουσία τους στο γαστρεντερικό σωλήνα (Brantl 1984; Meisel 1986) και στη κυκλοφορία του αίματος μέσω της απορρόφησης τους στην εντερική οδό, μετά από τη λήψη γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων (Koch et al. 1988; Teschemacher et al. 1997). Μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μπορεί να φτάσουν και σε διάφορα περιφερικά όργανα. Έτσι μετά από λήψη γαλακτοκομικών προϊόντων βρέθηκαν στο αίμα τόσο β-καζομορφίνες όσο και οι πρόδρομες ουσίες τους ενώ δεν ανιχνεύθηκαν πεπτιδία προερχόμενα από την α-καζεΐνη. Επιπλέον β-καζομορφίνες έχουν βρεθεί στο αίμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό θηλαζουσών μητέρων. Εικάζεται ότι οι καζομορφίνες αυτές παίζουν φυσιολογικό ρόλο στη αλληλοεπίδραση ορμονών και αυξητικών παραγόντων στο θηλάζοντα μαστό (Nedvidkova et al. 1985). Σε νεογνά βοειδών (Umbach et al. 1985) ή σκύλων (Singh et al. 1989) έχουν ταυτοποιηθεί πρόδρομες ουσίες ή αυτούσιες β-καζομορφίνες στον ορό, μετά από τη λήψη γάλακτος. Ανεύρεση των ουσιών αυτών στον εγκεφαλονωτιαίο υγρό ή στον εγκεφαλικό ιστό, έχει

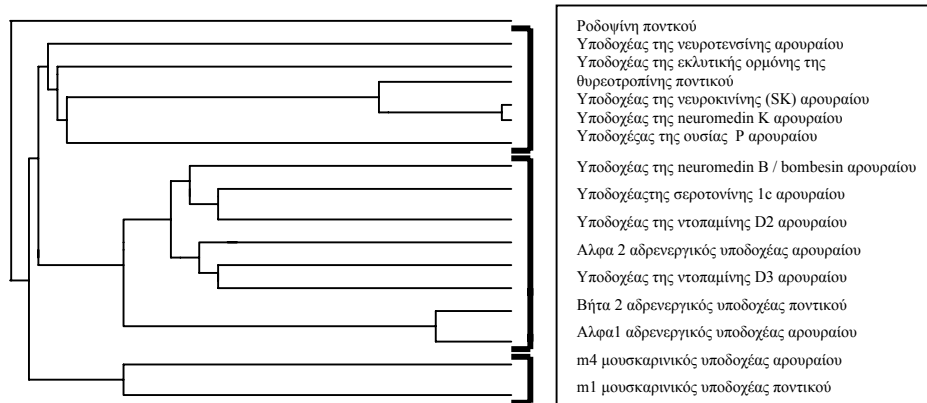
συσχετισθεί με το σύνδρομο αιφνιδίου νεογνικού θανάτου (Ramabadran and Moore 1988). Τέλος τόσο *in vitro* (Petrilli et al. 1984; Svedberg et al. 1985) όσο και *in vivo* (Meisel 1986) στον γαστρεντερικό σωλήνα έχουν ανιχνευθεί β-καζομορφίνες οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να διασχίζουν το γαστρεντερικό φραγμό προς το αίμα (Tome et al. 1987; Mahe et al. 1989; Nyberg et al. 1989; Ermisch 1992; Pasi et al. 1993) και θεωρούνται «τροφικές ορμόνες», ενώ έχουν σχέση και με την κινητικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα (Daniel et al. 1990).

### **Οπιοειδείς υποδοχείς**

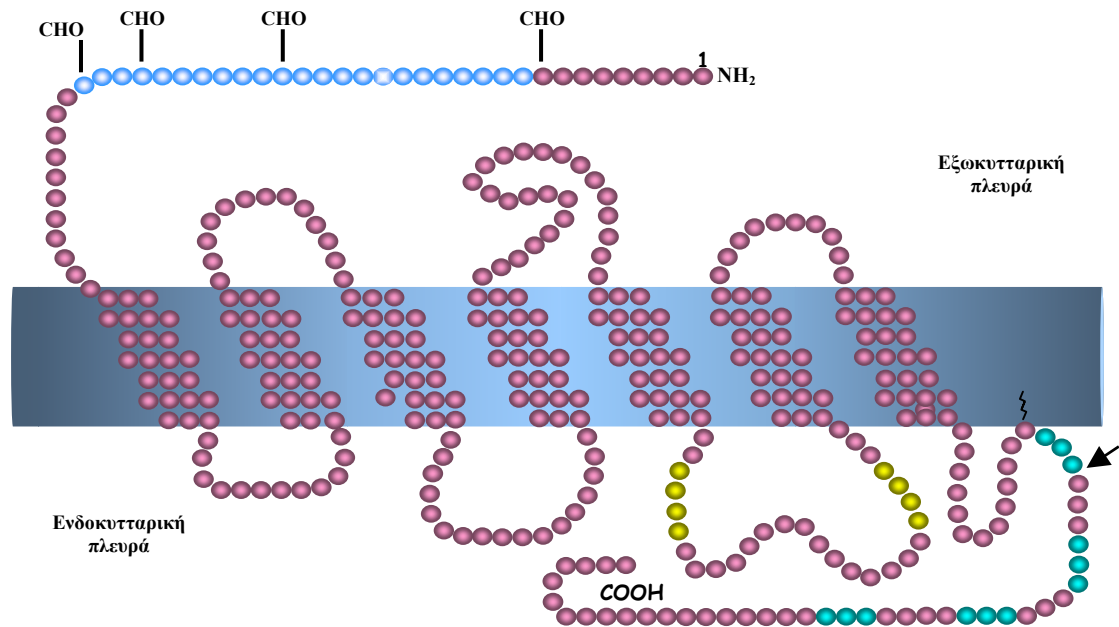
Οι μελέτες της δράσεως οπιούχων αλλά και των οπιοειδών πεπτιδίων οδήγησαν στην ανακάλυψη των οπιοειδών υποδοχέων το 1973. Αργότερα οι διαφορετικές δράσεις των οπιοειδών οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι οπιοειδείς αυτοί είναι ετερογενείς (Martin et al. 1976; Smith and Simon 1980) δηλαδή ότι υπάρχουν περισσότεροι από ένας υποδοχείς με διαφορετική συγγένεια για τα διάφορα οπιοειδή. Με την ανάπτυξη εκλεκτικών αγωνιστών και ανταγωνιστών (Πίνακας I) απεκαλύφθη ότι καθένας από τους υποδοχείς έχει μοναδικές φαρμακολογικές ιδιότητες (Goldstein and Naidu 1989). Η κατανομή των οπιοειδών υποδοχέων είναι ευρύτατη τόσο στο ΚΝΣ (Castanas et al. 1985) και στο περιφερικό νευρικό σύστημα (Atweh and Kuhar 1977a, b, c; Atweh and Kuhar 1983; Mansour et al. 1995) όσο και σε διάφορα όργανα.(π.χ. νεφροί) (Kapusta et al. 1989; Kapusta and Obih 1993; Kapusta 1995).

Πειράματα απομόνωσης και χαρακτηρισμού των οπιοειδών υποδοχέων αλλά και η κλωνοποίησή τους οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για διαμεμβρανικές (επτά διαμεμβρανικά τμήματα) υδρόφοβες πρωτεΐνες (Σχήμα-7B) με τρεις εξωκυττάρια και τρεις ενδοκυττάρια αγκύλες (loops), οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων που συζεύγνυται με G πρωτεΐνες ευαίσθητες στην τοξίνη του κοκκύτου (Chen et al. 1993; Kong et al. 1993; Yasuda et al. 1993). Το αμινοτελικό άκρο τους είναι εξωκυττάριο ενώ το καρβοξυτελικό ενδοκυττάριο (Strosberg 1991). Διακρίνονται σε 3 κύριους υπότυπους. Η αλληλουχία των αμινοξέων των υποτύπων παρουσιάζει 65% ομολογία ενώ το υπόλοιπο 35% στο οποίο διαφέρουν προσδίδει την εκλεκτικότητα σε κάθε υπότυπο (Reisine and Bell 1993). Τη μεγαλύτερη ομοιότητα παρουσιάζουν οι διαμεμβρανικές περιοχές και τα ενδοκυττάρια τμήματα.

A.



B.



**Σχήμα-7.** A. Ομολογία των υποδοχέων που ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων με επτά διαμεμβρανικά τμήματα B. Δομή των υποδοχέων της οικογένειας που αποτελούνται από επτά διαμεμβρανικά τμήματα και συζεύγνται με G πρωτεΐνες. ● CHO: πιθανές θέσεις γλυκοζυλίωσης. ● : Θέσεις αλληλεπίδρασης με G πρωτεΐνες ● : Θέσεις φωσφορυλίωσης από πρωτεϊνικές κινάσες,

Έτσι οι οπιοειδείς υποδοχείς διακρίνονται σε :

- Υποδοχείς **μυ** (**μ**), οι οποίοι πήραν το όνομα τους από την σύνδεσή τους με τη μορφίνη. Από τις ενδογενείς ουσίες καμία δεν συνδέεται με μεγάλη συγγένεια, μονολότι η β-ενδορφίνη παρουσιάζει την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα. Για πολλά χρόνια επικρατούσε η άποψη ότι οι μυ υποδοχείς ήταν ομοιογενείς. Παρ'ολ'αυτά κλινικά η δράση των μυ οπιοειδών δεν συμβάδιζε με έναν μόνο μηχανισμό δράσης. Ειδικότερα, ασθενείς οι οποίοι παρουσίαζαν ανοχή σε ένα μυ οπιοειδές θα έπρεπε να παρουσιάζουν την ίδια και σε ένα άλλο γεγονός το οποίο δεν συνέβαινε (Pasternak et al. 1980a). Στοιχεία όμως για την ύπαρξη 2 υποτύπων των μυ υποδοχέων προήλθαν από μελέτες δέσμευσης και τη χρήση διαφόρων ανταγωνιστών που έδειξαν δύο θέσεις σύνδεσης με διαφορετική συγγένεια και εκλεκτικότητα. Οι δύο οπιοειδείς ανταγωνιστές ναλοξοναζίνη (naloxonazine) και ναλοξαζόνη (naloxazone) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό σε  $\mu_1$  και  $\mu_2$  αντίστοιχα (Pasternak et al. 1980b). Μετά από κλωνοποίηση του μυ υποδοχέα (Chen et al. 1993; Wang et al. 1993) βρέθηκε ότι διαφορετικές μορφές του υποδοχέα μπορεί να προκύψουν από διαφορετικό μάτισμα το οποίο έχει ως αποτέλεσμα στην αλληλουχία των αμινοξέων στο ενδοκυττάριο τμήμα του ενώ η αλληλουχία των αμινοξέων στο διαμεμβρανικό τμήμα είναι πάντα η ίδια. Σημαντικό είναι ότι οι διαφορετικές αυτές μορφές σπάνια εκφράζονται όλες στο ίδιο κύτταρο ακόμα και όταν εκφράζονται στην ίδια περιοχή (Pasternak 2001). Η ύπαρξη των διαφορετικών μορφών δίνει μία πιθανή εξήγηση για τις διαφορές στη δράση της μορφίνης και γενικότερα των μυ οπιοειδών. Υπάρχει επίσης και ένας ακόμη υπότυπος του μυ υποδοχέα ο  $\mu_3$  με τον οποίο συνδέεται η μορφίνη και διάφορα αλκαλοειδή οπιοειδή αλλά παρουσιάζει μικρή ή και καθόλου συγγένεια για τα ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια η πεπτιδικά ανάλογα (Makman 1994). Από τις ενδογενείς οπιοειδείς ουσίες, η β-ενδορφίνη παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγγένεια για τους μυ υποδοχείς.

- Υποδοχείς **δέλτα** (**δ**). Η ανακάλυψη του δ υποδοχέα προέκυψε από διαφορές στη δράση φαρμάκων σε ιστούς που είχαν απομονωθεί *in vitro*. Η Λευκίνη-Εγκεφαλίνη και η Μεθειονίνη-Εγκεφαλίνη, συνδέονται με μεγάλη συγγένεια με τους δ υποδοχείς (Lord et al. 1977; Chang and Cuatrecasas 1979). Φαρμακολογικά δεδομένα δείχνουν ότι υπάρχουν δύο υπότυποι οι  $\delta_1$  και  $\delta_2$ . Ο  $\delta_1$  ενεργοποιείται από τον αγωνιστή DPDPE και μπλοκάρεται από τον ανταγωνιστή [Ala<sup>2</sup>-Leu<sup>5</sup>-Cys<sup>6</sup>]-εγκεφαλίνη ενώ ο



$\delta_2$  ενεργοποιείται από τον αγωνιστή DSLET και μπλοκάρεται από τον ανταγωνιστή naltridole-5- isothiocyanate. Παρ' ολ' αυτά οι  $\delta$  υπότυποι δεν έχουν κλωνοποιηθεί.

•Υποδοχείς **κάππα** ( $\kappa$ ). Συνδέονται με μεγάλη συγγένεια με την αιθυλκετοκυκλαζοσίνη από όπου και πήραν και το όνομά τους. Τρεις διαφορετικοί τύποι κάππα υποδοχέων έχουν χαρακτηριστεί στο ΚΝΣ και στο περιφερικό σύστημα: οι  $\kappa_1$  υποδοχείς με κύριο ενδογενές οπιοειδή πεπτίδιο τη Δυνορφίνη Α, και οι  $\kappa_2$ ,  $\kappa_3$  στους οποίους με μεγάλη συγγένεια συνδέονται η  $\beta$ -ενδορφίνη και το επταπεπτίδιο Μεθειονίνη -Εγκεφαλίνη-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>, αντίστοιχα (Castanas et al. 1984a; Castanas et al. 1984b; Wollemann et al. 1993). Παλαιότερα, από μελέτες δέσμησης της  $\beta$ -ενδορφίνης στον εγκέφαλο (Law et al. 1979; Johnson et al. 1982) όπου μέρος της δέσμησης της  $\beta$ -ενδορφίνης δεν πραγματοποιούταν μέσω των  $\mu$  ή των  $\delta$  υποδοχέων και πειράματα δέσμησης με το γενικό οπιοειδή ανταγωνιστή [<sup>3</sup>H] διπρενορφίνη (Chang et al. 1981) όπου το 27% της ειδικής δέσμησης της [<sup>3</sup>H] διπρενορφίνης δεν αναστελλόταν από την παρουσία του DADLE ή της μορφισεπτίνης που μπλοκάρουν τους  $\delta$  και  $\mu$  οπιοειδείς υποδοχείς, είχε θεωρηθεί η ύπαρξη μιας τέταρτης κατηγορίας οπιοειδών υποδοχέων, οι έψιλον ( $\epsilon$ ) οι οποίοι όμως αποδείχτηκαν φαρμακολογικά ταυτόσημοι με τους  $\kappa_2$ .

**Πίνακας Ι.** Οι υπότυποι των οπιοειδών υποδοχέων και οι διάφοροι εκλεκτικοί τους οπιοειδείς αγωνιστές.

Τύπος υποδοχέα	Υπότυποι	Αγωνιστές	Ενδογενείς αγωνιστές
<b>Μι</b>	$\mu_1, \mu_2, \mu_3$	DAMGO	Met <sup>5</sup> -Εγκεφαλίνη
		Μορφίνη	Ενδορφίνη
		Δερμορφίνη	
<b>Κάππα</b>	$\kappa_1, \kappa_2, \kappa_3$	U69593	Δυνορφίνη Α
		U50488	Ενδορφίνη
		Κετοκυκλαζοσίνη	
<b>Δέλτα</b>	$\delta_1, \delta_2$	DPDPE	Met <sup>5</sup> -Εγκεφαλίνη
		Δελτορφίνη	Leu <sup>5</sup> -Εγκεφαλίνη
		DSLET	$\beta$ -ενδορφίνη

Τέλος, στην κατηγορία των οπιοειδών υποδοχέων ανήκει και ένα ακόμη υποδοχέας ο οποίος έχει κλωνοποιηθεί ο ORL<sub>1</sub> (opioid receptor-like protein 1) (Bunzow et al. 1994; Nishi et al. 1994; Fukuda et al. 1994; Halford et al. 1995). Παρουσιάζει 50-60% ομολογία με τους κ, μ, δ οπιοειδείς υποδοχείς. Είναι διαμεμβρανικός υποδοχέας που συνδέεται με G πρωτεΐνες και ανταποκρίνεται στο πεπτιδίο orphanin FQ ή nociceptin (Meunier et al. 1995). Σημαντική διαφορά του ORL<sub>1</sub> σε σχέση με τους υπόλοιπους είναι ότι προκαλεί υπεραλγησία (Reinscheid et al. 1995) η οποία δεν επηρεάζεται από τη δράση του οπιοειδή ανταγωνιστή διπρενορφίνη (Rossi et al. 1997). Ο ORL<sub>1</sub> κωδικοποιείται από το ίδιο γονίδιο που κωδικοποιεί τον κ<sub>3</sub> και πιθανώς πρόκειται για αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος του ίδιου γονιδίου (Meunier 1997).

Οι οπιοειδείς υποδοχείς όπως προαναφέρθηκε συζεύγνυνται με G πρωτεΐνες και η δράση τους εξαρτάται από τη δράση αυτών των πρωτεϊνών. Οι G πρωτεΐνες αποτελούνται από τρεις υπομονάδες την α, τη β και τη γ. Μελέτες έως τώρα έχουν δείξει την ύπαρξη 18 διαφορετικών α υπομονάδων, 5 β και 7 γ (Rens-Domiano and Hamm 1995). Ανεξάρτητα ποιες 3 υπομονάδες συμμετέχουν στη δημιουργία της G πρωτεΐνης η σύνδεση ενός αγωνιστή σε οπιοειδή υποδοχέα προκαλεί την αποδέσμευση GDP από την α υπομονάδα και ακολουθεί η δέσμευση ενός GTP (Hamm 1998). Η δέσμευση αυτή προκαλεί το διαχωρισμό των τριών υπομονάδων σε α- GTP και β-γ. Τόσο η α- GTP όσο και η β-γ υπομονάδες ενεργοποιούν ενδοκυττάρια μηνύματα όπως το cAMP, τα ιόντα αβεστίου, καλίου και νατρίου, την τριφωσφορική ινοσιτόλη και τις πρωτεϊνικές κινάσες. Η δράση των G πρωτεϊνών σταματά όταν με την ενδογενή GTP-άση δραστηριότητα της α υπομονάδας γίνει υδρόλυση του δεσμευμένου GTP σε GDP και ανόργανο φώσφορο και η α-GDP πλέον επανασυνδεθεί με τις β-γ υπομονάδες.

Ως σύστημα δεύτερου αγγελιοφόρου σημαντικό ρόλο παίζουν οι αδενυλικές κυκλάσες, μία οικογένεια ενζύμων που μετατρέπουν το ATP σε cAMP. Το cAMP ενεργοποιεί μια σειρά από πρωτεϊνικές κινάσες οι οποίες ελέγχουν πολλές διαφορετικές διεργασίες από τον μεταβολισμό έως τη μεταγραφή γονιδίων μέσω της φωσφορυλίωσης (Tang and Gilman 1992). Μέσω των οπιοειδών υποδοχέων (μ, δ, κ) προκαλείται αναστολή της συγκέντρωσης του cAMP (Law et al. 1983; Kazmi and Mishra 1987; Lawrence and Bidlack 1993; Cheng et al. 1995). Και οι τρεις υποδοχείς συνδέονται με διαύλους Ca<sup>2+</sup> και K<sup>+</sup> (North 1993). Επίσης η αλληλεπίδρασή τους με

τις φωσφολιπάσες C οι οποίες συμμετέχουν στην ανακύκλωση της φωσφατιδυλοinositolής καθώς και η πρωτεϊνική φωσφορυλίωση ίσως εμπλέκονται ως δεύτεροι αγγελιοφόροι στην λειτουργία ενός οπιοειδούς υποδοχέα (Childers 1991).

### **Σχέση οπιοειδών και καρκίνου**

Παρόλο που ο ρόλος του ενδογενούς οπιεργικού συστήματος είναι αρκετά καλά τεκμηριωμένος σε διάφορες λειτουργίες του οργανισμού, όπως η αίσθηση του πόνου, η ψυχική διάθεση και το φαινόμενο της ανταμοιβής, καθώς και στην τροποποίηση διαφόρων κυτταρικών λειτουργιών όπως η νευροενδοκρινική έκκριση και η τροποποίηση του ανοσολογικού συστήματος, λίγα είναι γνωστά για τη συμμετοχή του στο φαινόμενο της κακοήθους εξαλλαγής. Οι πρώτες μελέτες που συσχέτιζαν την καρκινογένεση και το οπιεργικό σύστημα πραγματοποιήθηκαν από τους Aylsworth et al. (1979) όπου η χημική καρκινογένεση σε ποντίκια αναστέλλονταν ή επιβραδυνόταν από ουσίες που παρεμπόδιζαν τη σύνδεση των οπιοειδών με τους υποδοχείς τους. Αργότερα, βρέθηκε ότι μετασχευόμενοι όγκοι σε αρουραίους επηρεάζονταν από την παρουσία ενδογενών οπιοειδών πεπτιδίων τα οποία ελάττωναν την διάρκεια επιβίωσης των κατασταλτικών κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος. Η δράση αυτή των οπιοειδών αναστελλόταν από την παρουσία οπιοειδών ανταγωνιστών (Lewis et al. 1983). Μετέπειτα μελέτες, απέδειξαν όμως ότι η δράση τους προερχόταν από τη τροποποιητική τους δράση στο επίπεδο του κεντρικού νευρικού συστήματος (Shavit et al. 1986). Οπιοειδή πεπτίδια ή/και οπιοειδείς υποδοχείς έχουν βρεθεί τόσο σε όγκους του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος όσο και σε όγκους μη νευρικής προέλευσης όπως στο μαστό, στις ωοθήκες, στη μήτρα, στο στομάχι, στο ήπαρ. (Castanas et al. 1984; Castanas et al. 1984; Bostwick et al. 1987; Zagon et al. 1987). Τα οπιοειδή πεπτίδια παρουσιάζουν ανασταλτική δράση μειώνοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τόσο σε in vivo όσο και σε in vitro συστήματα κατά δόσοεξαρτώμενο και αναστρέψιμο τρόπο (Plyinsky et al. 1987; Kikuchi et al. 1987a; Maneckjee et al. 1990a).

Από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω είναι φανερό ότι τα οπιοειδή και οι υποδοχείς τους εμπλέκονται στο φαινόμενο της καρκινογένεσης χωρίς όμως ο ρόλος τους να είναι ξεκάθαρος, ενώ δεν υπάρχουν δεδομένα για τη σχέση τους με τον προστατικό καρκίνο.

## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ

Ιστολογικά ο καρκίνος του προστάτου είναι πολύ πιο συχνός από την κλινικά διαγνωσθείσα νόσο. Μόνο το 1-2 % των ιστολογικά ανιχνεύσιμων περιπτώσεων θα εξελιχθεί κλινικά (Boring et al. 1991). Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι στον προστατικό αδένα υπάρχουν παράγοντες που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Στον προστάτη έχουν ανιχνευθεί μία σειρά από νευροπεπτίδια συμπεριλαμβανομένου και των οπιοειδών για τα οποία υπάρχουν ενδείξεις ότι επηρεάζουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων τόσο του φυσιολογικού όσο και του καρκινικού ιστού. Η δράση των οπιοειδών σε διάφορα συστήματα είναι κατά κύριο λόγο κατασταλτική. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων μαστού (Hatzoglou et al. 1996c) και πνεύμονα (Maneckjee et al. 1990b) ενώ δεν υπάρχουν στοιχεία για τη σχέση οπιεργικού συστήματος και προστατικού καρκίνου.

Ο καρκίνος του προστάτου αποτελεί μία από τις συχνότερες νεοπλαστικές παθήσεις στον άντρα. Πρόκειται για έναν ορμονοεξαρτώμενο όγκο, σε αναλογία με τον καρκίνο του μαστού στις γυναίκες, με σαφή ευνοϊκή ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία. Η μη προυπάρχουσα γνώση, σε συνδυασμό με την αναλογία του προστάτου με τον μαστό ως προς την ορμονοευαισθησία σε στεροειδείς ορμόνες μας έδωσε το έναυσμα για την πραγματοποίηση της παρούσης διατριβής με στόχο τη διερεύνηση:

- της πιθανής δράσεως των οπιοειδών στον καρκίνο του προστάτου
- του ρόλου των τροφικά προερχόμενων οπιοειδών (καζομορφινών)
- πιθανών νέων πηγών οπιοειδών και
- του τρόπου δράσεως των οπιοειδών στον προστάτη,

και με σκοπό τη μελέτη της φυσιολογίας και παθοφυσιολογίας του προστατικού αδένα και τη νέα φαρμακευτική προσέγγιση της νόσου συμπεριλαμβανομένης και της εξατομίκευσης της θεραπείας.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες κυτταρικές σειρές:

α) **DU-145**

Η κυτταρική σειρά DU-145 προέρχεται από εγκεφαλική μετάσταση αδενοκαρκινώματος του προστάτου (Stone et al. 1978). Ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων σε καλλιέργεια είναι 34 ώρες. Καρυοτυπική ανάλυσή τους παρουσιάζει ανευπλοειδία με 64 χρωμοσώματα. Είναι μια ορμονοάντοχη καρκινική κυτταρική σειρά, τα κύτταρα δεν εκφράζουν υποδοχείς ανδρογόνων και έτσι δεν ανταποκρίνονται στα ανδρογόνα. Παράγουν και εκκρίνουν EGF και TGF- $\alpha$  και έχουν υποδοχείς EGF. Ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων είναι καθοριστική για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων *in vitro*. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων είναι ευαίσθητος στον ενδογενώς παραγόμενο EGF και λιγότερο στον εξωγενή. (Connolly and Rose 1989). Επιπλέον στο θρεπτικό των DU-145 κυττάρων μετά από καλλιέργεια έχει βρεθεί και ο αυξητικός παράγοντας IGF-II με αυτοκρινή δράση. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων DU-145 ενεργοποιείται από τον IGF-I (Iwamura et al. 1993) την ιντερλευκίνη 6 (Siegall et al. 1990) και τον bFGF (Nakamoto et al. 1992).

β) **PC3**

Πρόκειται για μία κυτταρική σειρά η οποία προέρχεται από μετάσταση προστατικού αδενοκαρκινώματος στο μυελό των οστών και παρουσιάζει χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης (Kaighn et al. 1979). Σε καλλιέργεια ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι 33 ώρες. Σε αθυμικά ποντίκια τα κύτταρα PC3 έχουν τη ικανότητα να προκαλούν τη δημιουργία μεταστατικών όγκων. Τα κύτταρα παρουσιάζουν ανευπλοειδία με 60 χρωμοσώματα ενώ πάντα απουσιάζουν τα χρωμοσώματα 2, 3, 5, 15 και Y. Δεν ανταποκρίνονται στη δράση των ανδρογόνων, παρόλο που εκφράζουν υποδοχείς ανδρογόνων οι οποίοι όμως έχουν χάσει την λειτουργικότητά τους (Yuan et al. 1993). Τα κύτταρα PC3 εκκρίνουν τους εξής αυξητικούς παράγοντες: EGF, TGF- $\alpha$ , IGF-I, PDGF1 και 2 (Sitaras et al. 1988), bFGF (Nakamoto et al. 1992) και GM-CSF, ενώ έχουν υποδοχείς EGF (Ching et al. 1993) και IGF I.

### γ) LNCaP

Η κυτταρική σειρά προέρχεται από μετάσταση προστατικού αδενοκαρκινώματος στους λεμφαδένες (Horoszewicz et al. 1983). Σε καλλιέργεια ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι 60-72 ώρες και παρουσιάζουν ανευπλοειδία με αριθμό χρωμοσωμάτων που ποικίλει από 76 έως 91. Πρόκειται για μία ορμονοευαίσθητη καρκινική σειρά του προστάτου. Ανταποκρίνεται στα ανδρογόνα με επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Horoszewicz et al. 1983). Στο τμήμα του ανδρογονικού υποδοχέα που συνδέεται με τα ανδρογόνα παρατηρείται μετάλλαξη του αμινοξέος αλανίνη αντί της θρεονίνης<sup>877</sup> (Veldscholte et al. 1990; Kokontis et al. 1991; Veldscholte et al. 1992b) που έχει ως αποτέλεσμα και τα αντιαδρόγονα να επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ο υποδοχέας να συνδέεται και με τα οιστρογόνα και την προγεστερόνη. Ένα χαρακτηριστικό των κυττάρων LNCaP είναι ότι πρόκειται για καλά διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία παράγουν ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA) και αλκαλική φωσφατάση. Επίσης παράγουν και εκκρίνουν EGF, εκφράζουν υποδοχείς EGF και ανταποκρίνονται στη μιτογόνο δράση του (Connolly and Rose 1991; Hofer et al. 1991; Ching et al. 1993).

## ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών

#### Υλικά-Συσκευές

Κυτταρική σειρά PC3 (ECACC 90112714 UK)

Κυτταρική σειρά DU-145 (ACC 261 DSMZ Germany)

Κυτταρική σειρά LNCaP (ACC 256 DSMZ Germany)

RPMI 1640 Medium (Gibco -BRL Life Technologies, UK)

Dulbecco's Modified eagle medium: DMEM (Gibco -BRL Life Technologies, UK)

Ορός εμβρύου βοός: FBS (Gibco -BRL Life Technologies, UK)

Διάλυμα τρυψίνης- EDTA (Gibco -BRL Life Technologies, UK)

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Sigma, USA)

Χρωστική Trypan-blue (Seromed Biochrom, Germany)

**Φιάσκες καλλιέργειών (Corning & Costar, USA)**

DMSO (Sigma, USA)

Μικροσκόπιο ορατού φωτός (Olympus, Japan)

Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή Malassez

Διάλυμα 5N NaOH (Merck, Germany)

Μέθοδος

Τα κύτταρα DU-145, LNCaP και PC3 καλλιεργήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37 °C και σε υγρή ατμόσφαιρα 5%CO<sub>2</sub>/95% αέρα. Το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας περιείχε RPMI για τα κύτταρα DU-145 και LNCaP και DMEM για τα κύτταρα PC3, 10% FBS και το pH του ήταν ρυθμισμένο στο 7,4. Το υλικό των καλλιιεργειών ανανεωνόταν κάθε 48 ώρες. Όταν η καλλιέργεια των κυττάρων κάλυπτε περίπου το 80-90% της επιφάνειας της φλάσκας καλλιιεργειών εκπλένονταν με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα και στη συνέχεια εκτίθεντο σε διάλυμα θρυψίνης- EDTA για 10 περίπου λεπτά. Στο τελευταίο διάλυμα προστίθεντο θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα ανακινόνταν προκειμένου να επιτευχθεί πλήρως η αποκόλληση από το πλαστικό καλλιέργειας. Μικρή ποσότητα του παραπάνω διαλύματος ελαμβάνετο για τον προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων. Ο προσδιορισμός πραγματοποιούνταν με άμεση μέτρηση σε πλάκα Malassez και τη βοήθεια μικροσκοπίου ορατού φωτός, σε μεγέθυνση 40x. Όλα ή μέρος των κυττάρων στην κατάλληλη συγκέντρωση τοποθετούνταν σε διάφορα πλαστικά δοχεία καλλιιεργειών ανάλογα με τις ανάγκες των πειραμάτων.

Τα κύτταρα καταψύχονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα έτσι ώστε να διατηρούνται σε χαμηλό αριθμό γενεών και τα πειράματα να πραγματοποιούνται στον ίδιο περίπου αριθμό γενεών. Συγκεκριμένα  $5 \times 10^6$  κύτταρα τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια βαθιάς κατάψυξης και τους προστίθετο σταγόνα-σταγόνα υπό συνεχή ανάδευση 1 ml υλικού παγώματος, το οποίο περιείχε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας, ορό εμβρύου βοός και DMSO σε αναλογία 70:20:10. Στη συνέχεια τοποθετούνταν στους -80°C και μετά από μερικές μέρες σε υγρό άζωτο. Η διαδικασία της βαθιάς κατάψυξης των κυττάρων είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί σταδιακά ώστε να επιτευχθεί διατήρηση της ακεραιότητάς τους. Αντίθετα, η απόψυξη των κυττάρων πρέπει να είναι γρήγορη. Έτσι τα παγωμένα κύτταρα θερμαινόταν στους 37 °C και τοποθετούνταν σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας στην ίδια θερμοκρασία. Ακολουθούσε φυγοκέντρωση σε 1200 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 10 λεπτά ενώ στη συνέχεια τα κύτταρα τοποθετούνταν σε καλλιέργεια όπως παραπάνω.



## 2. Μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων με την τεχνική του μεταβολισμού του MTT

### Υλικά – Συσκευές

Πλάκες καλλιέργειας 24 οπών (Corning & Costar, USA)  
MTT thiazol blue [3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma USA)  
Προπανόλη 1 (Lab-Scan Analytical Sciences, Ireland)  
RPMI 1640 Medium (Gibco - Life Technologies, UK)  
Φωτόμετρο ELISA (Anthos Reader 2001)

### Διαλύματα

Διάλυμα MTT σε RPMI 5mg/ml: Το MTT διαλύθηκε σε RPMI και διηθήθηκε έτσι ώστε να αποστειρωθεί.

### Μέθοδος

Πρόκειται για μία μέθοδο (Denizot and Lang 1986) η οποία βασίζεται στην ικανότητα των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων να μεταβολίζουν το άλας του τετραζολίου. Διάφορες αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων μετατρέπουν έτσι το κίτρινο χρώμα του τετραζολίου σε μπλε κρυστάλλους οι οποίοι μετά τη διάλυσή τους δίνουν ένα μπλε-μωβ χρώμα το οποίο εύκολα μετράται σε ένα φωτόμετρο ELISA. Η συγκέντρωση των κρυστάλλων και άρα και η ένταση του χρώματος είναι ευθέως ανάλογη της μεταβολικής δραστηριότητας και συνεπώς του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Με τη μέθοδο λοιπόν αυτή γίνεται προσδιορισμός του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων καθώς και της κυτταροτοξικότητας διαφόρων ουσιών.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24 οπών και την ημέρα της μέτρησης αφαιρέθηκε το θρεπτικό καλλιέργειας και προστέθηκαν σε κάθε οπή 0,5 ml διάλυμα MTT σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml και οι πλάκες τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) για 3 ώρες. Κατά τη διάρκεια της επώασης σχηματίζονται μπλέ κρύσταλλοι μόνο στα ζωντανά κύτταρα. Μετά το τέλος της επώασης σε κάθε οπή προστέθηκαν 0,5 ml προπανόλη-1, και αναδεύτηκαν καλά ώστε να διαλυθούν όλοι οι κρύσταλλοι που είχαν σχηματιστεί. 200μl από κάθε οπή μεταφέρθηκε σε μικροκυψελίδα επίπεδου πυθμένα για να πραγματοποιηθεί μέτρηση του χρώματος σε φωτόμετρο ELISA σε μήκος κύματος 595nm. Η μέτρηση πρέπει να γίνει μέσα σε διάστημα 1 ώρας από την στιγμή πρόσθεσης της προπανόλης-1, διάστημα κατά το οποίο το χρώμα παραμένει σταθερό.

### 3. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

#### Υλικά και συσκευές

Αλβουμίνη ορού βοός (BSA) (Sigma, USA)  
Διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250: Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad Life Technologies, USA)  
Μικροπλάκες ELISA επίπεδου πυθμένα (Corning & Costar, USA)  
Φωτόμετρο ELISA (Anthos Reader 2001)

#### Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα (διαφέρει ανάλογα με το πείραμα)  
Διάλυμα αλβουμίνης βοός (200μg/ml)

#### Μέθοδος

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

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

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

Τα αποτελέσματα με βάση την πρότυπη καμπύλη εκφράζονται σε μg/ml.

#### 4. Μελέτες δέσμευσης για την ανίχνευση υποδοχέων

Οι μελέτες δέσμευσης αποτελούν πειραματική διαδικασία στην οποία γίνεται χρήση μιας ραδιοσημασμένης ουσίας έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί μέτρηση και χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασής της με διάφορους υποδοχείς. Βασίζονται στο νόμο δράσεως των μαζών (Mass action law) σύμφωνα με τον οποίο α) δέσμευση συμβαίνει όταν η ουσία και ο υποδοχέας έρχονται σε επαφή λόγω διάχυσης και οι ουσίες έχουν το σωστό προσανατολισμό και αρκετή ενέργεια. β) Από τη στιγμή που θα πραγματοποιηθεί δέσμευση, η ουσία και ο υποδοχέας παραμένουν δεσμευμένοι για χρονικό διάστημα που επηρεάζεται από τη συγγένεια του υποδοχέα για την ουσία και αντίστροφα. Μετά την αποδέσμευσή τους και οι δύο είναι όπως πριν από τη δέσμευση. γ) Ισορροπία επιτυγχάνεται όταν ο ρυθμός με τον οποίο νέα σύμπλοκα υποδοχέα-ουσία δημιουργούνται ισούται με τον αριθμό των συμπλόκων που αποδεσμεύονται. Η σταθερά αποδέσμευσης ( $K_D$ ) αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση της ουσίας η οποία καταλαμβάνει το μισό αριθμό υποδοχέων σε ισορροπία. Χαμηλό  $K_D$  σημαίνει ότι ο υποδοχέας έχει υψηλή συγγένεια για την ουσία και αντίστροφα (Boeynaems 1984; Munson and Rodbard 1984).

#### A. Ανίχνευση, ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός οπιοειδών υποδοχέων στις καρκινικές σειρές του προστάτου.

*Μελέτη των ιδιοτήτων των οπιοειδών υποδοχέων σε ολόκληρα κύτταρα.- Μελέτες δέσμευσης (κορεσμού)*

Με τα πειράματα δέσμευσης- κορεσμού επιτυγχάνεται μέτρηση της δέσμευσης σε ισορροπία διαφόρων συγκεντρώσεων της ραδιοσημασμένης ουσίας για να υπολογιστεί ο αριθμός των υποδοχέων και η χημική συγγένεια ( $K_D$ ). Τα πειράματα δέσμευσης σε ολόκληρα κύτταρα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις μελέτες των (Hatzoglou et al. 1995a).

#### Υλικά –Συσκευές

Πλάκες καλλιέργειών στείρες 6 οπών (Corning & Costar, USA)

Γλυκίνη (Gibco-BRL Life Technologies, UK)

Καυστικό νάτριο NaOH (Merck, Germany)

[<sup>3</sup>H] EKC (21,1 Ci/mmol DuPont NEN, USA)

[<sup>3</sup>H] διπρενορφίνη (39 Ci/mmol Amersham Pharmacia, UK)

[<sup>3</sup>H] DAGO (60 Ci/mmol Amersham Pharmacia, UK)

[<sup>3</sup>H] DPDPE (28 Ci/mmol DuPont NEN, USA)  
DADLE (Sigma, Germany) EKC (Sterling – Winthrop USA)  
Διπρενορφίνη (Sterling – Winthrop USA)  
Σωληνάκια πλαστικά, υγρού σπινθηρισμού (Kartell, Italy)  
Υγρό σπινθηρισμού (Sigma, USA)  
Αναδευτήρας R100 Rotatest shaker (Luckham, UK)  
Μετρητής β-ακτινοβολίας TRI-CARB 4000 Series απόδοσης 60% στο [<sup>3</sup>H] (Packard, USA)

#### Διαλύματα

Διάλυμα οξינוποίησης: Γλυκίνη 50mM pH 3.0  
Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS  
Διάλυμα NaOH 2N

#### Μέθοδος

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε κυψελίδες 6 οπών με επίπεδο πυθμένα. Την ημέρα του πειράματος έγινε έκπλυση των κυττάρων δύο φορές με 2 ml PBS, επώαση με 0,5 ml διάλυμα οξינוποίησης στους 4°C για 3 λεπτά και έκπλυση δύο φορές με 3ml PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις, από 0,5-5 nM, διαφορετικών τριτωμένων οπιοειδών αγωνιστών σε τελικό όγκο 0,4 ml ανά αντίδραση, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε και επώαση κυττάρων με τα ραδιενεργά ανάλογα παρουσία 5μM μη ραδιενεργού αναλόγου, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Στο τέλος της επώασης, απομακρύνθηκε το διάλυμα της αντίδρασης και πραγματοποιήθηκε έκπλυση των κυττάρων δύο φορές με 2 ml παγωμένο διάλυμα PBS. Οι δεσμευμένοι στους υποδοχείς, οπιοειδείς αγωνιστές συλλέχθηκαν με 0,5 ml διάλυμα NaOH 2N στο οποίο προστέθηκαν 3 ml υγρό σπινθηρισμού και μετρήθηκε σε μετρητή β-ακτινοβολίας για 2 λεπτά.

*Μελέτη των ιδιοτήτων των οπιοειδών υποδοχέων σε μεμβρανικά παρασκευάσματα κυττάρων LNCaP.- Μελέτες δέσμησης (κορεσμού).*

#### Υλικά –Συσκευές

Γλυκίνη (Gibco-BRL Life Technologies, UK)  
 $[^3\text{H}]$  EKC (21,1 Ci/mmol DuPont NEN, USA)  
 $[^3\text{H}]$  διπρενορφίνη (39 Ci/mmol Amersham Pharmacia, UK)  
 $[^3\text{H}]$  DAGO (60 Ci/mmol Amersham Pharmacia, UK)  
 $[^3\text{H}]$  DPDPE (28 Ci/mmol DuPont NEN, USA)  
 DADLE Sigma, Germany)  
 EKC (Sterling –Winthrop USA)  
 Διπρενορφίνη (Sterling –Winthrop USA)  
 Κυτταρικοί « Ξύστες» Cell scrapers (Corning &Costar, USA)  
 Trizma base (Merck Germany)  
 Απρωτινίνη (Sigma USA)  
 PMSF (Sigma, USA)  
 PEI 50% w/v aqueous solution (Sigma, USA)  
 Φίλτρα ιών υάλου, GF/B 25mm (Whatman, England)  
 Σωληνάκια πολυστυρενίου 12x75mm  
 Συσκευή διήθησης (Millipore, USA)  
 Ψυχόμενη φυγόκεντρος Sorvall RC-28S (Du Pont Instruments, USA)  
 Υγρό σπινθηρισμού (Sigma, USA)  
 Σωληνάκια πλαστικά, υγρού σπινθηρισμού (Kartell, Italy)  
 Μετρητής β-ακτινοβολίας TRI-CARB 4000 Series απόδοσης 60% στο  $[^3\text{H}]$  (Packard, USA)

#### Διαλύματα

Διάλυμα οξינוποίησης: Γλυκίνη 50mM pH 3.0  
 Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS  
 Διάλυμα NaOH 2N  
 Ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH 7,4: Trizma base 50mM, 1mM PMSF, Απρωτινίνη 0,5μg/ml.

#### Μέθοδος

##### *Παρασκευή μεμβρανών*

Τα κύτταρα αποξέστηκαν από τις φλάσκες καλλιέργειών συλλέχθηκαν με το διάλυμα Tris και ομογενοποιήθηκαν. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε 800 x g για 10 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε για 1 ώρα σε 45000 x g στους 4 °C. Το ίζημα της φυγοκέντρωσης ομογενοποιήθηκε και οξינוποιήθηκε με ½ όγκο διαλύματος οξינוποίησης για 3 λεπτά στους 4 °C. Η οξינוποίηση έγινε έτσι ώστε τυχόν ενδογενής δέσμηση ουσιών στους υποδοχείς να ανασταλεί ώστε να μπορέσουμε να μετρήσουμε τον ολικό αριθμό υποδοχέων (Hatzoglou et al. 1994). Στο μείγμα προστέθηκαν 10 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος Tris και φυγοκεντρήθηκε ξανά για 1 ώρα σε 45000 x g στους 4 °C. Το ίζημα της φυγοκέντρωσης

ομογενοποιήθηκε εκ νέου σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Οι μελέτες δέσμευσης πραγματοποιήθηκαν αμέσως μετά τη παρασκευή των μεμβρανών.

#### *Μελέτες δέσμευσης*

Οι μελέτες δέσμευσης σε μεμβρανικά παρασκευάσματα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε από τους Castanas et al. (1985a). Σε σωληνάρια πολυπροπυλενίου τοποθετήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις από 0,5-5nM, διαφορετικών τριτωμένων οπιοειδών αγωνιστών, ρυθμιστικό διάλυμα και εναιώρημα μεμβρανών (τελική συγκέντρωση 0,4 mg/ml) σε τελικό όγκο 0,25 ml. Το όλο μείγμα επώαστηκε για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή σε 37°C για 30 λεπτά, υπό ήπια ανάδευση. Για τον υπολογισμό της μη ειδικής δέσμευσης πραγματοποιήθηκε παράλληλα επώαση εναιωρήματος μεμβρανών και ραδιοσημασμένων οπιοειδών αγωνιστών με 5μM μη ραδιοσημασμένων οπιοειδών αγωνιστών. Κατά τη διάρκεια της επώασης φίλτρα ιών υάλου εμποτίστηκαν με 0,1% w/v PEI για 60 λεπτά. Οι δεσμευμένοι στους υποδοχείς οπιοειδείς αγωνιστές διαχωρίστηκαν από τους ελεύθερους με διήθηση σε φίλτρα ιών υάλου στη συσκευή της Millipore με τη βοήθεια κενού. Τα φίλτρα εκπλύθηκαν με παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα τρεις φορές, προστέθηκαν σε υγρό σπινθηρισμού και μετρήθηκαν σε μετρητή β-ακτινοβολίας για 2 λεπτά.

Ανίχνευση τύπων και υποτύπων των οπιοειδών υποδοχέων

Για να γίνει ανίχνευση των διαφόρων τύπων και υποτύπων των οπιοειδών υποδοχέων στις μελέτες δέσμησης-κορεσμού, είτε σε ολόκληρα κύτταρα είτε σε μεμβρανικά κυτταρικά παρασκευάσματα χρησιμοποιήθηκαν ραδιενεργά ανάλογα για τους διάφορους οπιοειδείς υποδοχείς. Στις περιπτώσεις όμως όπου το ραδιενεργό ανάλογο δεν δεσμευόταν σε έναν μόνο τύπο υποδοχέα, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν παρουσία περίσσειας συγκέντρωσης μη ραδιενεργών οπιοειδών σε διάφορους συνδυασμούς (Castanas et al. 1985a,b), όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί, έτσι ώστε να καλύπτουν το σύνολο των διαφορετικών οπιοειδών υποδοχέων επιτρέποντας τη δέσμηση του ραδιενεργού οπιοειδούς αγωνιστή-ανταγωνιστή σε συγκεκριμένους υπότυπους.

**ΠΙΝΑΚΑΣ II.** Οι οπιοειδείς αγωνιστές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των διαφόρων τύπων και υποτύπων των οπιοειδών υποδοχέων.

Ραδιενεργό ανάλογο	Μη ραδιενεργός οπιοειδής αγωνιστής	Υποδοχείς που ανιχνεύονται
[ <sup>3</sup> H]-EKC		δ, μ, κ <sub>1</sub> , κ <sub>2</sub>
[ <sup>3</sup> H]-EKC +	DADLE	κ <sub>1</sub>
[ <sup>3</sup> H]-Διπρενορφίνη		δ, μ, κ <sub>2</sub> , κ <sub>3</sub>
[ <sup>3</sup> H]-Διπρενορφίνη +	DADLE	κ <sub>3</sub>
[ <sup>3</sup> H]-DAGO		μ
[ <sup>3</sup> H]-DPDPE		δ

Ανάλυση αποτελεσμάτων

Στα πειράματα δέσμησης (κορεσμού) γίνεται η παραδοχή ότι στο τέλος της επώασης επικρατεί ισορροπία, οπότε και ισχύει η αντίδραση:



[R]: Συγκέντρωση υποδοχέων πριν την αντίδραση (μή δεσμευμένοι)

[L]: Συγκέντρωση της ραδιοσημασμένης ουσίας (αγωνιστής ή ανταγωνιστής) πριν την αντίδραση

[RL]: Συγκέντρωση συμπλόκου υποδοχέα – ραδιοσημασμένης ουσίας

Σύμφωνα με την παραπάνω αντίδραση (1) η σταθερά διάστασης της αντίδρασης σε κατάσταση ισορροπίας ( $K_D$ ) δίνεται από τον τύπο:

$$K_D = \frac{[R] * [L]}{[RL]} \quad (2)$$

Η σταθερά διάστασης  $K_D$  εκφράζεται σε moles/lit και είναι η συγκέντρωση της ραδιοσημασμένης ουσίας η οποία δεσμεύεται με τους μισούς από τους συνολικούς υποδοχείς. Το σύνολο των υποδοχέων  $[R_T]$  σύμφωνα με την εξίσωση (1) είναι  $[R]+[RL]$ .

Για την εύρεση του  $K_D$  και το συνολικό αριθμό των υποδοχέων πραγματοποιείται η ανάλυση των αποτελεσμάτων κατά Scatchard, σύμφωνα με την οποία η εξίσωση (2) μετατρέπεται σε:

$$\frac{[RL]}{[R]} = - \frac{[RL]}{K_d} + \frac{[R_T]}{K_d} \quad (3)$$

και εάν  $B: [RL]$ ,  $F: [R]$  και  $B_{max}: [R_T]$  τότε η εξίσωση (3) παίρνει τη μορφή

$$\frac{B}{F} = - \frac{1}{K_D} * B + \frac{B_{max}}{K_D} \quad (4)$$

Στηριζόμενοι λοιπόν στα παραπάνω, από τα αποτελέσματα των πειραμάτων προσδιορίστηκαν το  $B$  (η συγκέντρωση της ειδικά δεσμευμένης ραδιενεργής ουσίας) και το  $F$  (η συγκέντρωση της μη δεσμευμένης ραδιενεργής ουσίας) σε fmoles/αντίδραση:

$$B = \frac{(B_T - NSB)}{e * S.A} \quad \text{και} \quad F = \frac{(Rad - B)}{e * S.A}$$

$B_T$ : Η ολική δέσμευση του ραδιοσημασμένου αγωνιστή-ανταγωνιστή σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm).

$NSB$ : Η μη ειδική δέσμευση του ραδιοσημασμένου αγωνιστή-ανταγωνιστή παρουσία 5-10  $\mu M$  μη ραδιοσημασμένου αγωνιστή-ανταγωνιστή σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm).

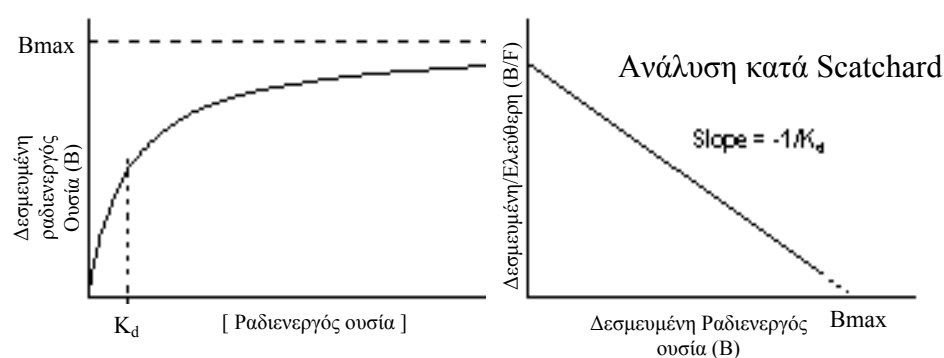
$Rad$ : Η ολική ποσότητα ραδιοσημασμένου αγωνιστή-ανταγωνιστή ανά αντίδραση σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm).

$e$ : Ο συντελεστής απόδοσης του μετρητή ακτινοβολίας

$S.A.$ : Η ειδική δραστηριότητα του ραδιοσημασμένου αγωνιστή-ανταγωνιστή σε fmoles/ml

Έτσι σχεδιάστηκαν (σχήμα 8), αφενός καμπύλη κορεσμού τοποθετώντας στον άξονα των  $Y$  τη συγκέντρωση της ειδικά δεσμευμένης ραδιενεργής ουσίας ( $B$ ) και στον άξονα των  $X$  τη συγκέντρωση της ραδιενεργής ουσίας που χρησιμοποιήθηκε και αφετέρου, γραμμή (ανάλυση κατά Scatchard) τοποθετώντας στον άξονα των  $Y$  το  $B/F$  και στον άξονα των  $X$  το  $B$ . Η κλίση της ισούται με την τιμή  $-(1/K_D)$ , ενώ το σημείο στο οποίο η ευθεία γραμμή τέμνει τον άξονα των  $X$  δηλαδή το σημείο όπου  $B/F = 0$ , αποτελεί την τιμή  $B_{max}$ , την τιμή που εκφράζει το συνολικό αριθμό των θέσεων δέσμευσης.





**Σχήμα 8.** Αντιπροσωπευτικές καμπύλες ανάλυσης των αποτελεσμάτων από μελέτες δέσμησης-κορεσμού (Limbird 1996).

Η  $K_D$  εκφράζεται σε  $\mu\text{M}$  ή  $\text{nM}$ , καθώς και η τιμή  $B_{\text{max}}$ , από την οποία όμως μπορεί να προσδιοριστεί και ο συνολικός αριθμός των θέσεων δέσμησης ανά κύτταρο ή ανά  $\text{mg}$  πρωτεΐνης:

$$\text{Αριθμός θέσεων δέσμησης} = \frac{B_{\text{max}} * \text{Αριθμός Avogadro}}{\text{Αριθμός κυττάρων ανά αντίδραση} \text{ ή συγκέντρωση πρωτεΐνης (mg/ml)}}$$

Αριθμός Avogadro:  $6,022 * 10^{23}$  molecules /mole

### B. Μελέτες δέσμησης οπιοειδών πεπτιδίων στους οπιοειδείς υποδοχείς καρκινικών κυτταρικών σειρών του προστάτου

Για τον έλεγχο της δέσμησης διαφόρων πεπτιδίων στους οπιοειδείς υποδοχείς πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε ολόκληρα κύτταρα, όπου μελετήθηκε η αναστολή της δέσμησης ραδιοσημασμένων οπιοειδών αγωνιστών ειδικών για τους διαφορετικούς οπιοειδείς υποδοχείς (μελέτες δόσης-απόκρισης). Στις μελέτες δέσμησης δόσης-απόκρισης πραγματοποιείται μέτρηση της δέσμησης μιας ραδιοσημασμένης ουσίας σε συγκεκριμένη συγκέντρωση παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων μη ραδιοσημασμένης ουσίας. Επιτρέπουν την ανίχνευση δέσμησης για παράδειγμα ενός φαρμάκου ακόμα και όταν η χημική συγγένεια είναι χαμηλή. Χρησιμοποιώντας ίδια ραδιοσημασμένη και μη ουσία, είναι εφικτό να υπολογιστεί και ο αριθμός των υποδοχέων και η χημική συγγένεια του. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι σύμφωνα με τους Hatzoglou et al. (1996a).

Υλικά-Συσκευές

Κυτταρική σειρά PC3 (ECACC 90112714 UK)  
 Κυτταρική σειρά DU-145 (ACC 261 DSMZ Germany)  
 Κυτταρική σειρά LNCaP (ACC 256 DSMZ Germany)  
 Πλάκες καλλιέργειών 24 οπών (Corning & Costar, USA)  
 Γλυκίνη (Gibco-BRL Life Technologies, UK)  
 NaOH (Merck, Germany)  
 $[^3\text{H}]$  EKC (21,1 Ci/mmol DuPont NEN, USA)  
 $[^3\text{H}]$  διπρενορφίνη (39 Ci/mmol Amersham Pharmacia, UK)  
 $[^3\text{H}]$  DAGO (60 Ci/mmol Amersham Pharmacia, UK)  
 $[^3\text{H}]$  DPDPE (28 Ci/mmol DuPont NEN, USA)  
 DADLE (Sigma, Germany)  
 EKC (Sterling –Winthrop USA)  
 Διπρενορφίνη (Sterling –Winthrop USA)  
 α-καζεΐνη 90-95 (Sigma, USA)  
 α-καζεΐνη 90-96 (Sigma, USA)  
 β-καζομορφίνη (Sigma, USA)  
 β-καζομορφίνη 1-5 (Sigma, USA)  
 Σωληνάρια πλαστικά, υγρού σπινθηρισμού (Kartell, Italy)  
 Υγρό σπινθηρισμού (Sigma, USA)  
 Πλάκες καλλιέργειών στείρες 24 οπών (Corning & Costar, USA)  
 Αναδευτήρας R100 Rotatest shaker (Luckham, UK)  
 Μετρητής β-ακτινοβολίας TRI-CARB 4000 Series απόδοσης 60% στο  $[^3\text{H}]$  (Packard, USA)

Διαλύματα

Διάλυμα οξינוποίησης: Γλυκίνη 50mM pH 3.0  
 Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS  
 Διάλυμα NaOH 2N

Μέθοδος

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε κυψελίδες 24 οπών με επίπεδο πυθμένα. Την ημέρα του πειράματος έγινε έκπλυση των κυττάρων δύο φορές με 2 ml PBS, επώαση με 0,5 ml διάλυμα οξינוποίησης στους 4°C για 3 λεπτά και έκπλυση δύο φορές για 3 λεπτά με 3 ml PBS. Η διαδικασία αυτή ελέγχθηκε ότι δεν καταστρέφει τα κύτταρα, ούτε επηρεάζει τον αριθμό των υποδοχέων. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν με διαφορετικούς τριτωμένους οπιοειδείς αγωνιστές (τελική συγκέντρωση 5 με 10 nM) και διαφορετικές συγκεντρώσεις του πεπτιδίου ( $10^{-6}$  -  $10^{-12}$  M) σε τελικό όγκο 0,4 ml ανά αντίδραση, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε και επώαση κυττάρων με τα ραδιενεργά ανάλογα παρουσία 5μM μη ραδιενεργού αναλόγου, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Οι συγκεντρώσεις των πεπτιδίων  $10^{-12}$  –  $10^{-6}$  επιλέγησαν δεδομένου ότι τόσο τοπικά, όσο και στην γενική κυκλοφορία δεν έχουν ανιχνευθεί μεγαλύτερες

συγκεντρώσεις τους (Hatzoglou et al 1996). Στο τέλος της επώασης, απομακρύνθηκε το διάλυμα της αντίδρασης και πραγματοποιήθηκε έκπλυση των κυττάρων δύο φορές με 2 ml παγωμένο διάλυμα PBS. Οι δεσμευμένοι στους υποδοχείς, οπιοειδείς αγωνιστές συλλέχθηκαν με 0,5 ml διάλυμα NaOH 2N στο οποίο προστέθηκαν 3 ml υγρό σπινθηρισμού και μετρήθηκε σε μετρητή β-ακτινοβολίας για 2 λεπτά.

#### Ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα πειράματα δόσης απόκρισης βασίζονται στην αντίδραση:



- [R]: Συγκέντρωση υποδοχέων πριν την αντίδραση.  
 [L\*]: Συγκέντρωση ελεύθερης ραδιοσημασμένης ουσίας πριν την αντίδραση.  
 [I]: Συγκέντρωση ελεύθερης μη ραδιοσημασμένης ουσίας πριν την αντίδραση.  
 [RL]: Συγκέντρωση συμπλόκου υποδοχέα-ραδιοσημασμένης ουσίας.  
 [RI]: Συγκέντρωση συμπλόκου υποδοχέα-μη ραδιοσημασμένης ουσίας.  
 [L\*']: Συγκέντρωση ελεύθερης ραδιοσημασμένης ουσίας μετά την αντίδραση.  
 [I']: Συγκέντρωση ελεύθερης μη ραδιοσημασμένης ουσίας μετά την αντίδραση.

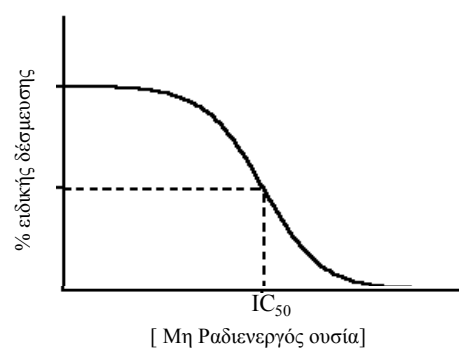
(Bylund and Martinez 1980)

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών προσδιορίστηκε το επί της εκατό ποσοστό της ειδικής δέσμευσης του ραδιοσημασμένου αναλόγου (%SB, percent of specific binding) παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων πεπτιδίου:

$$\% \text{ Ειδική δέσμευση} = \frac{B - NSB}{B_0 - NSB} \cdot 100$$

- B<sub>0</sub>: Δέσμευση του ραδιοσημασμένου οπιοειδή αγωνιστή-ανταγωνιστή σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm).  
 B: Δέσμευση του ραδιοσημασμένου οπιοειδή αγωνιστή-ανταγωνιστή παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων πεπτιδίου σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm).  
 NSB: Μη ειδική δέσμευση του ραδιοσημασμένου οπιοειδή αγωνιστή-ανταγωνιστή παρουσία 5μM μη ραδιοσημασμένου αναλόγου σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm).

Σχεδιάστηκαν καμπύλες με συντεταγμένες: στον άξονα των x, τις λογαριθμικές τιμές των συγκεντρώσεων των πεπτιδίων και στον άξονα των y, τις τιμές της επί της εκατό ειδικής δέσμευσης του ραδιενεργού αγωνιστή-ανταγωνιστή. Η συγκέντρωση του πεπτιδίου που απαιτείται για την αναστολή της ειδικής δέσμευσης του 50% της ραδιοσημασμένης ουσίας αναφέρεται ως σταθερά αναστολής ή μέση κατασταλτική συγκέντρωση (Inhibitory Concentration 50%, IC<sub>50</sub>) και προσδιορίζει τη συγγένεια του πεπτιδίου με τους υποδοχείς.



**Σχήμα-9.** Αντιπροσωπευτική καμπύλη ανάλυσης των αποτελεσμάτων από μελέτες δέσμευσης δόσης-απόκρισης. (Limbird 1996)

**Γ. Ανίχνευση υποδοχέων σωματοστατίνης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτου**

**Υλικά -Συσκευές**

Κυτταρική σειρά PC3 (ECACC 90112714 UK)  
 Κυτταρική σειρά DU-145 (ACC 261 DSMZ Germany)  
 Κυτταρική σειρά LNCaP (ACC 256 DSMZ Germany)  
 $[^{125}\text{I}] \text{Tyr}^{11} \text{SRIF-14}$  (2000Ci/mmol, Amersham, UK)  
 SRIF-14 (Bachem, Switzerland)  
 Γλυκίνη (Gibco-BRL Co MD USA)  
 Καυστικό νάτριο NaOH (Merck, Germany)  
 Πλάκες καλλιέργειών στείρες 6 οπών (Corning & Costar, USA)  
 Αναδευτήρας R100 Rotatest shaker (Luckham, UK)  
 Σωληνάρια πολυστυρενίου 12x75mm  
 Μετρητής γ-ακτινοβολίας AUTO Gamma 5000 Series απόδοσης 95% στο  $[^{125}\text{I}]$  (Packard, USA)

**Διαλύματα**

Διάλυμα οξינוποίησης: Γλυκίνη 50mM pH 3.0  
 Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS  
 Διάλυμα NaOH 2N

**Μέθοδος**

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα κορεσμού σύμφωνα με τους Hatzoglou et al. (1995b).  $10^6$  κύτταρα ανά οπή καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 6 οπών με επίπεδο πυθμένα. Την ημέρα του πειράματος εκπλύθηκαν δύο φορές με 2 ml PBS, επώαστηκαν με 0,5 ml διάλυμα οξינוποίησης στους  $4^\circ\text{C}$  για 3 λεπτά και τέλος εκπλύθηκαν δύο φορές με 3ml PBS. Στη συνέχεια επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 0,5, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2 nM) ιωδιομένου αναλόγου της σωματοστατίνης ( $[^{125}\text{I}] \text{Tyr}^{11} \text{SRIF-14}$ ) σε τελικό όγκο 0,4 ml ανά αντίδραση, ενώ

ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε και επώαση κυττάρων με τη ραδιενεργό ουσία παρουσία 5μM μη ραδιενεργού αναλόγου (SRIF-14 ή SRIF-28), για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Στο τέλος της επώασης, απομακρύνθηκε το διάλυμα της αντίδρασης και πραγματοποιήθηκε έκπλυση των κυττάρων δύο φορές με 2 ml παγωμένο διάλυμα PBS. Η δεσμευμένη στους υποδοχείς, ραδιενεργός σωματοστατίνη συλλέχθηκε με 0,5 ml διάλυμα NaOH 2N το οποίο μετρήθηκε σε μετρητή γ-ακτινοβολίας για 2 λεπτά.

#### Ανάλυση αποτελεσμάτων

Όπως και στα προηγούμενα πειράματα κορεσμού (Υλικά και Μέθοδοι 4A) προσδιορίστηκαν το B (η συγκέντρωση της ειδικά δεσμευμένης ραδιενεργής ουσίας) και το F (η συγκέντρωση της μη δεσμευμένης ραδιενεργής ουσίας) σε fmoles/αντίδραση και στη συνέχεια σχεδιάστηκε γραμμή τοποθετώντας στον άξονα των Y το B / F και στον άξονα των X το B, από την κλίση της οποίας που ισούται με την τιμή  $-(1/K_D)$  προσδιορίστηκε η σταθερά διάστασης  $K_D$ . Ενώ από το σημείο στο οποίο η ευθεία γραμμή τέμνει τον άξονα των X δηλαδή το σημείο όπου  $B / F = 0$ , προσδιορίστηκε η τιμή  $B_{max}$ , και στη συνέχεια ο συνολικός αριθμός θέσεων δέσμευσης ανά κύτταρο.

#### Δ. Μελέτες δέσμευσης οπιοειδών σε υποδοχείς **σωματοστατίνης** σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτου.

Για τον προσδιορισμό της πιθανής δέσμευσης των οπιοειδών στους υποδοχείς σωματοστατίνης πραγματοποιήθηκαν πειράματα αναστολής της δέσμευσης της [ $^{125}$ I] Tyr<sup>11</sup> SRIF-14, από διαφορετικούς οπιοειδείς αγωνιστές - ανταγωνιστές ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία, σύμφωνα με αυτή των Hatzoglou et al. (1995a) (Πειράματα δόσης – απόκρισης).

#### Υλικά-Συσκευές

Κυτταρική σειρά PC3 (ECACC 90112714 UK)  
 Κυτταρική σειρά DU-145 (ACC 261 DSMZ Germany)  
 Κυτταρική σειρά LNCaP (ACC 256 DSMZ Germany)  
 [ $^{125}$ I] Tyr<sup>11</sup> SRIF-14 (2000Ci/mmol, Amersham Pharmacia, UK)  
 SRIF-14 (Bachem, Switzerland)  
 SRIF-28(Bachem, Switzerland)  
 Γλυκίνη (Gibco-BRL Life Technologies, UK)  
 NaOH (Merck, Germany)  
 DADLE (Sigma, Germany)  
 EKC (Sterling –Winthrop USA)

Διπρενορφίνη (Sterling –Winthrop USA)  
DAGO (Sigma, Germany)  
Πλάκες καλλιέργειών στείρες 6 οπών (Corning & Costar, USA)  
Αναδευτήρας R100 Rotatest shaker (Luckham, UK)  
Σωληνάρια πολυστυρενίου 12x75mm  
Μετρητής γ-ακτινοβολίας AUTO Gamma 5000 Series απόδοσης 95% (Packard, USA)

#### Διαλύματα

Διάλυμα οξינוποίησης : Γλυκίνη 50mM pH 3.0  
Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS  
Διάλυμα NaOH 2N

#### Μέθοδος

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 6 οπών με επίπεδο πυθμένα. Την ημέρα του πειράματος εκπλύθηκαν δύο φορές με 2 ml PBS, επώαστηκαν με 0,5 ml διάλυμα οξינוποίησης στους 4°C για 3 λεπτά και τέλος εκπλύθηκαν δύο φορές με 3ml PBS. Στη συνέχεια επώαστηκαν με ιωδιόμενο ανάλογο της σωματοστατίνης ( $[^{125}\text{I}] \text{Tyr}^{11} \text{SRIF-14}$ ) σε τελική συγκέντρωση 51 pM και διαφορετικές συγκεντρώσεις του πεπτιδίου ( $10^{-6}$  -  $10^{-12}$  M) σε τελικό όγκο 0,4 ml ανά αντίδραση, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε και επώαση κυττάρων με τη ραδιενεργό ουσία παρουσία 5μM μη ραδιενεργού αναλόγου (SRIF-14 ή SRIF-28), για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Στο τέλος της επώασης, απομακρύνθηκε το διάλυμα της αντίδρασης και πραγματοποιήθηκε έκπλυση των κυττάρων δύο φορές με 2 ml παγωμένο διάλυμα PBS. Η δεσμευμένη στους υποδοχείς σωματοστατίνη συλλέχθηκε με 0,5 ml διάλυμα NaOH 2N το οποίο μετρήθηκε σε μετρητή γ-ακτινοβολίας για 2 λεπτά.

#### Ανάλυση αποτελεσμάτων

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε στις μελέτες δέσμησης των οπιοειδών πεπτιδίων στους οπιοειδείς υποδοχείς (Υλικά και Μέθοδοι 4B). Έγινε προσδιορισμός του επί της εκατό ποσοστού της ειδικής δέσμησης του ραδιοσημασμένου αναλόγου της σωματοστατίνης παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων των οπιοειδών και σχεδιασμός καμπυλών με συντεταγμένες: στον άξονα των x, τις λογαριθμικές τιμές των συγκεντρώσεων των οπιοειδών και στον άξονα των y, τις τιμές της ειδικής δέσμησης (B/B<sub>0</sub>).

### E. Μελέτες δέσμευσης οπιοειδών στους $\alpha_1$ αδρενεργικούς υποδοχείς στα κύτταρα LNCaP

Για τον προσδιορισμό της πιθανής δέσμευσης των οπιοειδών στους  $\alpha_1$  αδρενεργικούς υποδοχείς πραγματοποιήθηκαν πειράματα αναστολής της δέσμευσης της [ $^3\text{H}$ ]-πραζοσίνης παρουσία οπιοειδούς αγωνιστή - ανταγωνιστές (Πειράματα δόσης – απόκρισης).

#### Υλικά-Συσκευές

Κυτταρική σειρά PC3 (ECACC 90112714 UK)  
Κυτταρική σειρά DU-145 (ACC 261 DSMZ Germany)  
Κυτταρική σειρά LNCaP (ACC 256 DSMZ Germany)  
[ $^3\text{H}$ ]-πραζοσίνη (Amersham Pharmacia, UK)  
Γλυκίνη (Gibco-BRL Life Technologies, UK)  
**NaOH (Merck, Germany)**  
EKC (Sterling –Winthrop USA)  
Υγρό σπινθηρισμού (Sigma, USA)  
Πλάκες καλλιέργειών στείρες 24 οπών (Corning & Costar, USA)  
Αναδευτήρας R100 Rotatest shaker (Luckham, UK)  
Μετρητής β-ακτινοβολίας TRI-CARB 4000 Series απόδοσης 60% στο [ $^3\text{H}$ ] (Packard, USA)

#### Διαλύματα

Διάλυμα οξינוποίησης: Γλυκίνη 50mM pH 3.0  
Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS  
Διάλυμα NaOH 2N

#### Μέθοδος

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 6 οπών με επίπεδο πυθμένα. Την ημέρα του πειράματος εκπλύθηκαν δύο φορές με 2 ml PBS, επώαστηκαν με 0,5 ml διάλυμα οξינוποίησης στους 4°C για 3 λεπτά και τέλος εκπλύθηκαν δύο φορές με 3ml PBS. Στη συνέχεια επώαστηκαν με τριτιωμένο ανάλογο της πραζοσίνης ([ $^3\text{H}$ ]-πραζοσίνη) και διαφορετικές συγκεντρώσεις EKC ( $10^{-6}$  -  $10^{-12}$  M) σε τελικό όγκο 0,4 ml ανά αντίδραση, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε και επώαση κυττάρων με τη ραδιενεργό ουσία παρουσία 5μM μη ραδιενεργού αναλόγου, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Στο τέλος της επώασης, απομακρύνθηκε το διάλυμα της αντίδρασης και πραγματοποιήθηκε έκπλυση των κυττάρων δύο φορές με 2 ml παγωμένο διάλυμα PBS. Η δεσμευμένη στους υποδοχείς πραζοσίνη συλλέχθηκε με 0,5 ml διάλυμα NaOH 2N το οποίο μετρήθηκε σε μετρητή β-ακτινοβολίας για 2 λεπτά.

Ανάλυση αποτελεσμάτων

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε στις μελέτες δέσμησης των οπιοειδών πεπτιδίων στους οπιοειδείς υποδοχείς (Υλικά και Μέθοδοι 4B). Έγινε προσδιορισμός του επί της εκατό ποσοστού της ειδικής δέσμησης του ραδιοσημασμένου αναλόγου της σωματοστατίνης παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων των οπιοειδών και σχεδιασμός καμπυλών με συντεταγμένες: στον άξονα των x, τις λογαριθμικές τιμές των συγκεντρώσεων των οπιοειδών και στον άξονα των y, τις τιμές της ειδικής δέσμησης (B/B<sub>0</sub>).

ΣΤ. Μέτρηση των υποδοχέων των **ανδρογόνων** στην καρκινική κυτταρική σειρά του προστάτου LNCaPΥλικά -Συσκευές

Κυτταρική σειρά LNCaP ( ACC 256 DSMZ Germany)  
<sup>3</sup>H] Τεστοστερόνη (60 Ci/mmol Amersham Pharmacia, UK)  
 DHT (Sigma, USA)  
 Πλάκες καλλιέργειών στείρες 6 οπών (Corning & Costar, USA)  
 Φίλτρα ινών υάλου, GF/B 25mm (Whatman, England)  
 Συσκευή διήθησης (Millipore, USA)  
 Σωληνάρια πλαστικά, υγρού σπινθηρισμού (Kartell, Italy)  
 Υγρό σπινθηρισμού (Sigma, USA)  
 Αναδευτήρας R100 Rotatest shaker (Luckham, UK)  
 Μετρητής β-ακτινοβολίας TRI-CARB 4000 Series απόδοσης 60% (Packard, USA)

Διαλύματα

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS

Μέθοδος

Τα κύτταρα LNCaP καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 6 οπών με επίπεδο πυθμένα. Μετά από έκπλυση των κυττάρων δύο φορές με 3ml PBS, τα κύτταρα επώστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις (0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 nM) τριτωμένης τεστοστερόνης σε τελικό όγκο 0,4 ml ανά αντίδραση, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε και επώση κυττάρων με ραδιενεργή τεστοστερόνη παρουσία 5μM μη ραδιενεργής (DHT), σε τελικό όγκο 0,4 ml ανά αντίδραση, για 18-20 ώρες υπό ήπια ανάδευση στους 4°C. Στο τέλος της επώσης, την επόμενη μέρα για να γίνει συλλογή των κυττάρων και της δεσμευμένης σε αυτά ραδιενεργής τεστοστερόνης και διαχωρισμός τους από το διάλυμα της αντίδρασης, πραγματοποιήθηκε διήθηση του διαλύματος της αντίδρασης-κυττάρων από φίλτρα στη συσκευή της Millipore με τη βοήθεια κενού. Τα φίλτρα εκπλύθηκαν με παγωμένο



PBS τρεις φορές, προστέθηκαν σε υγρό σπινθηρισμού και μετρήθηκαν σε μετρητή β-ακτινοβολίας για 2 λεπτά.

#### Ανάλυση αποτελεσμάτων

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τον ίδιο τρόπο όπως και στις παραπάνω μελέτες όπου πραγματοποιήθηκαν πειράματα κορεσμού (Υλικά και Μέθοδοι 4A).

#### Z. Μελέτες ανίχνευσης μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων σε παρασκευάσματα των κυττάρων LNCaP

##### Υλικά -Συσκευές

Κυτταρική σειρά LNCaP ( ACC 256 DSMZ Germany)  
 Φλάσκες καλλιέργειών 150 cm<sup>2</sup> (Corning & Costar, USA)  
 Trizma base (Merck, Germany)  
 Απρωτινίνη (Sigma, USA)  
 PMSF (Sigma, USA)  
 [<sup>3</sup>H] Τεστοστερόνη (95Ci/mmol Amersham Pharmacia, UK)  
 DHT (Sigma, USA)  
 PEI 50% w/v aqueous solution (Sigma, USA)  
 Ψυχόμενη φυγόκεντρος Sorvall RC-28S, κεφαλή F28/13 (Du Pont Instruments, USA)  
 Συσκευή υπερήχων  
 Φίλτρα ιών υάλου, GF/B 25mm (Whatman, England)  
 Συσκευή διήθησης (Millipore, USA)  
 Σωληνάρια πολυστυρενίου 12x75mm  
 Υγρό σπινθηρισμού (Sigma, USA)  
 Σωληνάρια πλαστικά, υγρού σπινθηρισμού (Kartell, Italy)  
 Μετρητής β-ακτινοβολίας TRI-CARB 4000 Series απόδοσης 60% (Packard, USA)

##### Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH 7,4: 50mM Trizma base  
 1mM PMSF  
 0,5μg/ml απρωτινίνη  
 Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS

##### Μέθοδος

##### Παρασκευή μεμβρανών

Τα κύτταρα εκπλύθηκαν δύο φορές με PBS, αποξέστηκαν από τις φλάσκες καλλιέργειών και συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση σε 800 x g για 10 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα Tris με τη βοήθεια υπερήχων (3 φορές για 10 δευτερόλεπτα κάθε φορά στους 0 °C ) και φυγοκεντρήθηκαν σε 800 x g για 10 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε για 1 ώρα σε 45000 x g

στους 4 °C. Το ίζημα της φυγοκέντρωσης ομογενοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Οι μελέτες δέσμωσης πραγματοποιήθηκαν αμέσως μετά τη παρασκευή των μεμβρανών.

#### **Μελέτες δέσμωσης**

Για τις μελέτες κορεσμού, σε σωληνάρια πολυστερενίου τοποθετήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις από 2-50nM, τριτωμένης τεστοστερόνης, ρυθμιστικό διάλυμα και εναιώρημα μεμβρανών (τελική συγκέντρωση 2mg/ml) σε τελικό όγκο 0,1 ml. Για τον υπολογισμό της μη ειδικής δέσμωσης πραγματοποιήθηκε παράλληλη επώαση εναιωρήματος μεμβρανών και ραδιοσημασμένης τεστοστερόνης με 5μM μη ραδιοσημασμένου ανδρογόνου (DHT).

Για τις μελέτες δόσης-απόκρισης μεμβρανικά παρασκευάσματα σε τελική συγκέντρωση 2mg/ml επώαστηκαν με 5nM [<sup>3</sup>H] τεστοστερόνη παρουσία ή απουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ( $10^{-12}$  - $10^{-6}$  M) μη ραδιοσημασμένου στεροειδούς (DHT, οιστραδιόλη ή προγεστερόνη). Ενώ ο προσδιορισμός της μη ειδικής δέσμωσης πραγματοποιήθηκε παρουσία 5μM DHT.

Και στους δύο τύπους μελέτης δέσμωσης το όλο μείγμα επώαστηκε όλο το βράδυ στους 4°C υπό ήπια ανάδευση.

Η δεσμευμένη στους υποδοχείς ραδιενεργή τεστοστερόνη διαχωρίστηκε από την ελεύθερη με διήθηση σε φίλτρα ινών υάλου τα οποία προηγουμένως είχαν εμποτιστεί με 0,1% w/v PEI για 60 λεπτά, στη συσκευή της Millipore με τη βοήθεια κενού. Στη συνέχεια τα φίλτρα εκπλύθηκαν με παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα τρεις φορές, προστέθηκαν σε υγρό σπινθηρισμού και μετρήθηκαν σε μετρητή β-ακτινοβολίας για 2 λεπτά.

#### **Ανάλυση αποτελεσμάτων**

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τον ίδιο τρόπο όπως και στις παραπάνω μελέτες όπου πραγματοποιήθηκαν πειράματα κορεσμού (Υλικά και Μέθοδοι 4A) και δόσης- απόκρισης (Υλικά και Μέθοδοι 4B).

### **5. Μέτρηση της παραγόμενης ποσότητας NO<sup>•</sup> από καρκινικά κύτταρα μετά από επίδραση με οπιοειδή**

#### **Υλικά -Συσκευές**

Διάλυμα τρυψίνης- EDTA (Gibco-BRL Co MD USA)  
Diaminofluorescein diacetate (DAF-DA) (Sigma, USA)

L-NAME (Nω-Nitro L-Arginin Methyl Ester) (Sigma, USA)  
Κυτταρομετρητής ροής Coulter Epics τύπου XL-MCL apparatus (Beckman-Coulter, USA)

#### Διαλύματα

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS, pH 7.4

#### Μέθοδος

Με τη μέθοδο αυτή είναι εφικτή η μέτρηση της NO· που παράγεται μέσα στα κύτταρα άμεσα και όχι μετρώντας νιτρώδη ή νιτρικά ιόντα. Βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής DAF-DA να μετατρέπεται από τις ενδοκυττάρια εστεράσες σε DAF, η οποία παρουσία της NO· μετατρέπεται στη φθορίζουσα μορφή της (2', 7'-diaminofluorescein ) που παγιδεύεται μέσα στα κύτταρα και μπορεί να μετρηθεί με κυτταρομετρία ροής (Kojima et al. 1998). Η χρωστική μετατρέπεται στη φθορίζουσα μορφή της μόνο παρουσία της NO· και όχι παρουσία NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ή NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ιόντων ή άλλων ενεργών ιόντων αζώτου ή οξυγόνου (Korec and Carroll 2000).

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ή παρουσία οπιοειδών για 24 ώρες και στη συνέχεια συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας διάλυμα τρυψίνης-EDTA, φυγοκεντρήθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα PBS σε συγκέντρωση 10<sup>6</sup> κύτταρα /ml. Στα κύτταρα προστέθηκε η χρωστική DAF-DA σε τελική συγκέντρωση 0,1mM και επώαστηκαν για 3 λεπτά. Η ενδοκυττάρια παραγωγή της NO· μετέτρεψε τη χρωστική στη φθορίζουσα μορφή της και τα φθορίζοντα κύτταρα μετρήθηκαν σε κυτταρομετρητή ροής (μήκος κύματος διέγερσης τα 485 nm και εκπομπής τα 530 nm) σε τακτά χρονικά διαστήματα έως και 90 λεπτά. Παράλληλα για επιβεβαίωση ότι ο φθορισμός οφείλεται στη παραγωγή της NO· έγιναν μετρήσεις και παρουσία 1mM του αναστολέα της συνθάσης της NO, L-NAME.

#### Ανάλυση αποτελεσμάτων

Μετρήθηκε το ποσοστό των κυττάρων που φθορίζουν σε τακτά χρονικά διαστήματα και σχεδιάστηκαν καμπύλες του ποσοστού των φθορίζοντων κυττάρων σε συνάρτηση με το χρόνο.

### **6. Μελέτη της επίδρασης των οπιοειδών στη συνθάση της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NOS)**

#### Υλικά και συσκευές

β-NADPH (Sigma, USA)  
FAD (Sigma, USA)  
FMN (Sigma, USA)  
6-Τετραϋδρο-βιοπτερίνη (BH<sub>4</sub>) (Sigma, USA)

Tris-HCl (Merck, Germany)  
 EDTA (Sigma, USA)  
 HEPES (Sigma, USA)  
 Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl<sub>2</sub>) (Merck, Germany)  
 [<sup>3</sup>H] L-Αργινίνη (58 Ci/mmol, Amersham, UK)  
 Ιοντοανταλακτική ρητίνη AG-50W (Bio-Rad Life Science Technologies, USA)  
 Συσκευή μικροφυγοκέντρωσης με φίλτρο πόρων 0,45 μm (Sigma, USA)  
 Μικροφυγόκεντρος Mikro 22R (Hettich, Germany)  
 Υγρό σπινθηρισμού (Sigma, USA)  
 Μετρητής β-ακτινοβολίας TRI-CARB 4000 Series απόδοσης 60% (Packard, USA)

### Διαλύματα

10 x διάλυμα ομογενοποίησης: 250 mM Tris-HCl, pH 7,4 , 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 2 mM PMSF

Διάλυμα 10 mM NADPH σε 10 mM Tris-HCl pH 7.4.

2x διάλυμα αντίδρασης: 50 mM Tris pH 7,4 , 6 μM BH<sub>4</sub>, 2 μM FAD, 2 μM FMN

Μείγμα αντίδρασης για 10 δείγματα: 250 μl 2x διάλυμα αντίδρασης, 50μl 10mM NADPH , 10μl [<sup>3</sup>H] Αργινίνη , 50μl 6mM CaCl<sub>2</sub> )

Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης : 50mM HEPES, 5 mM EDTA, pH 5,5

Χλωριούχο ασβέστιο 6mM (CaCl<sub>2</sub>)

### Μέθοδος

Η μέθοδος μέτρησης της δραστηριότητας της συνθάσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) βασίζεται στη αντίδραση την οποία καταλύει η NOS κατά την οποία η L-Αργινίνη παρουσία αναγόμενου NADPH και των συμπαραγόντων FAD, FMN και BH<sub>4</sub> οξειδώνεται σε L-κιτρουλλίνη με την ταυτόχρονη παραγωγή NO<sup>•</sup>. Έτσι χρησιμοποιώντας ραδιοσημασμένη L-Αργινίνη πραγματοποιείται η παραπάνω αντίδραση και μετράται η ποσότητα της ραδιοσημασμένης L-κιτρουλλίνης που παράγεται από συγκεκριμένη ποσότητα πρωτεϊνικού διαλύματος και για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (Bredt and Snyder 1990).

Για την μελέτη της επίδρασης των οπιοειδών στη NOS τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ή παρουσία οπιοειδών σε πλάκες 6 οπών και την ημέρα του πειράματος εκπλύθηκαν μία φορά με PBS και συλλέχθηκαν σε διάλυμα PBS το οποίο περιείχε 1mM EDTA. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε μικροφυγόκεντρο για 2 min στις 12.000 στροφές ανά λεπτό. Το ίζημα των κυττάρων ομογενοποιήθηκε με 200 - 300μl 1x διάλυμα ομογενοποίησης και φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 12.000 στροφές ανά λεπτό. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης συλλέχθηκε, έγινε μέτρηση των πρωτεϊνών του με τη μέθοδο Bradford (Υλικά και Μέθοδοι 3) και η

συγκέντρωση του ρυθμίστηκε έτσι ώστε να είναι 10μg/ml. Σε 10 μl πρωτεϊνικού διαλύματος προστέθηκαν 40 μl μείγμα αντίδρασης και επώαστηκαν για μία ώρα στους 37°C. Η αντίδραση τερματίστηκε προσθέτοντας 400 μl διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε επώαση πρωτεϊνικού διαλύματος το οποίο είχε προηγουμένως εκτεθεί σε βρασμό ως αρνητικός μάρτυρας. Για την απομάκρυνση της [<sup>3</sup>H] L-Αργινίνης που δεν έχει μετατραπεί σε κιτρουλίνη προστέθηκαν 400μl εξισορροπημένης ιοντοανταλλακτικής ρητίνης. Το όλο μείγμα μεταφέρθηκε σε συσκευές μικροφυγοκέντρωσης με φίλτρο και φυγοκεντρήθηκε στις 12.000 στροφές ανά λεπτό για 3 min. Με την φυγοκέντρωση η ρητίνη που συγκρατεί την θετικά φορτισμένη σε pH 5,5 [<sup>3</sup>H] L-Αργινίνη, διαχωρίστηκε από την [<sup>3</sup>H] κιτρουλίνη η οποία είναι ιονικά ουδέτερη και δεν δεσμεύεται στην ρητίνη. Η [<sup>3</sup>H] κιτρουλίνη στη συνέχεια αναμείχθηκε με υγρό σπινθηρισμού και μετρήθηκε σε μετρητή β-ακτινοβολίας για 2 λεπτά.

#### Ανάλυση αποτελεσμάτων

Από τις μετρήσεις (κρούσεις ανά λεπτό cpm) της ραδιενεργής [<sup>3</sup>H] L-κιτρουλίνης που σχηματίστηκε στο τέλος της αντίδρασης αφαιρέθηκε η τιμή (cpm) του αρνητικού μάρτυρα και γνωρίζοντας την ειδική δραστηριότητα της [<sup>3</sup>H] L-Αργινίνης το χρόνο της αντίδρασης και την πρωτεϊνική συγκέντρωση υπολογίστηκε η ταχύτητα της αντίδρασης (V) χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση:

$$V = \frac{\text{Radioactivity} - \text{blank}}{e \times S.A. \times T \times [\text{protein}]}$$

V:	Η ταχύτητα της αντίδρασης (moles/ λεπτό/mg πρωτεΐνης)
Radioactivity:	Η ποσότητα της ραδιενεργής L-κιτρουλίνης στο τέλος της αντίδρασης σε cpm
Blank:	Η ποσότητα της ραδιενέργειας που μετρήθηκε στον τυφλό μάρτυρα σε cpm.
e:	Ο συντελεστής απόδοσης του μετρητή ακτινοβολίας
S.A.:	Η ειδική δραστηριότητα της ραδιοσημασμένης [ <sup>3</sup> H] L-Αργινίνης σε fmoles/ml
T:	Ο χρόνος της αντίδρασης σε λεπτά
[protein]:	Η πρωτεϊνική συγκέντρωση του δείγματος σε mg/ml

### **7. Ανοσοϊστοχημεία για την ανίχνευση ανδρογονικών υποδοχέων στα κύτταρα LNCaP.**

#### Υλικά –Συσκευές

Κυτταρική σειρά LNCaP ( ACC 256 DSMZ Germany)  
 Αντικειμενοφόρες πλάκες Super Frost /Plus (Kindler O GmbH, Germany)  
 Ακετόνη (Lab-Scan Analytical Sciences, Ireland)

Κιτρικό οξύ (Lab-Scan Analytical Sciences, Ireland)  
Κιτρικό νάτριο (Lab-Scan Analytical Sciences, Ireland)  
Φυσιολογικός ορός κουνελιού (DAKO, Denmark)  
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του ανθρώπινου ανδρογονικού υποδοχέα (Human anti-AR clone AR441, code M3562) (DAKO, Denmark)  
Δεύτερο αντίσωμα κατά των ανοσοσφαιρινών (IgG) ποντικού προσημασμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (DAKO, Denmark)  
Σύστημα ανίχνευσης του δευτέρου αντισώματος (Fast Red substrate system) (DAKO, Denmark)  
Φούρνος μικροκυμάτων  
Οπτικό μικροσκόπιο (Nikon Microphot – FXA microscope) με ενσωματωμένη κάμερα (Nikon FX35DX)

#### Διαλύματα

Διάλυμα κιτρικού pH 10: 8,2 mM κιτρικό οξύ  
1,8 mM κιτρικό νάτριο  
Διάλυμα TBS pH 7,6 : 50 mM NaCl  
50 mM Tris

#### Μέθοδος

Η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας βασίζεται στην ικανότητα σύνδεσης του αντισώματος κατά συγκεκριμένης πρωτεΐνης, με την πρωτεΐνη αυτή στα κύτταρα και στη χρήση δευτέρου αντισώματος κατά αντιορού του ζώου ξενιστή στο οποίο είχε παραχθεί το πρώτο αντίσωμα με το οποίο και συνδέεται. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση. Έτσι ανίχνευση της αλκαλικής φωσφατάσης σημαίνει και ανίχνευση της πρωτεΐνης και πραγματοποιείται με τη χρήση του κατάλληλου υποστρώματος για το ένζυμο. Αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η εμφάνιση χρώματος ορατό σε οπτικό μικροσκόπιο.

Τα κύτταρα LNCaP τοποθετήθηκαν σε Superfrost/Plus αντικειμενοφόρες πλάκες, μονιμοποιήθηκαν με τη χρήση παγωμένης ακετόνης για 5 λεπτά και αφέθηκαν να στεγνώσουν στον αέρα. Στη συνέχεια επώαστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών (pH 10) σε φούρνο μικροκυμάτων στα 500 watts για 3 λεπτά έτσι ώστε το αντίσωμα να διεισδύσει στο κύτταρο. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων πρώτα για 30 λεπτά με 5% φυσιολογικό ορό κουνελιού έτσι ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική δέσμευση των αντισωμάτων και μετά 1 ώρα με το αντίσωμα ενάντια του ανδρογονικού υποδοχέα σε αραιώση 1: 25 σε TBS-5% BSA. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν με TBS και επώαστηκαν για 1 ώρα με το δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση σε αραιώση 1: 30 σε TBS-5% BSA. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκπλύθηκαν με TBS για 25 λεπτά με το σύστημα ανίχνευσης του δευτέρου αντισώματος που περιέχει υπόστρωμα για την αλκαλική φωσφατάση και επιτρέπει

την εμφάνιση χρώματος. Τέλος τα κύτταρα βάφτηκαν με αιματοξυλίνη για 30 λεπτά. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο

#### **8. Κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων στα κύτταρα LNCaP.**

##### Υλικά -Συσκευές

Κυτταρική σειρά LNCaP ( ACC 256 DSMZ Germany)  
 Τεστοστερόνη 3-(Ο-καρβοξυλμεθυλ) oxime-BSA- FITC (Sigma, USA)  
 BSA-FITC (Sigma, USA)  
 Κυτταρομετρητής ροής (Coulter Epics XL-MCL Beckman-Coulter, USA)  
 Τεστοστερόνη-BSA (Sigma, USA)  
 DHT(Sigma, USA)  
 Κυτταρικοί «ξύστες» cell scrapers (Corning & Costar)

##### Διαλύματα

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS

##### Μέθοδος

Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής επιτυγχάνεται η μέτρηση αλλά κυρίως ο διαχωρισμός και η ομαδοποίηση των κυττάρων ανάλογα με το μέγεθος, τον τόνο, το δυναμικό και το pH. Παράλληλα είναι εφικτό με τη χρήση διαφόρων ουσιών που φθορίζουν η κατάταξη των κυττάρων ανάλογα με το είδος των πρωτεϊνών και των ενζύμων που φέρουν στο εσωτερικό τους ή στην επιφάνεια τους, ή διαφορές στο DNA. Ο βασικός τρόπος λειτουργίας του κυτταρομετρητή ροής περιλαμβάνει τα εξής: Τα κύτταρα περνάνε ένα-ένα μπροστά από μία δέσμη φωτός συνήθως από ένα Laser και χωρίζονται σε κατηγορίες με βάση δύο παραμέτρους α) τα μορφολογικά, κατασκευαστικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που προκαλούν σκέδαση της δέσμης φωτός και β) την εκπομπή φθορισμού από χημικές ενώσεις που υπάρχουν μέσα στα κύτταρα ή τις φθορίζουσες ουσίες που πλέον χρησιμοποιούνται συνδεδεμένες είτε με αντισώματα είτε με άλλου είδους πρωτεΐνες, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την ανίχνευση διαφόρων συστατικών των κυττάρων.

Η ανίχνευση θέσεων σύνδεσης για την τεστοστερόνη στην επιφάνεια των κυττάρων LNCaP έγινε εφικτή με τη χρήση τεστοστερόνης συνδεδεμένη με αλβουμίνη ορού βοός (BSA) η οποία και την καθιστά ανίκανη να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και με ισοθειοκυανιούχο φλουοροσκεΐνη (fluorescence isothiocyanate, FITC), η οποία επιτρέπει το διαχωρισμό και τη μέτρηση εκείνων των κυττάρων που φθορίζουν δηλαδή εκείνων στα οποία έχει δεσμευτεί η τεστοστερόνη-

BSA-FITC. Κύτταρα LNCaP τα οποία καλλιεργήθηκαν τουλάχιστον για 24 ώρες σε θρεπτικό χωρίς ορό αποξέστηκαν από τις φλάσκες καλλιέργειών και τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια πολυστυρενίου σε συγκέντρωση  $10^6$  κύτταρα /ml σε PBS. Ο κυτταρικός πληθυσμός της μελέτης προσδιορίστηκε σε δείγμα κυττάρων με βάση την προς τα εμπρός και προς τα πλάγια σκέδαση της οδηγού δέσμης laser (forward and side scatter). Στη συνέχεια αφού τα κύτταρα επωάστηκαν για διαδοχικά χρονικά διαστήματα (1, 10, 30 και 60 λεπτά) με την τεστοστερόνη-BSA-FITC ( $10^{-7}$  M) και την BSA-FITC ( $10^{-7}$  M) για την ανίχνευση της ειδικής και της μη ειδικής σύνδεσης αντίστοιχα, αναλύθηκαν στον κυτταρομετρητή ροής σε ένα δείγμα 10,000 κυττάρων με τη χρήση δέσμης argon-ion laser στα 488 nM για τη διέγερση της χρωστικής FITC (με μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης τα 495 nM και εκπομπής τα 520 nM)

#### Ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή ιστογραμμάτων όπου στον άξονα των Y είναι ο αριθμός των κυττάρων και στον άξονα των X η ένταση του φθορισμού σε λογαριθμική κλίμακα. Συγκρίνοντας το ιστογράμμα της BSA-FITC η οποία συνδέεται μη ειδικά, με αυτό που προέκυψε όταν χρησιμοποιήθηκε η τεστοστερόνη-BSA-FITC μπορεί να γίνει εκτίμηση για το αν υπάρχει ειδική σύνδεση (σύγκριση της έντασης του φθορισμού των κυττάρων) και να υπολογιστεί το ποσοστό των κυττάρων που φθορίζουν λόγω της ειδικής σύνδεσης

### **9. Μικροσκοπία συνεστίασης για την ανίχνευση μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων στα κύτταρα LNCaP**

#### Υλικά –Συσκευές

Κυτταρική σειρά LNCaP (ACC 256 DSMZ Germany)  
 Πολυ-L - λυσίνη (Poly-L-lysine) (Sigma, USA)  
 Καλυπτρίδες 22 x22 mm (SUPERIOR, Germany)  
 Αντικειμενοφόρες πλάκες 76x26mm (GLASSEX, Germany)  
 Παραφορμαλδεύδη PFA (Merck, Germany)  
 Vectashield (Vector Laboratories, USA)  
 Γλυκερόλη (Sigma, USA)  
 Τεστοστερόνη 3-(Ο-καρβοξυλμεθυλ) oxime-BSA- FITC (Sigma, USA)  
 BSA-FITC (Sigma, USA)  
 Μικροσκόπιο συνεστίασης Confocal laser scanning module (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany)

#### Διαλύματα

Διάλυμα πολυ-L-λυσίνης σε PBS 1mg/ml



Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS  
Διάλυμα κάλυψης φθορισμού : 50% Γλυκερόλη και 50% vectashield  
Διάλυμα παραφορμαλδεΐδης (PFA) 4% σε PBS pH 7,4

### Μέθοδος

Για την ανίχνευση μεμβρανικών ανδρογονικών υποδοχέων έγινε χρήση της τεστοστερόνης-BSA-FITC, όπως ανωτέρω. Όπως προαναφέρθηκε σύνδεση της τεστοστερόνης με την αλβουμίνη ορού βοός (BSA) την καθιστά ανίκανη να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη ενώ η σύνδεσή της με την ισοθιοκυανιούχο φλουοροσκεΐνη επιτρέπει την μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων στα οποία έχει γίνει η σύνδεση εφόσον αυτά φθορίζουν. Η χρήση του μικροσκοπίου συνεστίασης επιτρέπει τη λήψη οπτικών τομών των κυττάρων στις οποίες μπορούμε να παρατηρήσουμε που βρίσκεται η φθορίζουσα ουσία.

Τα κύτταρα LNCaP καλλιιεργήθηκαν πάνω σε καλυπτρίδες οι οποίες προηγουμένως είχαν επικαλυφθεί με πολυ-L-λυσίνη (επώαση 5 λεπτά με 0,1 mg/ml διαλύματος πολυ-L-λυσίνη και έκπλυση 2 φορές με PBS) για τουλάχιστον 24 ώρες με θρεπτικό χωρίς ορό. Στην συνέχεια έγινε έκπλυση των κυττάρων με PBS και επώαση με την τεστοστερόνη-BSA-FITC ( $10^{-7}$  M) και με BSA-FITC ( $10^{-7}$  M) για το διαχωρισμό μεταξύ ειδικής και μη ειδικής δέσμευσης. Μετά το τέλος της επώασης (1, 10 και 30 λεπτά ) τα κύτταρα εκπλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα 2% παραφορμαλδεΐδη για 20 λεπτά. Οι καλυπτρίδες με τα μονιμοποιημένα κύτταρα τοποθετήθηκαν ανάστροφα επάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες στο κέντρο των οποίων βρίσκονταν 20μl διάλυμα προστασίας φθορισμού. Τα δείγματα φυλάχτηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  έως τη στιγμή της παρατήρησής τους στο μικροσκόπιο συνεστίασης. Οι εικόνες αποκτήθηκαν με φακό x 100 και κατάλληλο software (λογισμικό CLSM). Μεταφέρθηκαν σε προσωπικό υπολογιστή στον οποίο και πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίησή τους σε φωτεινότητα και αντίθεση χρησιμοποιώντας κατάλληλο software (Corel Photo Paint V 9.0).

### **10. Μέτρηση της εκκρινόμενης ποσότητας του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) από την κυτταρική σειρά LNCaP**

Η μέτρηση της συγκεντρώσεως του ολικού PSA στο θρεπτικό υλικό μετά από καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ανοσοενζυματικής μεθόδου πολωμένου φθορισμού της εταιρείας Abbott. (Chicago, IL). Η μέθοδος

βασίζεται στη χρήση αντισώματος ενάντια στο PSA συνδεδεμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση και τη χρήση υποστρώματος που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία προϊόντος που φθορίζει και το οποίο μετράται.

### **11. Μικροσκοπία συνεστίασης για την παρατήρηση των μικροϊνιδίων ακτίνης στα κύτταρα LNCaP**

#### Υλικά -Συσκευές

Κυτταρική σειρά LNCaP ( ACC 256 DSMZ Germany)  
Πλάκες καλλιέργειας 6 οπών (Corning & Costar, USA)  
Πολυ-L - λυσίνη (Poly-L-lysine) (Sigma, USA)  
Καλυπτρίδες 22 x22 mm (SUPERIOR, Germany)  
Αντικειμενοφόρες πλάκες 76x26mm (GLASSEX, Germany)  
Triton X-100 (Merck, Germany)  
Ροδαμίνη-Φαλλοϊδίνη (Molecular Probes, USA)  
PIPES (Merck, Germany)  
Βοροϋβρίδιο του νατρίου : NaBH<sub>4</sub> (Sigma, USA)  
Χλωριούχο αμμώνιο: NH<sub>4</sub>Cl (Merck, Germany)  
Ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο: MgCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O  
EGTA (Sigma, USA)  
Φορμαλδεΐδη (Merck, Germany)  
Vectashield (Vector Laboratories, USA)  
Γλυκερόλη (Sigma, USA)  
Μικροσκόπιο συνεστίασης Confocal laser scanning module (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany)

#### Διαλύματα

Διάλυμα πολυ-L-λυσίνης σε PBS 1mg/ml  
Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS  
Διάλυμα κάλυψης φθορισμού : 50% Γλυκερόλη και 50% vectashield  
Ρυθμιστικό διάλυμα PEM pH 6,8: 100 mM PIPES  
5 mM EGTA  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
Διάλυμα μονιμοποίησης: σε υθμιστικό διάλυμα PEM  
3,7% φορμαλδεΐδη  
0,02% γλουταραλδεΐδη  
0,2% Triton X-100

#### Μέθοδος

Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση της ροδαμίνης-φαλλοϊδίνης. Η φαλλοϊδίνη συνδέεται ειδικά με τα μικροϊνίδια της ακτίνης με ταυτόχρονο φθορισμό της ροδαμίνης. Ο φθορισμός της ροδαμίνης αυξάνεται με τη σύνδεση της ροδαμίνης-φαλλοϊδίνης με τη πολυμερή ακτίνη και το φαινόμενο ολοκληρώνεται σε είκοσι λεπτά. Τα κύτταρα LNCaP καλλιεργήθηκαν πάνω σε καλυπτρίδες οι οποίες

προηγούμενως είχαν επικαλυφθεί με πολυ-L-λυσίνη (επώαση 5 λεπτά με 0,1 mg/ml διαλύματος πολυ-L-λυσίνη και έκπλυση 2 φορές με PBS) για τουλάχιστον 24 ώρες με θρεπτικό χωρίς ορό. Στην συνέχεια έγινε επώαση των κυττάρων με DHT ( $10^{-7}$  M) για 10 λεπτά. Μετά το τέλος της επώασης τα κύτταρα εκπλύθηκαν με διάλυμα PEM για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα μονιμοποίησης για 10 λεπτά. Στη συνέχεια μετά από έκπλυση 3 φορές με PBS πραγματοποιήθηκε δύο φορές αναγωγή με 0,1% NaBH<sub>4</sub> σε PBS για 10 λεπτά και πάλι έκπλυση 2 φορές με PBS. Ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά με 0,5% BSA για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων σύνδεσης και επώαση με διάλυμα ροδαμίνης φαλλοϊδίνης (1: 8 v/v) σε PBS-0,5% BSA. Μετά το τέλος της επώασης τα κύτταρα εκπλύθηκαν με 3 φορές με PBS και μεταμονιμοποιήθηκαν με 3,7% φορμαλδεΰδη σε PBS. Ακολούθησε έκπλυση πρώτα με 50 mM NH<sub>4</sub>Cl και μετά με PBS. Οι καλυπτρίδες με τα μονιμοποιημένα κύτταρα τοποθετήθηκαν ανάστροφα επάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες στο κέντρο των οποίων βρίσκονταν 20 μl διάλυμα προστασίας φθορισμού. Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -20°C έως τη στιγμή της παρατήρησής τους στο μικροσκόπιο συνεστίασης.

## **12. Προσδιορισμός της μονομερούς (G) και της πολυμερούς (F) ακτίνης στα κύτταρα LNCaP**

Για τον προσδιορισμό της μονομερούς (διαλυτή στο Triton ) και πολυμερούς (μη διαλυτή στο Triton) ακτίνης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western blotting)

### **A. Προετοιμασία κυτταρικών εκχυλισμάτων**

#### **Υλικά -Συσκευές**

Κυτταρική σειρά LNCaP ( ACC 256 DSMZ Germany)  
 Πλάκες καλλιέργειας 6 οπών (Corning & Costar, USA)  
 Triton X-100 (Merck, Germany)  
 Tris -HCl (Bio-Rad laboratories CA, USA)  
 Σακχαρόζη (Sigma, USA)  
 Ροδαμίνη-Φαλλοϊδίνη (Molecular Probes, USA)  
 PMSF (Sigma, USA)  
 Λευπεπτίνη (Sigma, USA)  
 Απροτινίνη (Sigma, USA)  
 Ορθοβαναδικό νάτριο (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) (Sigma, USA)  
 EGTA (Sigma, USA)  
 Φθοριούχο νάτριο (NaF) (Sigma, USA)

Υπερχλωρικό οξύ (PCA)Διαλύματα

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS  
 Διάλυμα λύσης με Triton : 0,3% Triton X-100  
 5mM Tris pH 7,4  
 2mM EGTA  
 300mM sucrose  
 2μM φαλλοϊδίνη  
 1mM PMSF  
 10μg/ml λευπεπτίνη  
 20μg/ml απροτινίνη  
 1mM ορθοβαναδικό νάτριο  
 50mM φθοριούχο νάτριο

Μέθοδος

Τα κύτταρα εκπλύθηκαν 2 φορές με κρύο PBS και επώαστηκαν με 500μl/οπή διάλυμα λύσης για 5 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια συλλέχθηκε το διάλυμα λύσης με τις διαλυτές στο Triton πρωτεΐνες οι οποίες και κατακρημνίστηκαν με ίσο όγκο 6% PCA. Η μη διαλυτές στο Triton πρωτεΐνες οι οποίες και παρέμειναν στην πλάκα καλλιέργειας κατακρημνίστηκαν με 1ml 3% PCA. Ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford που περιγράφηκε στη παράγραφο Υλικά και Μέθοδοι4.

B. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)Υλικά -Συσκευές

Tris-HCl (Sigma, USA)  
 Ακρυλαμίδιο (Pharmacia LKB, UK)  
 N,N μεθυλεν-δισ- ακρυλαμίδιο: Bis-ακρυλαμίδιο (Pharmacia LKB, UK)  
 Υπερθεικό αμμώνιο (Ammonium persulfate APS) (Sigma, USA)  
 N,N,N,N τετρα-μεθυλενο-αιθυλ-διαμίνη (TEMED) (Sigma, USA)  
 Δωδεκακυλοθειικό νάτριο (Sodium dodecyl sulphate, SDS) (Sigma, USA)  
 DTT (Sigma, USA)  
 β-μερκαπτοαιθανόλη  
 Γλυκερόλη (Sigma, USA)  
 Κυανούν της βρωμοφαινόλης (Sigma, USA)  
 Γλυκίνη (Merck, Germany)  
 Protein markers (BioRad)  
 Συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad)

Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης: Tris-HCl 1 M pH 6,8  
 Συγκεντρωμένο διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου: 10% υπερθειικό αμμώνιο (APS)  
 Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης 2x pH 6,8: 125mM Tris-HCl  
 4% SDS  
 10% γλυκερόλη  
 0,02% κυανού της βρωμοφαινόλης και  
 4%μερκαπτοαιθανόλη (προστίθεται λίγο πριν τη χρήση του διαλύματος).

Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% : 29.2 % (w/v) ακρυλαμίδιο,  
 0,8% (w/v) N,N μεθυλενο-δισ- ακρυλαμίδη

Πήκτωμα επιστοίβαξης: 5,1 % διάλυμα ακρυλαμίδης  
 0.1% υπερθειικό αμμώνιο (APS)  
 0.1% TEMED  
 0,1 % SDS  
 12,5 % διάλυμα επιστοίβαξης

Πήκτωμα διαχωρισμού: 0,5 % διάλυμα ακρυλαμίδης  
 0.1% υπερθειικό αμμώνιο (APS)  
 0.1% (TEMED)  
 0,1 % SDS,  
 25 % διάλυμα διαχωρισμού.

10x Διάλυμα ηλεκτροφόρησης pH 8,3: 0,25 mM Tris-HCl  
 1,92 mM Γλυκίνη  
 1% SDS

### Μέθοδος

Με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Βασίζεται στην ιδιότητα των πρωτεϊνών να είναι θετικά ή αρνητικά φορτισμένες και έτσι να μετακινούνται προς τον θετικό ή τον αρνητικό πόλο όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο. Ο βαθμός μετακίνησής τους εξαρτάται από την πυκνότητα του φορτίου της κάθε πρωτεΐνης, δηλαδή, το λόγο “φορτίο/μάζα”.

Η ηλεκτροφόρηση των κυτταρικών πρωτεϊνικών κλασμάτων, για τον προσδιορισμό της μονομερούς και της πολυμερούς ακτίνης που περιέχουν, έγινε σε σύστημα ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης, κατά SDS σύμφωνα με τον (Laemmli 1970). Ως μέσο υποστήριξης χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδιου όπου, κάτω από συνθήκες αποδιάταξης, η μετακίνηση των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι απολύτως ανάλογη με τον λογάριθμο της μάζας τους.

Η συλλογή των κυτταρικών πρωτεϊνών έγινε σε διάλυμα που περιείχε δωδεκακυλοθειικό νάτριο (SDS), ένα απορρυπαντικό που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης ενώ τα ανιόντα του δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών γεγονός που δίνει στο σύμπλοκο

του SDS με την αποδιαταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή διαχωρισμού (8% πολυακρυλαμίδη). Τα δείγματα και οι πρωτεϊνικοί markers (γνωστού μοριακού βάρους) έβρασαν σε υδατόλουτρο για 3-4 λεπτά στους 100°C για την μετουσίωση των πρωτεϊνών και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια του πηκτώματος επιστοίβαξης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου με σταθερή τάση 800mV αρχικά και 1500mV μετά το πέρασμα του μετώπου των πρωτεϊνών στην πηκτή διαχωρισμού.

#### Γ. Μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

##### Υλικά -Συσκευές

Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,45 μM (Sigma, USA)  
Χαρτί Whatman 3MM  
Μεθανόλη (Lab-Scan Analytical Sciences, Ireland)  
Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών (Hoeffer –Bio-Rad, USA)

##### Διαλύματα

Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών: 10% διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10x  
20% μεθανόλη

##### Μέθοδος

Οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν κατά την SDS ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδιου μεταφέρθηκαν με αποτύπωση σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος και τη βοήθεια κατασκευής με τη μορφή ενός «σάντουιτς». Όλα τα υλικά της κατασκευής διαβράχθηκαν πρώτα στο διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα πάνω στο σφουγγάρι της συσκευής μεταφοράς πρωτεϊνών τοποθετήθηκε ένα χαρτί Whatman πάνω σε αυτό η πηκτή, στη συνέχεια η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης, ένα ακόμη χαρτί Whatman και τέλος το δεύτερο σφουγγάρι της συσκευής. Η μεταφορά επιτελείται με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος εντάσεως 350 mA για 1,5-2 ώρες.

#### Δ. Ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη

##### Υλικά -Συσκευές

Tris-HCl (Sigma, USA)  
Χλωριούχο νάτριο NaCl (Sigma, USA)  
Tween-20 (Sigma, USA)

Ξηρό γάλα με χαμηλά λιπαρά

Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά της ακτίνης (Amersham Pharmacia, UK)

Δεύτερο αντίσωμα κατά των ανοσοσφαιρινών ποντικού συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση του ραπανιού HRP Horseradish peroxidase (Chemicon Temecula CA)

Αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωτάγειας ECL (Enhanced Chemiluminescence) (NEN, USA)

Ακτινογραφικό φιλμ υψηλής ευαισθησίας ECL (Hyper film-ECL) (Amersham USA)

#### Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-φυσιολογικού ορού με Tween-20 (TBS-T) pH 7,6:

20 mM Tris-HCl

137 mM NaCl

0,1 % Tween-20

#### Μέθοδος

Η μέθοδος της ανοσοανίχνευσης βασίζεται στη σύνδεση ειδικού αντισώματος με την πρωτεΐνη που θέλουμε να ανιχνεύσουμε και η οποία με την τεχνική της αποτύπωσης βρίσκεται πάνω στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Ακολουθεί χρήση δευτέρου αντισώματος ενάντια στον αντι-ορό του ζώου στο οποίο αναπτύχθηκε το πρώτο αντίσωμα, το οποίο είναι συνδεδεμένο, μέσω χημικού δεσμού, με το ένζυμο υπεροξειδάση του ραπανιού (HRP, Horseradish Peroxidase). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ανίχνευση της θέσης του ενζύμου η οποία στη πραγματικότητα είναι και η θέση της πρωτεΐνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο εμφάνισης ECL. Αντίδραση της υπεροξειδάσης με το υπόστρωμα έχει ως αποτέλεσμα τη παραγωγή χημειοφωτάγειας η οποία και ανιχνεύεται πάνω σε ακτινογραφικό φιλμ.

Η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης με τις πρωτεΐνες που προέκυψε από την διαδικασία της αποτύπωσης επώαστηκε κατ'αρχήν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή όλη τη νύχτα στους 4°C, υπό ανάδευση με 5 % ξηρό γάλα με χαμηλά λιπαρά για να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις. Στη συνέχεια επώαστηκε με το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά της ακτίνης σε συγκέντρωση 1: 400 σε TBS-T για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Μετά το τέλος της επώασης ακολούθησε έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T για μία φορά επί 15 λεπτά και για δύο φορές επί 5 λεπτά και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα σε συγκέντρωση 1: 10000 σε TBS-T κατά αντιορού ποντικού συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση του ραπανιού για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια μετά από έκπλυση για μία φορά επί 15 λεπτά και για δύο φορές επί 5 λεπτά,

η μεμβράνη επώαστηκε για 2-3 λεπτά με τα αντιδραστήρια ανίχνευσης ECL σε σκοτεινό χώρο και εκτέθηκε σε φιλμ εμφάνισης υψηλής ευαισθησίας μέσα σε κασέτα εμφάνισης για διάφορα χρονικά διαστήματα. Η ένταση των ζωνών πάνω στο φιλμ ποσοτικοποιήθηκαν με κατάλληλο software (Molecular analyst, Bio-Rad USA).



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

## Α. Εξωγενή Οπιοειδή

**Επίδραση οπιοειδών αγωνιστών παρουσία ή απουσία ανταγωνιστή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό**

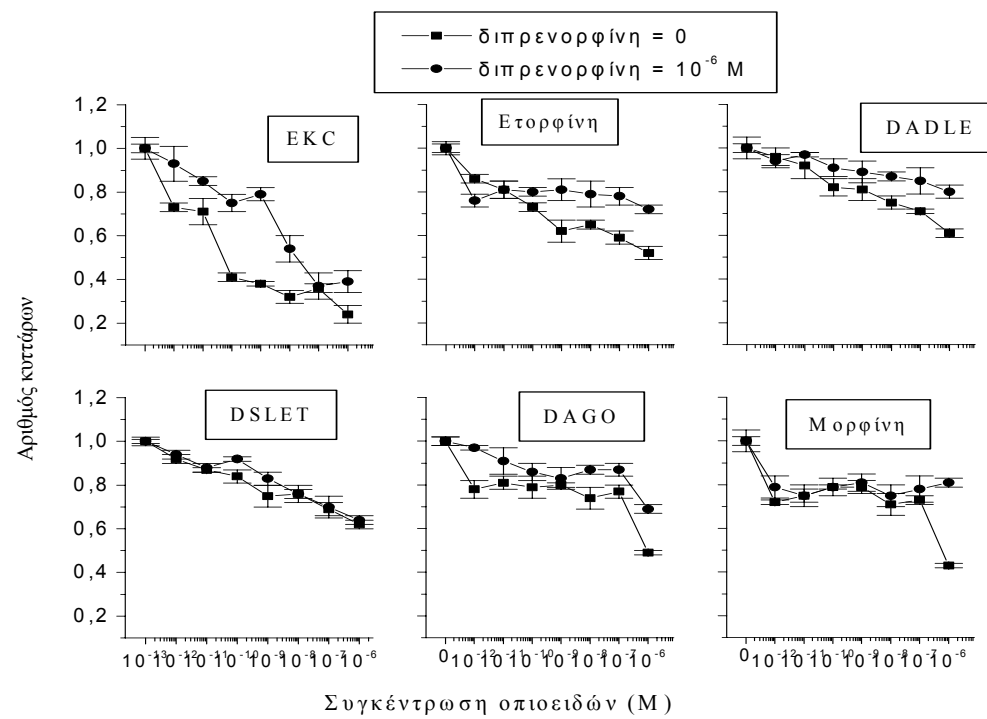
Για τα πειράματα μελέτης της επίδρασης των οπιοειδών αγωνιστών στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των τριών διαφορετικών καρκινικών κυτταρικών σειρών του προστάτου (DU-145, PC3, LNCaP) χρησιμοποιήθηκαν αγωνιστές υψηλής συγγένειας για τους διαφορετικούς οπιοειδείς υποδοχείς σε συγκεντρώσεις  $10^{-12}$  –  $10^{-6}$  M. Ως γενικός οπιοειδής ανταγωνιστής χρησιμοποιήθηκε η Διπρενορφίνη σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M. Σε αυτή την συγκέντρωση, προηγούμενες μελέτες μας (Hatzoglou et al. 1996a) έδειξαν ότι η διπρενορφίνη συνδέεται σε όλους τους τύπους των οπιοειδών υποδοχέων. Συγκεκριμένα, οι αγωνιστές που χρησιμοποιήθηκαν και οι υποδοχείς με τους οποίους συνδέεται ο καθένας είναι οι ακόλουθοι (Castanas et al. 1985a, b):

<u>Αγωνιστής</u>	<u>Υποδοχείς</u>
Αιθυλκετοκυκλοζοσίνη (EKC)	μ, δ, κ <sub>1</sub> , κ <sub>2</sub>
Ετορφίνη	μ, δ, κ <sub>2</sub> , κ <sub>3</sub>
Μορφίνη	μ
[D-ala <sup>2</sup> , D-leu <sup>5</sup> ]-Εγκεφαλίνη (DADLE)	μ, δ
[D-Ser <sup>2</sup> , Leu <sup>5</sup> ]-Εγκεφαλίνη, Thr <sup>6</sup> (DSLET)	δ
[D-Ala <sup>2</sup> , N-Me-Phe <sup>4</sup> , Gly <sup>5</sup> -ol]-Εγκεφαλίνη (DAGO)	μ
<u>Ανταγωνιστής</u>	
Διπρενορφίνη	μ, δ, κ <sub>1</sub> , κ <sub>2</sub> , κ <sub>3</sub>

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες επίπεδου πυθμένα και η επίδραση των οπιοειδών μελετήθηκε μετά από δύο κυτταρικούς κύκλους, (συνολικά για 4 μέρες όσον αφορά τις κυτταρικές σειρές DU-145 και PC3 και για 6 μέρες τα κύτταρα LNCaP). Ως πρώτη ημέρα θεωρείται η ημέρα πρόσθεσης των διαφόρων οπιοειδών αγωνιστών-ανταγωνιστών.

Στο σχήμα-10 φαίνονται τα αποτελέσματα της επίδρασης των οπιοειδών αγωνιστών στην κυτταρική σειρά DU-145 παρουσία ή απουσία ανταγωνιστή. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την τέταρτη ημέρα επίδρασης, ημέρα όπου παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη δράση τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως καμπύλες δόσης-απόκρισης και εκφράζονται ως οι

λόγοι σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες ( κύτταρα τα οποία δεν έχουν εκτεθεί σε κανένα παράγοντα). Όπως φαίνεται λοιπόν, στο σχήμα-10 η ΕΚC ήταν ο οπιοειδής αγωνιστής που παρουσίασε τη μεγαλύτερη στατιστικώς σημαντική καταστολή του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων DU-145. Η καταστολή ήταν διφασική, υποδηλώνοντας δύο θέσεις σύνδεσης, με ποσοστά μέγιστης καταστολής 29% και 76% των κυττάρων μαρτύρων. Ενώ η μέση κατασταλτική συγκέντρωση ( $IC_{50}$ ) είναι 0,0001nM και 0,14nM αντίστοιχα (πίνακας III). Όσον αφορά τους υπόλοιπους οπιοειδείς αγωνιστές η δράση τους ήταν μικρότερη, προκάλεσε όμως καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των DU-145 κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.

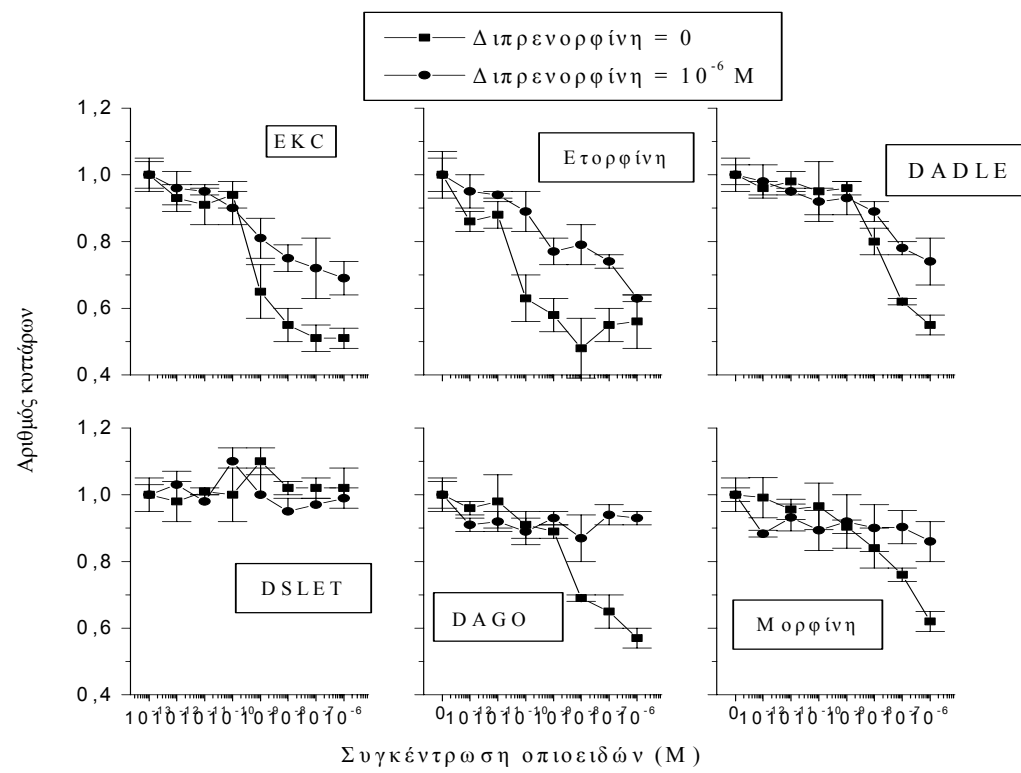


**Σχήμα-10. Επίδραση των οπιοειδών αγωνιστών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων DU-145.** Τα κύτταρα επωάστηκαν για 4 μέρες με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις διαφόρων οπιοειδών παρουσία ή απουσία του γενικού ανταγωνιστή των οπιοειδών, διπρενορφίνη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγοι με τα κύτταρα μάρτυρες (control) και παρουσιάζεται η μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τεσσάρων πειραμάτων.

Τα ποσοστά της μέγιστης καταστολής τους και οι τιμές της μέσης κατασταλτικής συγκέντρωσης για τον καθένα αγωνιστή φαίνονται στον πίνακα III.

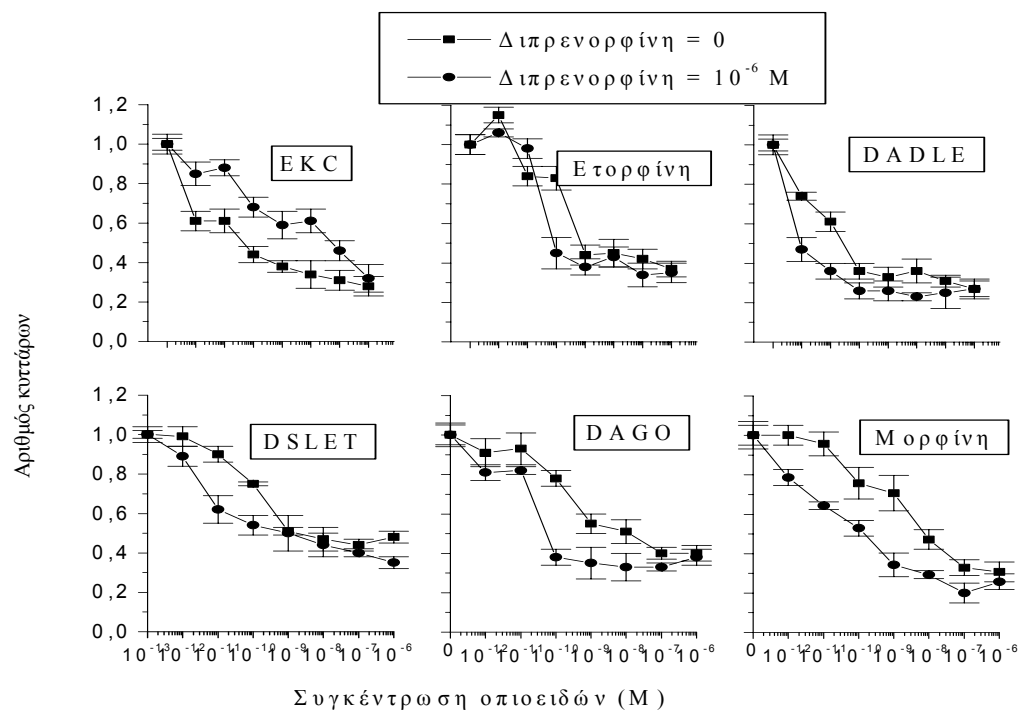
Η παρουσία ανταγωνιστή (διπρενορφίνη σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M) ανέστειλε μερικώς την κατασταλτική δράση της EKC μειώνοντας τα ποσοστά μέγιστης καταστολής σε 20% και 61%. Για τους υπόλοιπους αγωνιστές, η ανταγωνιστική δράση της διπρενορφίνης ήταν πολύ μικρή όπως στην περίπτωση της ετορφίνης, του DAGO και του DADLE, έως ανύπαρκτη όπως στην περίπτωση του DSLET και της μορφίνης.

Στην κυτταρική σειρά PC3, όπως φαίνεται και στο σχήμα-11, την μεγαλύτερη ανασταλτική δράση, κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο, είχε η ετορφίνη με ποσοστό μέγιστης αναστολής 44% και  $IC_{50}$  0,034 nM. Ακολουθούν η EKC σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από  $10^{-10}$  M, το DAGO σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από  $10^{-10}$  M, το DADLE σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από  $10^{-9}$  M και η μορφίνη σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από  $10^{-9}$  M. Ο αγωνιστής DSLET δεν είχε καμία επίδραση. Τα ποσοστά της μέγιστης καταστολής και οι τιμές της μέσης κατασταλτικής συγκέντρωσης παρουσιάζονται στον πίνακα III. Παρουσία ανταγωνιστή η δράση των οπιοειδών αγωνιστών ήταν μερικώς αναστρέψιμη. Έτσι παρατηρήθηκε μερική αναστολή της δράσης της ετορφίνης παρουσία διπρενορφίνης και το ποσοστό μέγιστης καταστολής μειώθηκε από 44% σε 37%. Σύγχρονη επώαση της EKC με διπρενορφίνη είχε ως αποτέλεσμα το ποσοστό μέγιστης καταστολής να μειωθεί από 49% σε 31%, και του DADLE από 45% σε 26%. Η διπρενορφίνη προκάλεσε σχεδόν πλήρης αναστολή της δράσης του DAGO και της μορφίνης μειώνοντας το ποσοστό μέγιστης καταστολής από 46% σε 7% και από 38% σε 9% αντίστοιχα.



**Σχήμα-11. Επίδραση των οπιοειδών αγωνιστών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων PC3.** Τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 μέρες με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις διαφόρων οπιοειδών αρουσία ή απουσία του γενικού ανταγωνιστή των οπιοειδών, διπρενορφίνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγοι με τα κύτταρα μάρτυρες (control) και παρουσιάζεται η μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τεσσάρων πειραμάτων.

Το σχήμα-12 δείχνει τις καμπύλες δόσης-απάντησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων LNCaP στους διάφορους οπιοειδείς αγωνιστές παρουσία ή όχι ανταγωνιστή (διπρενορφίνης). Όλοι οι οπιοειδείς αγωνιστές των οποίων η δράση ελέγχθηκε, ελάττωναν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων LNCaP κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο.



**Σχήμα-12. Επίδραση των οπιοειδών αγωνιστών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων LNCaP.** Τα κύτταρα επωάστηκαν για 6 μέρες με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις διαφόρων οπιοειδών παρουσία ή απουσία του γενικού ανταγωνιστή των οπιοειδών, διπρενορφίνη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγοι με τα κύτταρα μάρτυρες (control) και παρουσιάζεται η μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τεσσάρων πειραμάτων.

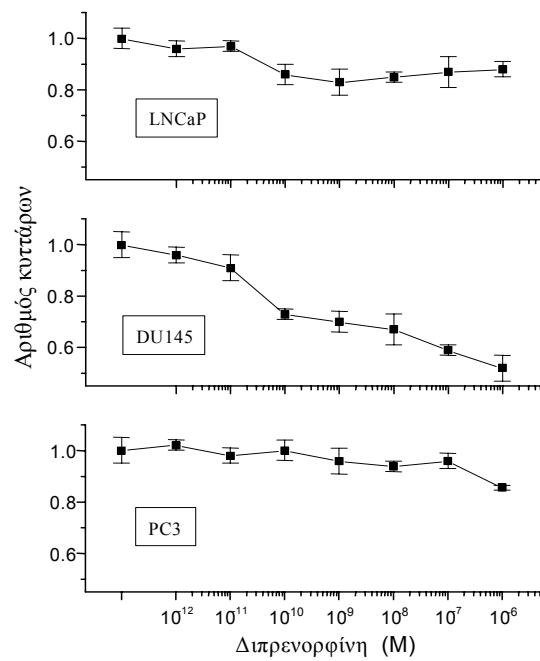
Τη μεγαλύτερη δράση είχε η EKC με ποσοστό μέγιστης αναστολής 72% παρουσιάζοντας σημαντική δράση από χαμηλή συγκέντρωση η οποία ήταν μερικώς αναστρέψιμη από τη διπρενορφίνη. Η διπρενορφίνη δεν επηρέαζε καθόλου τη δράση της ετορφίνης ενώ ενίσχυε την κατασταλτική δράση των DADLE, DSLET, DAGO και της μορφίνης (Πίνακας III).

#### **Επίδραση του οπιοειδούς ανταγωνιστή, διπρενορφίνη, στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων DU-145, PC3 και LNCaP**

Το γεγονός ότι σε μερικές περιπτώσεις, η προσθήκη διπρενορφίνης στα κύτταρα ενίσχυε την κατασταλτική δράση ορισμένων οπιοειδών αγωνιστών υποδεικνύει ότι πιθανώς η διπρενορφίνη από μόνη της είχε κάποια ανασταλτική δράση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυτταρικών σειρών του προστάτου. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η επίδραση της διπρενορφίνης στον

κυτταρικό πολλαπλασιασμό και των τριών κυτταρικών σειρών για αντίστοιχα χρονικά διαστήματα με αυτά των οπιοειδών αγωνιστών.

Στο σχήμα-13 φαίνονται οι καμπύλες δόσης-απόκρισης της διπρενορφίνης στις τρεις κυτταρικές σειρές DU-145, PC3 και LNCaP. Στα κύτταρα LNCaP η διπρενορφίνη προκάλεσε μια μικρή ελάττωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων κυρίως σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από  $10^{-10}$  M. Η δράση αυτή της διπρενορφίνης θα μπορούσε να εξηγήσει τα αποτελέσματα της δράσης των οπιοειδών αγωνιστών παρουσία διπρενορφίνης ως ανταγωνιστή σε συγκέντρωση  $10^{-6}$ M. Δεν παρουσίαζε καμία επίδραση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC3, ενώ αντίθετα προκαλούσε δόσοεξαρτώμενη καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα κύτταρα DU-145.



**Σχήμα-13.** Επίδραση του οπιοειδούς ανταγωνιστή διπρενορφίνη στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των τριών καρκινικών κυτταρικών σειρών του προστάτου. Τα κύτταρα επώαστηκαν με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις διπρενορφίνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγοι με τα κύτταρα μάρτυρες (control) και παρουσιάζεται η μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τεσσάρων πειραμάτων.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙΙ. Δράση των οπιοειδών αγωνιστών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των τριών καρκινικών κυτταρικών σειρών του προστάτου.

Αγωνιστής	Ανταγωνιστής (διπρενορφίνη)	DU-145		PC3		LNCaP																																																																						
		IC <sub>50</sub> (nM)	Μέγιστη Αναστολή %	IC <sub>50</sub> (nM)	Μέγιστη Αναστολή %	IC <sub>50</sub> (nM)	Μέγιστη Αναστολή %																																																																					
EKC	-	0,001 ± 0,0001	29 ± 1,65	0,599 ± 0,03	49 ± 3,1	0,037 ± 0,0006	72 ± 3,7																																																																					
	+	0,14 ± 0,007	76 ± 3,9					Ετορφίνη	-	0,0012 ± 0,00006	20 ± 0,9	0,5 ± 0,037	31 ± 1,26	0,14 ± 0,006	68 ± 3,2	+	1,04 ± 0,052	61 ± 3,25	DADLE	-	0,0051 ± 0,00026	48 ± 2,3	0,034 ± 0,002	44 ± 2,43	0,12 ± 0,0082	63 ± 3,05	+	0,0001 ± 0,000008	28 ± 1,5	DSLET	-	0,62 ± 0,031	39 ± 1,95	10 ± 0,6	37 ± 2,03	0,035 ± 0,0018	65 ± 3,44	+	0,22 ± 0,011	20 ± 1,11	Μορφίνη	-	0,0496 ± 0,0344	38 ± 1,8	>10000	0	0,11 ± 0,0041	52 ± 2,7	+	2,49 ± 0,1345	36 ± 1,5	DAGO	-	0,0002 ± 0,000012	57 ± 2,85	1700 ± 73	38 ± 1,73	1,3 ± 0,048	70 ± 6,58	+	0,0023 ± 0,000135	19 ± 0,63	Διπρενορφίνη	-	0,0001 ± 0,000006	51 ± 2,8	>10000	9 ± 0,25	0,0066 ± 0,00042	74 ± 3,96	+	0,0082 ± 0,00051	31 ± 1,7	<b>Διπρενορφίνη</b>		1000
Ετορφίνη	-	0,0012 ± 0,00006	20 ± 0,9	0,5 ± 0,037	31 ± 1,26	0,14 ± 0,006	68 ± 3,2																																																																					
	+	1,04 ± 0,052	61 ± 3,25					DADLE	-	0,0051 ± 0,00026	48 ± 2,3	0,034 ± 0,002	44 ± 2,43	0,12 ± 0,0082	63 ± 3,05	+	0,0001 ± 0,000008	28 ± 1,5	DSLET	-	0,62 ± 0,031	39 ± 1,95	10 ± 0,6	37 ± 2,03	0,035 ± 0,0018	65 ± 3,44	+	0,22 ± 0,011	20 ± 1,11	Μορφίνη	-	0,0496 ± 0,0344	38 ± 1,8	>10000	0	0,11 ± 0,0041	52 ± 2,7	+	2,49 ± 0,1345	36 ± 1,5	DAGO	-	0,0002 ± 0,000012	57 ± 2,85	1700 ± 73	38 ± 1,73	1,3 ± 0,048	70 ± 6,58	+	0,0023 ± 0,000135	19 ± 0,63	Διπρενορφίνη	-	0,0001 ± 0,000006	51 ± 2,8	>10000	9 ± 0,25	0,0066 ± 0,00042	74 ± 3,96	+	0,0082 ± 0,00051	31 ± 1,7	<b>Διπρενορφίνη</b>		1000	40 ± 1,7	>10000	10 ± 0,22	>10000	15 ± 0,7						
DADLE	-	0,0051 ± 0,00026	48 ± 2,3	0,034 ± 0,002	44 ± 2,43	0,12 ± 0,0082	63 ± 3,05																																																																					
	+	0,0001 ± 0,000008	28 ± 1,5					DSLET	-	0,62 ± 0,031	39 ± 1,95	10 ± 0,6	37 ± 2,03	0,035 ± 0,0018	65 ± 3,44	+	0,22 ± 0,011	20 ± 1,11	Μορφίνη	-	0,0496 ± 0,0344	38 ± 1,8	>10000	0	0,11 ± 0,0041	52 ± 2,7	+	2,49 ± 0,1345	36 ± 1,5	DAGO	-	0,0002 ± 0,000012	57 ± 2,85	1700 ± 73	38 ± 1,73	1,3 ± 0,048	70 ± 6,58	+	0,0023 ± 0,000135	19 ± 0,63	Διπρενορφίνη	-	0,0001 ± 0,000006	51 ± 2,8	>10000	9 ± 0,25	0,0066 ± 0,00042	74 ± 3,96	+	0,0082 ± 0,00051	31 ± 1,7	<b>Διπρενορφίνη</b>		1000	40 ± 1,7	>10000	10 ± 0,22	>10000	15 ± 0,7																	
DSLET	-	0,62 ± 0,031	39 ± 1,95	10 ± 0,6	37 ± 2,03	0,035 ± 0,0018	65 ± 3,44																																																																					
	+	0,22 ± 0,011	20 ± 1,11					Μορφίνη	-	0,0496 ± 0,0344	38 ± 1,8	>10000	0	0,11 ± 0,0041	52 ± 2,7	+	2,49 ± 0,1345	36 ± 1,5	DAGO	-	0,0002 ± 0,000012	57 ± 2,85	1700 ± 73	38 ± 1,73	1,3 ± 0,048	70 ± 6,58	+	0,0023 ± 0,000135	19 ± 0,63	Διπρενορφίνη	-	0,0001 ± 0,000006	51 ± 2,8	>10000	9 ± 0,25	0,0066 ± 0,00042	74 ± 3,96	+	0,0082 ± 0,00051	31 ± 1,7	<b>Διπρενορφίνη</b>		1000	40 ± 1,7	>10000	10 ± 0,22	>10000	15 ± 0,7																												
Μορφίνη	-	0,0496 ± 0,0344	38 ± 1,8	>10000	0	0,11 ± 0,0041	52 ± 2,7																																																																					
	+	2,49 ± 0,1345	36 ± 1,5					DAGO	-	0,0002 ± 0,000012	57 ± 2,85	1700 ± 73	38 ± 1,73	1,3 ± 0,048	70 ± 6,58	+	0,0023 ± 0,000135	19 ± 0,63	Διπρενορφίνη	-	0,0001 ± 0,000006	51 ± 2,8	>10000	9 ± 0,25	0,0066 ± 0,00042	74 ± 3,96	+	0,0082 ± 0,00051	31 ± 1,7	<b>Διπρενορφίνη</b>		1000	40 ± 1,7	>10000	10 ± 0,22	>10000	15 ± 0,7																																							
DAGO	-	0,0002 ± 0,000012	57 ± 2,85	1700 ± 73	38 ± 1,73	1,3 ± 0,048	70 ± 6,58																																																																					
	+	0,0023 ± 0,000135	19 ± 0,63					Διπρενορφίνη	-	0,0001 ± 0,000006	51 ± 2,8	>10000	9 ± 0,25	0,0066 ± 0,00042	74 ± 3,96	+	0,0082 ± 0,00051	31 ± 1,7	<b>Διπρενορφίνη</b>		1000	40 ± 1,7	>10000	10 ± 0,22	>10000	15 ± 0,7																																																		
Διπρενορφίνη	-	0,0001 ± 0,000006	51 ± 2,8	>10000	9 ± 0,25	0,0066 ± 0,00042	74 ± 3,96																																																																					
	+	0,0082 ± 0,00051	31 ± 1,7					<b>Διπρενορφίνη</b>		1000	40 ± 1,7	>10000	10 ± 0,22	>10000	15 ± 0,7																																																													
<b>Διπρενορφίνη</b>		1000	40 ± 1,7	>10000	10 ± 0,22	>10000	15 ± 0,7																																																																					

Παρουσιάζεται η μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα της μέσης κατασταλτικής συγκέντρωσης (IC<sub>50</sub>) για τους διάφορους οπιοειδείς αγωνιστές η οποία υπολογίστηκε μετά από ανάλυση με προσέγγιση σιγμοειδούς καμπύλης των δεδομένων τα οποία παρουσιάζονται στα σχήματα 10-12 καθώς και της εκατοστιαίας αλλαγής σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Στην περίπτωση της EKC στην κυτταρική σειρά DU-145 η ανάλυση έγινε υπολογίζοντας δύο διαφορετικές θέσεις συνδέσεως (βλέπε σχήμα-10).



## **Συμπέρασμα**

Οι διάφοροι οπιοειδείς αγωνιστές και στις τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτου ανέστειλλαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Ο οπιοειδής αγωνιστής με τη μεγαλύτερη δράση και στις τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές ήταν η αιθυλκετοκυκλαζοσίνη. Σε αρκετές περιπτώσεις η δράση των οπιοειδών αναστέλλονταν (μερικώς ή πλήρως) από την παρουσία της διπρενορφίνης (γενικός οπιοειδής ανταγωνιστής). Επομένως, η δράση των οπιοειδών αγωνιστών πιθανώς να πραγματοποιείται μέσω οπιοειδών υποδοχέων αλλά όχι αποκλειστικά, δεδομένης της ανασταλτικής δράσεως αυτής καθ' αυτής της διπρενορφίνης σε μερικές περιπτώσεις (κυτταρική σειρά DU-145) και της μη πλήρους αναστολής της δράσεως των οπιοειδών αγωνιστών..

## **B. Καζομορφίνες**

Εκτός από τα οπιοειδή, αλκαλοειδή και πεπτίδια, έχει αναφερθεί ότι ορισμένα προϊόντα μερικής ενζυματικής διασπάσεως τροφικών πρωτεϊνών όπως οι καζεΐνες του γάλακτος, τα οποία παρουσιάζουν οπιοειδή δράση (Loukas et al. 1993; Teschemacher et al. 1997). Τα πεπτίδια αυτά (καζομορφίνες), μπορούν να απελευθερωθούν από τις καζεΐνες με τη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων *in vitro* και *in vivo* (βλέπε Εισαγωγή). Καζομορφίνες έχουν ανευρεθεί στον ορό μετά από λήψη γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων υποδηλώνοντας πιθανή δράση σε συγκεκριμένους ιστούς-στόχους. Έτσι μελετήθηκε η δράση των καζομορφινών σε κύτταρα καρκινικών σειρών προστάτου.

## **Επίδραση των καζομορφινών στον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών DU-145, PC3 και LNCaP παρουσία ή απουσία της οπιοειδούς διπρενορφίνης**

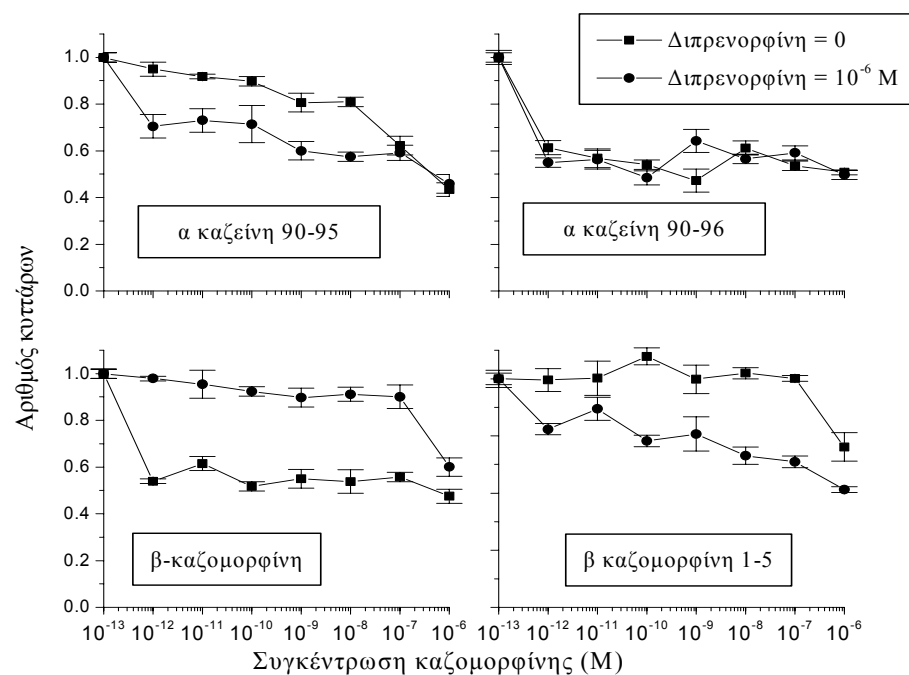
Μελετήθηκε η δράση τεσσάρων διαφορετικών πεπτιδίων (καζομορφίνες). Η α-καζεΐνη 90-95, και η 90-96 που προέρχονται από την α- καζεΐνη βοός και η β-καζομορφίνη και η β-καζομορφίνη 1-5 που προέρχονται από την β- καζεΐνη βοός. Η αλληλουχία των παραπάνω πεπτιδίων είναι η ακόλουθη:

1. α- καζεΐνη 90-95:                      Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu
2. α- καζεΐνη 90-96:                      Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu

3. β-καζομορφίνη: Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile  
 4. β-καζομορφίνη 1-5: Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly

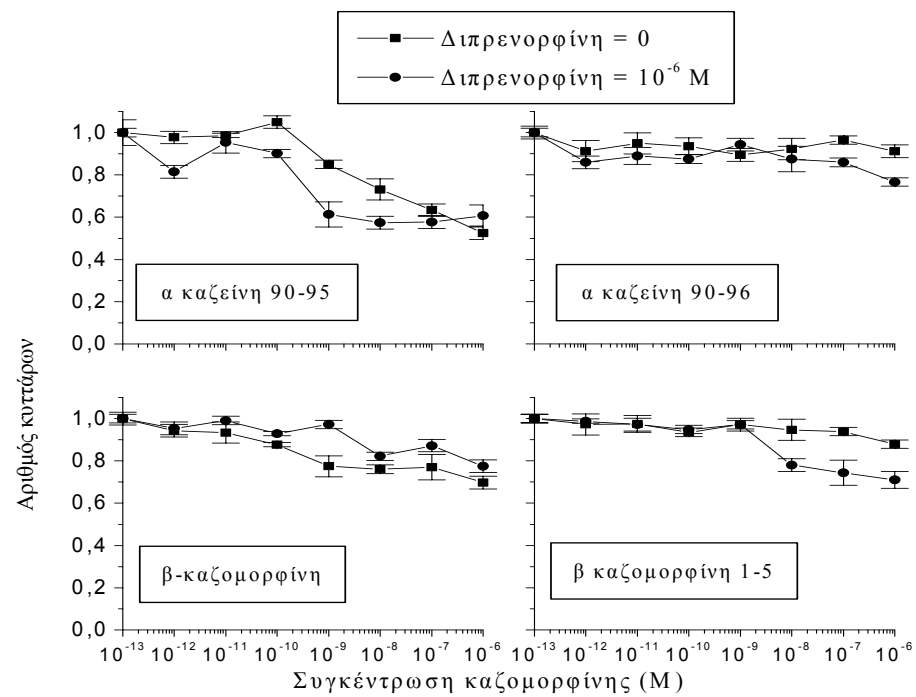
Οι συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων και επίδρασης με τις διάφορες καζομορφίνες ήταν όμοιες με αυτές στη μελέτη επίδρασης των εξωγενών οπιοειδών.

Στο σχήμα-14 φαίνεται η επίδραση των παραπάνω καζομορφινών στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων DU-145 παρουσία ή απουσία ανταγωνιστή (διπρενορφίνη) σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M. Όλες οι καζομορφίνες, ελάττωσαν τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Η κατασταλτική δράση της β-καζομορφίνης όμως, ήταν η μόνη που σε συγκεντρώσεις μικρότερες από  $10^{-6}$  M ήταν πλήρως αναστρέψιμη από την διπρενορφίνη. Η δράση της α-καζεΐνης 90-96 δεν επηρεαζόταν από τη διπρενορφίνη η οποία αντίθετα ενίσχυε την κατασταλτική δράση της α-καζεΐνης 90-95 και της β-καζομορφίνης 1-5. Τα ποσοστά μέγιστης καταστολής καθώς και οι τιμές της μέσης κατασταλτικής συγκέντρωσης ( $IC_{50}$ ) όλων των καζομορφινών δίνονται στον πίνακα IV



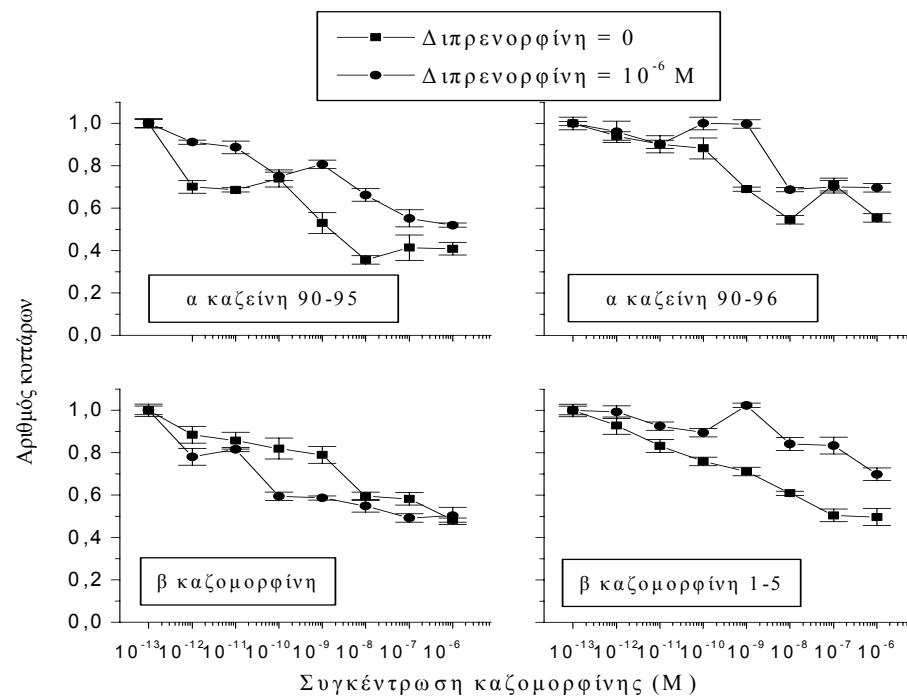
**Σχήμα-14. Δοσοεξαρτώμενη δράση των καζομορφινών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων DU-145.** Τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 μέρες με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις καζομορφινών παρουσία ή απουσία του γενικού ανταγωνιστή των οπιοειδών, διπρενορφίνη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγοι με τα κύτταρα μάρτυρες (control) και παρουσιάζεται η μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τεσσάρων πειραμάτων.

Οι καμπύλες δόσης-απόκρισης των καζομορφινών στα κύτταρα PC3 παρουσία ή απουσία  $10^{-6}$ M διπρενορφίνης φαίνονται στο σχήμα-15. Τη μεγαλύτερη κατασταλτική δράση στα κύτταρα PC3 παρουσίασε η  $\alpha$ -καζεΐνη 90-95, δράση που ενισχύονταν παρουσία διπρενορφίνης. Η  $\alpha$ -καζεΐνη 90-96 και η  $\beta$ -καζομορφίνη 1-5 δεν είχε καμία επίδραση στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Ενώ η  $\beta$ -καζομορφίνη παρουσίασε κατασταλτική δράση με μέγιστο ποσοστό καταστολής 30% δράση που ήταν μερικώς αναστρέψιμη από την διπρενορφίνη (πίνακας IV).



**Σχήμα-15. Δοσοεξαρτώμενη δράση των καζομορφινών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων PC3.** Τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 μέρες με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις καζομορφινών παρουσία ή απουσία του γενικού ανταγωνιστή των οπιοειδών, διπρενορφίνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγοι με τα κύτταρα μάρτυρες (control) και παρουσιάζεται η μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τεσσάρων πειραμάτων.

Όλες οι καζομορφίνες η δράση των οποίων ελέγχθηκε στα κύτταρα LNCaP είχε ως αποτέλεσμα δοσοεξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων (σχήμα-16) Τη μεγαλύτερη δράση είχε η  $\alpha$ -καζεΐνη 90-95 με μέγιστα ποσοστά καταστολής 30% και 59% (πίνακας IV). Η κατασταλτική δράση όλων των καζομορφινών ήταν μερικώς αναστρέψιμη από την διπρενορφίνη εκτός από την περίπτωση της  $\beta$ -καζομορφίνης της οποίας η δράση ενισχυόταν από την διπρενορφίνη.



**Σχήμα-16. Δοσοεξαρτώμενη δράση των καζομορφινών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων LNCaP.** Τα κύτταρα επώαστηκαν για 6 μέρες με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις καζομορφινών παρουσία ή απουσία του γενικού ανταγωνιστή των οπιοειδών, διπρενορφίνη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγοι με τα κύτταρα μάρτυρες (control) και παρουσιάζεται η μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τεσσάρων πειραμάτων.

### Συμπέρασμα

Από τις καζομορφίνες η δράση των οποίων ελέγχθηκε, η  $\alpha$  καζεΐνη 90-95 παρουσίασε τη μέγιστη καταστολή στα κύτταρα LNCaP και PC3, ενώ στα κύτταρα DU-145 η  $\beta$ -καζομορφίνη. Η δράση τους ήταν δοσοεξαρτώμενη και σε κάποιες περιπτώσεις πλήρως ή μερικώς αναστρέψιμη από την διπρενορφίνη ενώ παρατηρήθηκε και το φαινόμενο της ενίσχυσης της δράσης τους παρουσία διπρενορφίνης, όπως για παράδειγμα στη  $\beta$  καζομορφίνη 1-5 στα κύτταρα DU-145. Τα ανωτέρω αποτελέσματα υποδηλώνουν την μερική τουλάχιστον συμμετοχή οπιοειδών υποδοχέων στην δράση των καζομορφινών.

ΠΙΝΑΚΑΣ IV . Δράση των οπιοειδών αγωνιστών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των τριών καρκινικών κυτταρικών σειρών του προστάτου.

Αγωνιστής	Ανταγωνιστής (διπρενορφίνη)	DU-145		PC3		LNCaP	
		IC <sub>50</sub> (nM)	Μέγιστη Αναστολή %	IC <sub>50</sub> (nM)	Μέγιστη Αναστολή %	IC <sub>50</sub> (nM)	Μέγιστη Αναστολή %
<b>α- καζεΐνη 90-95</b>	-	137 ± 7,85	57 ± 1,65	6,92 ± 0,3	47 ± 2,1	0,064 ± 0,0003 0,94 ± 0,04	30 ± 1,7 59 ± 2,4
	+	0,0028 ± 0,0002	55 ± 3,9	0,37 ± 0,0175	39 ± 1,26	3,9 ± 0,165	48 ± 2,2
<b>α- καζεΐνη 90-96</b>	-	0,0002 ± 0,000015	49 ± 2,1	>10000	9 ± 0,43	0,19 ± 0,0072	40 ± 2,05
	+	0,0002 ± 0,000019	50 ± 3,5	0,13 ± 0,0069	24 ± 1,23	3,8 ± 0,18	30 ± 1,44
<b>β-καζομορφίνη</b>	-	0,0001 ± 0,000004	52 ± 1,95	0,096 ± 0,0047	30 ± 1,63	0,62 ± 0,038	52 ± 2,43
	+	>1000	5 ± 0,21	1700	23 ± 1,17	0,0038 ± 0,00022	50 ± 2,64
<b>β-καζομορφίνη 1-5</b>	-	1000	30 ± 1,7	0,19 ± 0,0077	13 ± 0,39	0,065 ± 0,0041	50 ± 2,88
	+	0,052 ± 0,0036	39 ± 1,85	5,2 ± 0,29	29 ± 1,43	0,039 ± 0,018	45 ± 2,23

Παρουσιάζεται η μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα της μέσης κατασταλτικής συγκέντρωσης (IC<sub>50</sub>) για τους διάφορους οπιοειδείς αγωνιστές η οποία υπολογίστηκε μετά από ανάλυση με προσέγγιση σιγμοειδούς καμπύλης των δεδομένων τα οποία παρουσιάζονται στα σχήματα 14-16 καθώς και της εκατοστιαίας αλλαγής σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.

**Γ. Συνθετικά ανάλογα καζομορφινών**

Λόγω της οπιοειδούς δράσης που παρουσιάζουν οι καζομορφίνες έχει γίνει σύνθεση διαφόρων αναλόγων τους στη προσπάθεια είτε ενίσχυσης της δραστηριότητας τους είτε στην δημιουργία καζομορφινών εκλεκτικών για συγκεκριμένους τύπους υποδοχέων. Επιπλέον, ανάλογα των καζομορφινών ή άλλων ενδογενών ή εξωγενών πεπτιδίων έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της δράσεως των οπιοειδών, και την διερεύνηση του τρόπου συνδέσεως στους διαφόρους τύπους οπιοειδών υποδοχέων. Στο τμήμα αυτό της διατριβής, μελετήσαμε διάφορα ανάλογα καζομορφινών, τα οποία είχαν συντεθεί από συνεργαζόμενα εργαστήρια, ως προς τη δράση τους στο κυτταρικό σύστημα το οποίο μελετήσαμε (καρκινικές σειρές του προστάτου). Τα ανάλογα αυτά, παρουσίαζαν είτε αγωνιστική είτε ανταγωνιστική δράση σε άλλα ιστικά ή κυτταρικά συστήματα.

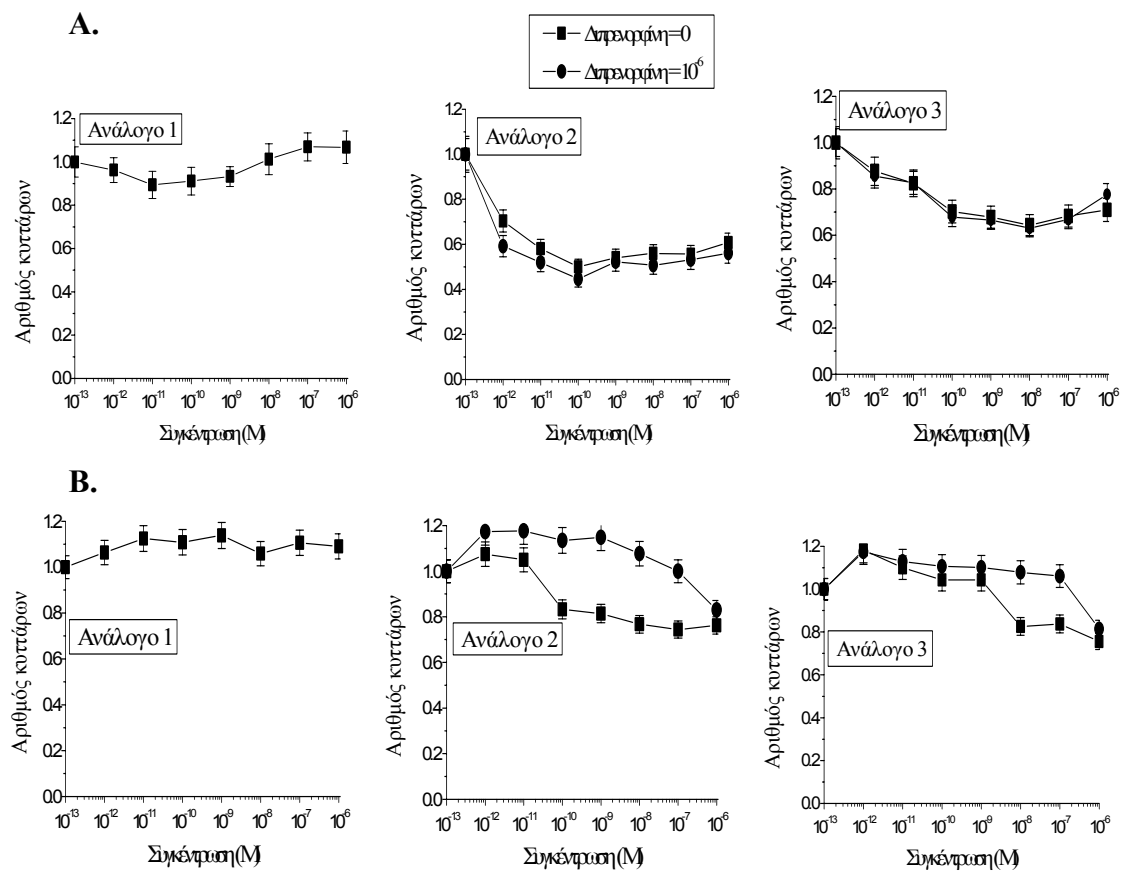
**Επίδραση αναλόγων των καζομορφινών στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων DU-145, PC3 παρουσία ή απουσία ανταγωνιστή**

Στη προκειμένη περίπτωση μελετήθηκε η δράση αναλόγων της β καζομορφίνης 1-5 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly) όπου στη θέση 2 ή 3 έχει προστεθεί μία πλευρική ομάδα. Χρησιμοποιήθηκαν τρία ανάλογα η αλληλουχία των οποίων είναι η ακόλουθη:

1. Tyr-ProΨ(CH<sub>2</sub>-NH)-Phe-Pro-Gly
2. Tyr-Pro-Phe Ψ(CH<sub>2</sub>-N)-Pro-Gly
3. Tyr-ProΨ(CHOH-CH<sub>2</sub>-NH)-Phe-Pro-Gly

Μελέτες του εργαστηρίου το οποίο συνέθεσε τα ανωτέρω ανάλογα αναφέρουν ότι το πρώτο ανάλογο παρουσιάζει δράση ανταγωνιστή, ενώ τα άλλα δύο δράση αγωνιστή (Delaet et al. 1992). Στις καρκινικές σειρές του προστάτου και τα δύο ανάλογα (αγωνιστές) ελάττωναν το ρυθμό πολλαπλασιασμού τόσο των κυττάρων DU-145 όσο και των PC3 κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο (Σχήμα-17). Η παρουσία της διπρενορφίνης ανέστειλε μερικώς τη δράση τους, γεγονός που υποδηλώνει δράση μέσω οπιοειδών υποδοχέων. Εξάιρεση αποτελεί η β καζομορφίνη 1-5 [Pro<sup>2</sup>Ψ(CHOH-CH<sub>2</sub>-NH)] στα κύτταρα DU-145 όπου η δράση της δεν επηρεαζόταν από την παρουσία της διπρενορφίνης. Το μέγιστο ποσοστό αναστολής (55%) παρατηρήθηκε

από τη β καζομορφίνη 1-5 [Pro3Ψ(CH<sub>2</sub>-N)] στα κύτταρα DU-145. Καμμία επίδραση δεν είχε στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό το ανάλογο-ανταγωνιστής όπως ήταν αναμενόμενο, υποδηλώνοντας αμιγή οπιοειδή ανταγωνιστική δράση.



**Σχήμα-17.** Δοσοεξαρτώμενη δράση αναλόγων των καζομορφινών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων DU-145 (A) και PC3 (B). Τα κύτταρα επωάστηκαν για 4 μέρες με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις των αναλόγων παρουσία ή απουσία του γενικού ανταγωνιστή των οπιοειδών, διπρενορφίνη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγοι με τα κύτταρα μάρτυρες (control) και παρουσιάζεται η μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τεσσάρων πειραμάτων. Ανάλογο 1: β καζομορφίνη 1-5 [Pro2Ψ(CH<sub>2</sub>-NH)], ανάλογο 2: β-καζομορφίνη1-5 [Pro3Ψ(CH<sub>2</sub>-N)], βκαζομορφίνη1-5 [Pro2Ψ(CHOH-CH<sub>2</sub>-NH)]

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται το ποσοστό μέγιστης αναστολής και η μέση κατασταλτική συγκέντρωση (IC<sub>50</sub>) για τα ανάλογα της β καζομορφίνης 1-5 καθώς και για την ίδια τη β καζομορφίνη 1-5. Συγκρίνοντας τη δράση των αναλόγων με αυτή της β καζομορφίνης 1-5 παρατηρούμε ότι η πλευρική ομάδα CH<sub>2</sub>-N στη θέση 3 είχε ως αποτέλεσμα και στις δύο κυτταρικές σειρές αύξηση της μέγιστης αναστολής (πίνακαςV), με ταυτόχρονη ελάττωση της τιμής του IC<sub>50</sub> υποδεικνύοντας μεγαλύτερη δράση σε σχέση με αυτή της β καζομορφίνης 1-5.

**ΠΙΝΑΚΑΣ V.** Δράση των αναλόγων της β καζομορφίνης 1-5 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων **DU-145 και PC3**

Καζομορφίνη	διπρενορφίνη	Μέση κατασταλτική Συγκέντρωση (IC <sub>50</sub> ) (nM)		Μέγιστη Αναστολή %	
		DU-145	PC3	DU-145	PC3
		<b>β-καζομορφίνη 1-5</b> Pro3Ψ(CH2-NH)	-	-	-
<b>β-καζομορφίνη 1-5</b> Pro3Ψ(CH2-N)	-	0,0015±0,00007	0,06± 0,0034	55± 3	28± 1,2
	+	0,0007±0,00003	400± 21	50± 2,1	20± 1,01
<b>β-καζομορφίνη 1-5</b> Pro2Ψ(R-CHOH-CH2-NH)	-	0,1 ± 0,005	10± 0,53	25± 1,34	28± 1,62
	+	0,1± 0,0041	700± 38	25±1,22	20± 1,3
<b>β-καζομορφίνη 1-5</b>	-	1000	0,19± 0,009	30± 1,6	13± 0,53
	+	0,052± 0,0021	5,2± 0,29	39± 1,89	29± 1,28

Παρουσιάζεται η μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα του IC<sub>50</sub> για τις διάφορες καζομορφίνες όπως υπολογίστηκε μετά από ανάλυση με προσέγγιση σιγμοειδούς καμπύλης των δεδομένων τα οποία παρουσιάζονται στο σχήμα-17 καθώς και της εκατοστιαίας αλλαγής σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.

Από τα ανωτέρω αποτελέσματα φαίνεται ότι η προσθήκη της πλευρικής ομάδος στην β-καζομορφίνη 1-5 βελτιώνει κατά πολύ την δραστηριότητά τους στις κυτταρικές σειρές του προστάτου που μελετήθηκαν. Έτσι, στα πεπτιδία που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε αύξηση κατά πολύ την αγωνιστική τους δράσης, σε σύγκριση με την β-καζομορφίνη 1-5, κατά  $1 \times 10^6$  φορές τουλάχιστον. Η δράση των πεπτιδίων αυτών, διεκπεραιώνεται μέσω οπιοειδών υποδοχέων αλλά όχι αποκλειστικά, όπως φαίνεται από το γεγονός ότι δεν αναστέλλεται πλήρως από την σύγχρονη επίδραση οπιοειδών ανταγωνιστών. Σε κατωτέρω αποτελέσματα η δράση αυτή ταυτοποιήθηκε με την ανίχνευση της δεσμεύσεώς τους σε οπιοειδείς υποδοχείς.



### Γενικό Συμπέρασμα

Παρατηρούμε λοιπόν, ότι τόσο αλκαλοειδή οπιοειδή, οπιοειδή πεπτίδια αλλά και συνθετικά ανάλογα παρουσιάζουν δόσοεξαρτώμενη δράση σε καρκινικά κύτταρα του προστάτου αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με αυτή των καζομορφινών και των αναλόγων τους να είναι λιγότερο έντονη. Η δράση των οπιοειδών που μελετήθηκε, στις περισσότερες περιπτώσεις είναι αναστρέψιμη παρουσία οπιοειδούς ανταγωνιστή. Επομένως, και στον καρκίνο του προστάτου πιθανώς να πραγματοποιείται μέσω οπιοειδών υποδοχέων, αλλά όχι αποκλειστικά, δεδομένου ότι βασικά στοιχεία δράσεως μίας ουσίας μέσω υποδοχέων είναι:

- α. Η ανίχνευση και ταυτοποίηση υποδοχέων
- β. Το δόσοεξαρτώμενο της δράσεως
- γ. Η αναστολή της δράσεως μετά την προσθήκη ανταγωνιστού.

## ΣΥΝΔΕΣΗ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο πρώτο τμήμα της διατριβής δείχνουν ότι αλκαλοειδή και οπιοειδή πεπτίδια (τόσο συνθετικά όσο και προερχόμενα από την μερική διάσπαση τροφικών πρωτεϊνών) αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυτταρικών σειρών προστάτου. Όπως αναφέρθηκε (βλέπε προηγούμενη σελίδα) ο χαρακτηρισμός της ειδικής δράσεως μίας ουσίας απαιτεί την ανίχνευση ειδικών θέσεων συνδέσεως (υποδοχέων) στο επίπεδο του ιστού-στόχου. Έτσι, δεδομένης της δόσοεξαρτώμενης δράσεως των οπιοειδών και της αναστολής της δράσεως τους από τους οπιοειδείς ανταγωνιστές προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε τους οπιοειδείς υποδοχείς στις διάφορες κυτταρικές σειρές. Εξάλλου, η αναφερθείσα μερική ή μηδενική αναστολή της δράσεως των οπιοειδών με την προσθήκη διπρενορφίνης (βλέπε σχήμα-12) και η ίδια η ανασταλτική δράση της διπρενορφίνης (βλέπε σχήμα-13) μας οδήγησε στην ανίχνευση μίας πιθανής διασταυρωμένης δράσεως οπιοειδών με άλλα συστήματα μεμβρανικών υποδοχέων.

**Α. Δέσμευση των οπιοειδών στους οπιοειδείς υποδοχείς****Ανίχνευση ειδικών θέσεων δέσμευσης (υποδοχέων) για τα οπιοειδή σε καρκινικά κύτταρα του προστάτου**

Για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των οπιοειδών υποδοχέων στα καρκινικά κύτταρα του προστάτου, χρησιμοποιήθηκαν ραδιενεργά ανάλογα των οπιοειδών αγωνιστών-ανταγωνιστών, υψηλής συγγένειας για τους διάφορους οπιοειδείς υποδοχείς σε συνδυασμό με μη ραδιενεργούς οπιοειδείς αγωνιστές (Υλικά και Μέθοδοι 4A ) και πραγματοποιήθηκαν πειράματα δέσμευσης (Hatzoglou et al. 1995b)

Τα πρώτα πειράματα δέσμευσης είχαν είτε αρνητικά αποτελέσματα είτε ανίχνευαν μικρό αριθμό υποδοχέων. Σε διάφορους ιστούς η ανίχνευση των θέσεων δέσμευσης είναι δύσκολη λόγω της συνύπαρξης ενδογενώς παραγόμενων αγωνιστών οι οποίοι σκεπάζουν τις θέσεις δέσμευσης. Έτσι πριν πραγματοποιηθούν τα πειράματα δέσμευσης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της οξινοποίησης των κυττάρων η οποία απομακρύνει τα ενδογενή οπιοειδή επιτρέποντας την ανίχνευση του συνόλου των θέσεων δέσμευσης. Στον πίνακα VI φαίνονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων

δέσμευσης πριν και μετά την διαδικασία της οξינוποίησης για την [<sup>3</sup>H]- διπρενορφίνη και την [<sup>3</sup>H]-EKC.

**ΠΙΝΑΚΑΣ VI. Αποτελέσματα πειραμάτων δέσμευσης χωρίς οξינוποίηση και με οξינוποίηση** Παρουσιάζεται η ειδική δέσμευση διαφόρων ραδιοσημασμένων οπιοειδών χωρίς και με τη διαδικασία της οξינוποίησης.

Κυτταρική σειρά	[ <sup>3</sup> H]-EKC		[ <sup>3</sup> H]διπρενορφίνη	
	Χωρίς οξינוποίηση	Με οξינוποίηση	Χωρίς οξינוποίηση	Με οξינוποίηση
DU-145	171±9	204± 22	150± 17	375± 15
PC3	262± 22	1505± 36	0	0
LNCaP	0	0	0	0

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε cpm ± τυπικό σφάλμα.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων δέσμευσης στις τρεις κυτταρικές σειρές είναι τα ακόλουθα (πίνακας VII):

1. Στην κυτταρική σειρά DU-145 ο αγωνιστής [<sup>3</sup>H] DPDPE ειδικός για τους δ υποδοχείς δεν παρουσίασε ειδική δέσμευση. Πειράματα δέσμευσης με [<sup>3</sup>H] αιθυλκετοκυκλαζοσίνη έδειξαν την ύπαρξη χαμηλής συγγένειας ( $K_D$  17nM) θέσεων δέσμευσης οι οποίες δεν επηρεάζονται από την παρουσία του DADLE (συνδέεται με τους δ, μ, κ<sub>2</sub> υποδοχείς) και άρα πρόκειται για τους κ<sub>1</sub> οπιοειδείς υποδοχείς (36 000 θέσεις/κύτταρο). Επιπλέον, ανιχνεύτηκαν κ<sub>3</sub> οπιοειδείς υποδοχείς δεδομένου ότι η ειδική δέσμευση της [<sup>3</sup>H ]διπρενορφίνης δεν μεταβλήθηκε από την παρουσία του DADLE ( $K_D$  6nM, 12 000 θέσεις/κύτταρο). Χρησιμοποιώντας τον αγωνιστή [<sup>3</sup>H ] DAGO ανιχνεύθηκαν χαμηλής συγκέντρωσης μ οπιοειδείς υποδοχείς υψηλής όμως συγγένειας ( $K_D$  0,19nM, 650 θέσεις/κύτταρο).

**ΠΙΝΑΚΑΣ VII. Αποτελέσματα των πειραμάτων δέσμησης στις τρεις καρκινικές σειρές του προστάτου όπως υπολογίστηκαν μετά από ανάλυση κατά Scatchard. Χρησιμοποιήθηκαν ραδιοσημασμένα οπιοειδή ανάλογα εκλεκτικά για τους διάφορους τύπους των οπιοειδών υποδοχέων.**

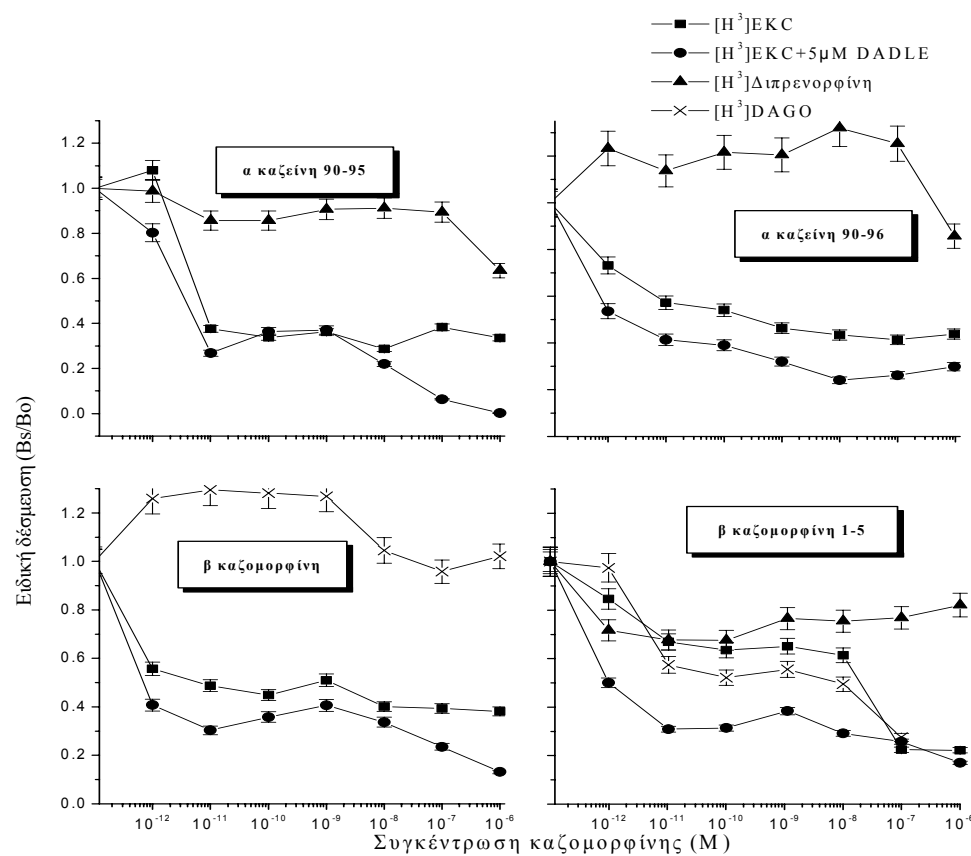
Ραδιενεργό ανάλογο	Θέσεις δέσμησης των οπιοειδών αγωνιστών			Υποδοχείς που ανιχνεύονται
	DU-145	PC3	LNCaP	
[ <sup>3</sup> H]-EKC	Kd 17,74 nM 37200 θέσεις/ κύτταρο	Kd 3,13nM 12100 θέσεις/ κύτταρο	0	δ, μ, κ <sub>1</sub> , κ <sub>2</sub>
[ <sup>3</sup> H]-EKC +DADLE	Kd 16,8nM, 36000 θέσεις/ κύτταρο	Kd 3,13nM 11200 θέσεις/ κύτταρο	0	κ <sub>1</sub>
[ <sup>3</sup> H]-Διπρενορφίνη	Kd 6,0nM 12100θέσεις/ κύτταρο	0	0	δ, μ, κ <sub>2</sub> , κ <sub>3</sub>
[ <sup>3</sup> H]-Διπρενορφίνη +DADLE	Kd 5,7nM 11500 θέσεις/ κύτταρο	0	0	κ <sub>3</sub>
[ <sup>3</sup> H] DAGO	Kd 0,19nM 650 θέσεις/ κύτταρο	Kd 2,4nM 950θέσεις/ κύτταρο	0	μ
[ <sup>3</sup> H] DPDPE	0	0	0	δ

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων κατά Scatchard προσδιορίστηκε η χημική συγγένεια και ο αριθμός τους (θέσεις/κύτταρο).

2. Στην κυτταρική σειρά PC3 ανιχνεύθηκαν κ<sub>1</sub> οπιοειδείς υποδοχείς σε πειράματα δέσμησης της [<sup>3</sup>H]-EKC τα αποτελέσματα των οποίων δεν μεταβλήθηκαν παρουσία του αγωνιστή (K<sub>D</sub> 3,1nM, 11.000 θέσεις/κύτταρο). Ανιχνεύθηκαν επίσης μ οπιοειδείς υποδοχείς ( K<sub>D</sub> 2,4nM, 1.000 θέσεις/κύτταρο).
3. Στην κυτταρική σειρά LNCaP δεν ανιχνεύθηκαν οπιοειδείς υποδοχείς.

#### **Δέσμηση των καζομορφινών και των αναλόγων τους σε ειδικές θέσεις σύνδεσης (υποδοχείς) των οπιοειδών στα καρκινικά κύτταρα του προστάτου (DU-145)**

Συγκρίνοντας τις τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές και τους υποδοχείς που ανιχνεύθηκαν στην καθεμία, παρατηρήθηκε ότι στην κυτταρική σειρά DU-145 υπάρχουν οι περισσότερες θέσεις σύνδεσης των οπιοειδών. Προκειμένου λοιπόν να



**Σχήμα-18.** Αναστολή της ειδικής δέσμευσης διαφόρων τριτωμένων οπιοειδών αγωνιστών από τις καζομορφίνες στην καρκινική κυτταρική σειρά του προστάτου DU-145. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα δέσμευσης (δόσης απόκρισης) σε ολόκληρα κύτταρα μετά από τη διαδικασία της οξינוποίησης. Τα κύτταρα επώαστηκαν με διάφορους τριτωμένους οπιοειδείς αγωνιστές-ανταγωνιστές παρουσία ή απουσία καζομορφίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο λόγος της ειδικής δέσμευσης παρουσία καζομορφίνης προς την ειδική δέσμευση απουσία καζομορφίνης

επιβεβαιωθεί η δράση των καζομορφινών μέσω οπιοειδών υποδοχών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τα οποία ελέγχθηκε εάν οι καζομορφίνες έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται στους οπιοειδείς υποδοχείς αναστέλλοντας την ειδική δέσμευση ραδιοσημασμένων οπιοειδών αγωνιστών καθώς και οι υπότυποι στους οποίους δεσμεύονται (Υλικά και μέθοδο 4B).

Και οι τέσσερις καζομορφίνες, όπως φαίνεται στο σχήμα-18 ανέστειλαν την ειδική δέσμευση διαφόρων ραδιοσημασμένων οπιοειδών αγωνιστών. (Οι υποδοχείς που ανιχνεύονται με τη χρήση διαφόρων ραδιοσημασμένων οπιοειδών δίνονται στον πίνακα II, Υλικά και Μέθοδοι 4B). Πιο συγκεκριμένα η α-καζεΐνη 90-95 ανέστειλε τη δέσμευση της [<sup>3</sup>H]-EKC, αναστολή η οποία δεν επηρεαζόταν από την παρουσία του DADLE, και την δέσμευση της [<sup>3</sup>H]-διπρενορφίνης. Άρα, δεσμεύεται στους κ<sub>1</sub> και κ<sub>3</sub> υποδοχείς. Αντίστοιχα η α-καζεΐνη 90-96 ανέστειλε την δέσμευση της [<sup>3</sup>H]-διπρενορφίνης αναστολή η οποία επηρεαζόταν από την παρουσία του DADLE και

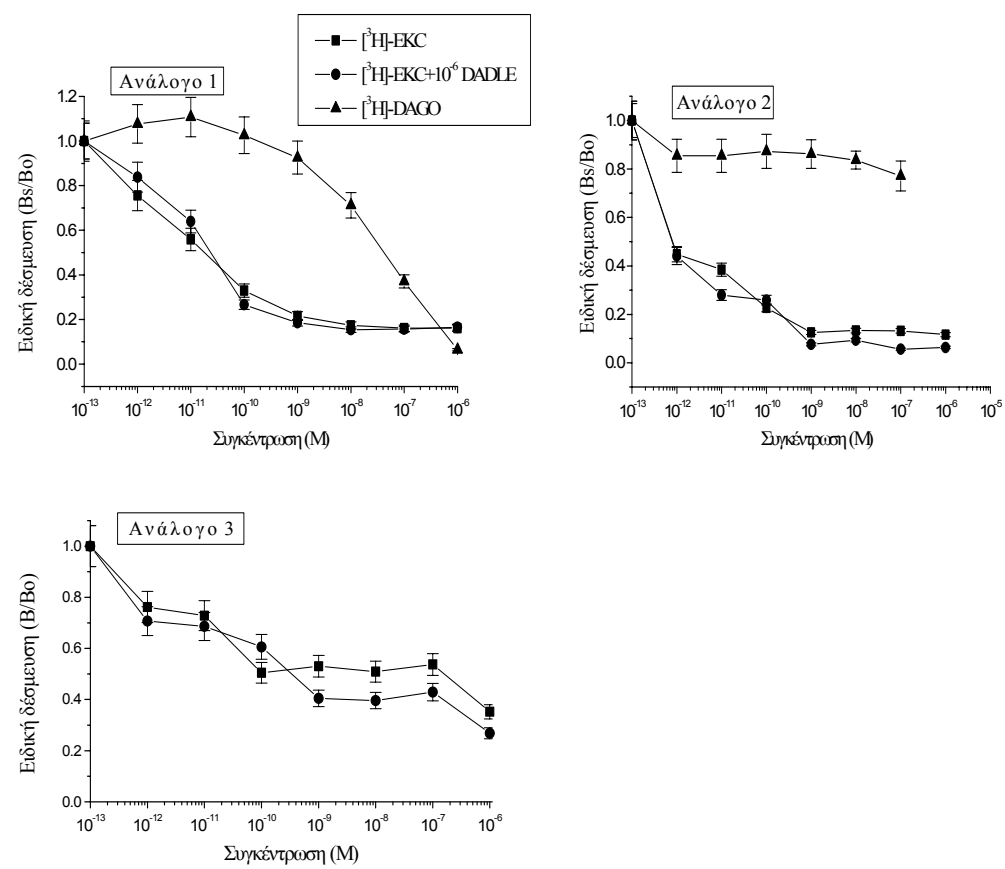
του αγωνιστή [<sup>3</sup>H]- DAGO που σημαίνει ότι δεσμεύεται στους κ<sub>2</sub>, κ<sub>3</sub> και μι υποδοχείς ενώ η β καζομορφίνη 1-5 στους μι και κ<sub>1</sub> ενώ τέλος η β καζομορφίνη μόνο στους κ<sub>1</sub>. Στο πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι τιμές του IC<sub>50</sub> με τις οποίες οι καζομορφίνες δεσμεύοταν στους οπιοειδείς υποδοχείς.

**ΠΙΝΑΚΑΣ VIII.** Αναστολή της ειδικής δέσμευσης ραδιοσημασμένων οπιοειδών αγωνιστών στα κύτταρα DU-145 από τις καζομορφίνες.

[ <sup>3</sup> H] Αγωνιστής	Μέση κατασταλτική Συγκέντρωση IC <sub>50</sub> (nM)				
	[ <sup>3</sup> H]DAGO	[ <sup>3</sup> H]EKC	[ <sup>3</sup> H]EKC +DADLE	[ <sup>3</sup> H]- Διπρενορφίνη	[ <sup>3</sup> H]- Διπρενορφίνη +DADLE
<b>Πεπτίδιο</b>					
<b>α καζεΐνη 90-95</b>	>1000	0,1± 0,004	0,7± 0,041	0,5± 0,03	0,006±0,0004
<b>α καζεΐνη 90-96</b>	1,7± 0,074	>1000	>1000	0,12± 0,007	0,2± 0,012
<b>β καζομορφίνη</b>	>1000	0,01± 0,0003	0,001± 0,00003	-	-
<b>β καζομορφίνη 1-5</b>	10± 0,43	0,012±0,0004 65± 4,02	0,0012±0,00004 10± 0,63	>1000	>1000

Παρουσιάζετα η μέση τιμή ±τυπικό σφάλμα του IC<sub>50</sub> για την αναστολή της ειδικής δέσμευσης των διαφόρων οπιοειδών αγωνιστών όπως υπολογίστηκε μετά από ανάλυση με προσέγγιση σιγμοειδούς καμπύλης των δεδομένων τα οποία παρουσιάζονται στο σχήμα-18.

Μελετήθηκε επίσης, η ικανότητα δέσμευσης των αναλόγων της β καζομορφίνης 1-5 στους οπιοειδείς υποδοχείς στα κύτταρα DU-145. Τα ανωτέρω πεπτίδια, όπως έχει περιγραφεί στο σχήμα-17, αποτελούν ισχυρούς αναστολείς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ η δράση τους δεν αναστέλλεται από την σύγχρονη χορήγηση ανταγωνιστού. Το σχήμα-19 δείχνει την αναστολή της ειδικής δέσμευσης των διαφόρων ραδιοσημασμένων οπιοειδών παρουσία των τριών αναλόγων της β καζομορφίνης 1-5. Το ανάλογο (1) που έχει δράση ανταγωνιστή ανέστειλε τη ειδική δέσμευση του μ αγωνιστή [<sup>3</sup>H]-DAGO καθώς και της [<sup>3</sup>H]-EKC της οποίας η αναστολή δεν επηρεαζόταν παρουσία του DADLE υποδεικνύοντας δέσμευση στους μι και κ<sub>1</sub> οπιοειδείς υποδοχείς. Όσον αφορά τώρα τους δύο αγωνιστές το ανάλογο (2) [Pro3Ψ(CH<sub>2</sub>-N)] δεσμεύεται ελάχιστα στους μι υποδοχείς και με μεγάλη συγγένεια στους κάππα αφού ανέστειλε ελάχιστα την ειδική δέσμευση του [<sup>3</sup>H]-DAGO και σχεδόν πλήρως την ειδική δέσμευση της [<sup>3</sup>H]-EKC ενώ το ανάλογο (3) [Pro2Ψ(CHOH-CH<sub>2</sub>-NH)] δεσμεύεται στους κ<sub>1</sub>.



**Σχήμα-19.** Αναστολή της ειδικής δέσμευσης διαφόρων τριτωμένων οπιοειδών αγωνιστών από ανάλογα της β καζομορφίνης 1-5 στην καρκινική κυτταρική σειρά του προστάτου DU-145. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα δέσμευσης (δόσης απόκρισης) σε ολόκληρα κύτταρα μετά από τη διαδικασία της οξינוποίησης. Τα κύτταρα επώαστηκαν με διάφορους τριτωμένους οπιοειδείς αγωνιστές-ανταγωνιστές παρουσία ή απουσία καζομορφίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο λόγος της ειδικής δέσμευσης παρουσία καζομορφίνης προς την ειδική δέσμευση απουσία καζομορφίνης. Ανάλογο 1: β καζομορφίνη 1-5 [Pro2Ψ(CH<sub>2</sub>-NH)], ανάλογο 2: β-καζομορφίνη1-5 [Pro3Ψ(CH<sub>2</sub>-N)], βκαζομορφίνη1-5 [Pro2Ψ(CHOH-CH<sub>2</sub>-NH)]

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι τιμές της χημικής συγγένειας με τις οποίες δεσμεύονται στους οπιοειδείς υποδοχείς σε σύγκριση πάντα με τη β καζομορφίνη 1-5.

**ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΧ.** Αναστολή της ειδικής δέσμευσης ραδιοσημασμένων οπιοειδών αγωνιστών στα κύτταρα DU-145 από τα ανάλογα της β καζομορφίνης 1-5.

Μέση κατασταλτική Συγκέντρωση IC <sub>50</sub> (nM)					
[ <sup>3</sup> H] Αγωνιστής	[ <sup>3</sup> H]-DAGO	[ <sup>3</sup> H]-EKC	[ <sup>3</sup> H]-EKC +DADLE	[ <sup>3</sup> H]- Διπρενορφίνη	[ <sup>3</sup> H]- Διπρενορφίνη +DADLE
<b>Καζομορφίνη</b>					
<b>β-καζομορφίνη 1-5</b> Pro3Ψ(CH <sub>2</sub> -NH)	40± 2,6	0,03± 0,0016	0,03±0,0014	-	-
<b>β-καζομορφίνη 1-5</b> Pro3Ψ(CH <sub>2</sub> -N)	>1000	0,001±0,00004	0,001±0,00003	0,004±0,00018 6± 0,34	0,02±0,0012 1±0,03
<b>β-καζομορφίνη 1-5</b> Pro2Ψ(R-CHOH- CH <sub>2</sub> -NH)	-	0,01± 0,0003 >1000	0,03±0,0018 >1000	-	-
<b>β καζομορφίνη 1-5</b>	10± 0,6	0,012 65	0,0012 10	>1000	>1000

Παρουσιάζεται η μέση τιμή± τυπικό σφάλμα του IC<sub>50</sub> για την αναστολή της ειδικής δέσμευσης των διαφόρων οπιοειδών αγωνιστών όπως υπολογίστηκε μετά από ανάλυση με προσέγγιση σιγμοειδούς καμπύλης των δεδομένων τα οποία παρουσιάζονται στο σχήμα-19.

Η δέσμευση της β καζομορφίνης στους μι οπιοειδείς υποδοχείς φαίνεται ότι επηρεάζεται από την παρουσία της πλευρικής ομάδας ενώ η δέσμευσή της στους κάππα υποδοχείς είτε δεν επηρεάζεται είτε σε κάποιες περιπτώσεις ενισχύεται για παράδειγμα η β καζομορφίνη 1-5 [Pro3Ψ(CH<sub>2</sub>-N)].

#### **B. Επίδραση των οπιοειδών σε άλλα συστήματα μεμβρανικών υποδοχέων**

Λαμβάνοντας υπόψιν τη δράση των οπιοειδών στην κυτταρική σειρά LNCaP απουσία οπιοειδών υποδοχέων καθώς και τη δράση τους στις άλλες δύο κυτταρικές σειρές η οποία δεν είναι σε όλες τις περιπτώσεις αναστρέψιμη παρουσία ανταγωνιστή, θεωρήθηκε σκόπιμο η μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης τους με άλλα συστήματα μεμβρανικών υποδοχέων.



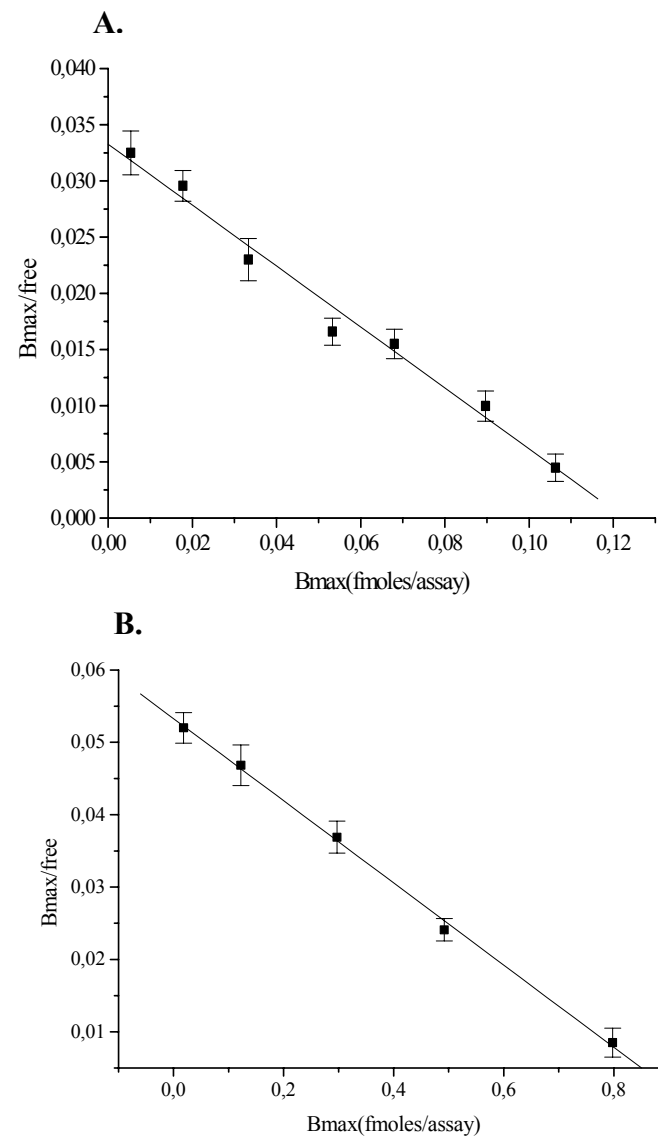
**Αλληλεπίδραση με το σύστημα υποδοχέων σωματοστατίνης**

Οι οπιοειδείς υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια των μεμβρανικών υποδοχέων με επτά διαμεμβρανικά τμήματα (σχήμα 7B). Μέλη της οικογένειας αυτής αποτελούν και σωματινεργικοί υποδοχείς οι οποίοι παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με τους οπιοειδείς υποδοχείς (Reisine and Bell 1993). Επιπλέον, αλληλεπίδραση οπιοειδών με υποδοχείς σωματοστατίνης έχει βρεθεί σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (T47D) (Hatzoglou et al. 1995a) και νεφρών (Hatzoglou et al. 1996b). Έτσι, πραγματοποιήθηκαν μελέτες για την ανίχνευση υποδοχέων σωματοστατίνης σε καρκινικά κύτταρα του προστάτου και διερευνήθηκε η πιθανή δέσμευση των οπιοειδών σε αυτούς.

**Ανίχνευση υποδοχέων σωματοστατίνης στα καρκινικά κύτταρα του προστάτου (DU-145, PC3 και LNCaP)**

Για την ανίχνευση υποδοχέων σωματοστατίνης στις τρεις καρκινικές σειρές του προστάτου χρησιμοποιήθηκε 3-[<sup>125</sup>I]- Tyr<sup>11</sup>- σωματοστατίνη-14. Ειδική δέσμευση παρατηρήθηκε στις κυτταρικές σειρές DU-145 και PC3 ενώ δεν παρατηρήθηκε δέσμευση στην κυτταρική σειρά LNCaP.

Στην κυτταρική σειρά DU-145, ανάλυση κατά Scatchard των αποτελεσμάτων (σχήμα-20A) έδειξε την ύπαρξη μικρού αριθμού υποδοχέων σωματοστατίνης (147 θέσεις/κύτταρο), με υψηλή όμως συγγένεια, σταθερά αποδέσμευσης ( $K_D$ ) 0,0092 nM. Στην κυτταρική σειρά PC3 ανιχνεύθηκαν 750 θέσεις σύνδεσης της σωματοστατίνης ανά κύτταρο με σταθερά αποδέσμευσης ( $K_D$ ) 0,044 nM (σχήμα-20B).



**Σχήμα-20. Ειδική δέσμευση της ραδιοσημασμένης σωματοστατίνης-14** **A.** στα κύτταρα DU-145 **B.** στα κύτταρα PC3. Ανάλυση κατά Scatchard. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα δέσμευσης (κορεσμού). Τα κύτταρα επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις 3-[<sup>125</sup>I]- tyr<sup>11</sup>- σωματοστατίνης-14 απουσία ή παρουσία μη σημασμένης σωματοστατίνης (μη ειδική δέσμευση).

#### Αλληλεπίδραση οπιοειδών πεπτιδίων με υποδοχείς σωματοστατίνης

Μελετώντας τη δράση των οπιοειδών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτου παρατηρήθηκε ότι σε κάποιες περιπτώσεις η δράση των οπιοειδών αναστέλλεται μερικώς από την παρουσία οπιοειδούς ανταγωνιστή το οποίο υποδηλώνει ότι η δράση τους δεν πραγματοποιείται αποκλειστικά μέσω των οπιοειδών υποδοχέων. Γνωρίζοντας λοιπόν ότι οι κυτταρικές σειρές DU-145 και PC3 έχουν υποδοχείς σωματοστατίνης και έχοντας υπόψιν ότι και οι δύο υποδοχείς (οπιοειδείς και σωματοστατίνης) ανήκουν στην ίδια οικογένεια των μεμβρανικών υποδοχέων, με μεγάλη ομολογία μεταξύ τους, μελετήθηκε η πιθανή

σύνδεση και δράση των οπιοειδών μέσω των υποδοχέων της σωματοστατίνης. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα, και κανένας από τους τρεις οπιοειδείς αγωνιστές-ανταγωνιστές EKC, DAGO, Διπρενορφίνη δεν ελάττωσε την ειδική δέσμευση της [<sup>125</sup>I]-tyr<sup>11</sup>-σωματοστατίνη-14 τόσο στα κύτταρα DU-145 όσο και στα κύτταρα PC3.

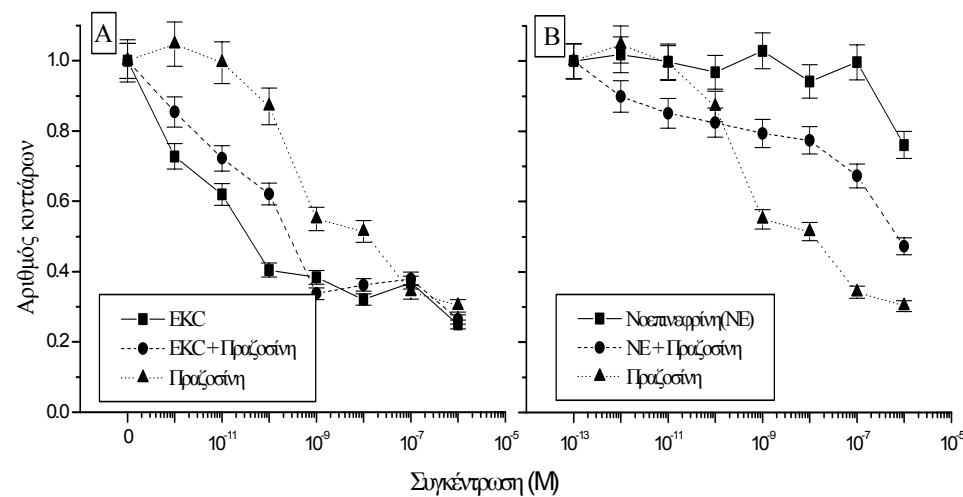
#### **Αλληλεπίδραση με το σύστημα των αδρενεργικών υποδοχέων**

Ένα ακόμη μέλος της οικογένειας των υποδοχέων με επτά διαμεμβρανικά είναι και οι αδρενεργικοί υποδοχείς οι οποίοι έχουν ανιχνευθεί τόσο στο φυσιολογικό όσο και σε περιπτώσεις καρκίνου του προστάτου (Lerog et al. 1990). α<sub>1</sub> και α<sub>2</sub> αδρενεργικοί υποδοχείς έχουν ανιχνευθεί σε προστατικό αδένωμα και σχετίζονται με το μέγεθος του (Morita and Kondo 1992; Moriyama et al. 1999). Επιπλέον, σε άλλα συστήματα έχει παρατηρηθεί αλληλεπίδραση των οπιοειδών με τους α<sub>2</sub> αδρενεργικούς υποδοχείς (Lee et al. 1988; Simantov et al. 1982). Έτσι μελετήθηκε πιθανή δράση των οπιοειδών μέσω αδρενεργικών υποδοχέων ειδικότερα στην κυτταρική σειρά LNCaP στην οποία τα οπιοειδή έχουν δράση αλλά δεν ανιχνεύθηκαν ούτε οπιοειδείς υποδοχείς ούτε όμως και υποδοχείς σωματοστατίνης.

#### Επίδραση του οπιοειδούς αγωνιστή EKC στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό παρουσία ανταγωνιστή των αδρενεργικών στα κύτταρα LNCaP

Σύμφωνα με αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν σε προηγούμενες ενότητες ο γενικός οπιοειδής αγωνιστής EKC εμφανίζει δράση στα κύτταρα LNCaP, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό τους κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο, απουσία οπιοειδών υποδοχέων. Μελετήθηκε λοιπόν, η πιθανή δράση του μέσω αδρενεργικών υποδοχέων. Επίδραση των κυττάρων με EKC για έξι μέρες παρουσία του ανταγωνιστή των α<sub>1</sub> αδρενεργικών υποδοχέων πραζοσίνης είχε ως αποτέλεσμα την μερική αναστολή της δράσης της EKC (σχήμα-21A) ενώ, επίδραση μόνο με πραζοσίνη ελάττωνε επίσης, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον μελετήθηκε η δράση της νορεπινεφρίνης (α<sub>1</sub> και α<sub>2</sub> αδρενεργικός αγωνιστής) στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό απουσία ή παρουσία πραζοσίνης. Η νορεπινεφρίνη όπως φαίνεται στο σχήμα 21B προκάλεσε μικρή αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε υψηλές συγκεντρώσεις η οποία όμως ενισχύοταν παρουσία πραζοσίνης. Τα

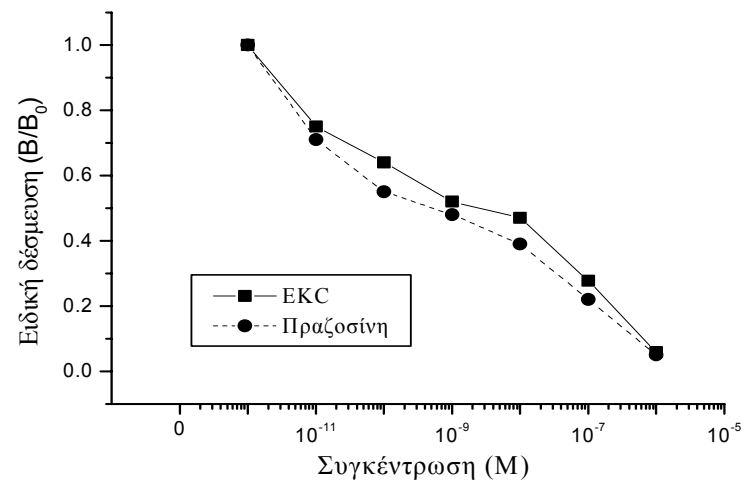
παραπάνω ευρήματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η δράση της EKC πιθανώς, πραγματοποιείται μέσω  $\alpha_1$  αδρενεργικών υποδοχέων οι οποίοι φαίνεται ότι υπάρχουν στα κύτταρα LNCaP.



**Σχήμα-21. Δράση της EKC και της νορεπινεφρίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων LNCaP.** Τα κύτταρα επώαστηκαν για 6 μέρες με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις καζομορφινών παρουσία ή απουσία του ανταγωνιστή των  $\alpha_1$  αδρενεργικών υποδοχέων, πραζοσίνη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγοι με τα κύτταρα μάρτυρες (control) και παρουσιάζεται η μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τεσσάρων πειραμάτων

#### Αλληλεπίδραση οπιοειδών πεπτιδίων με αδρενεργικούς υποδοχείς

Παράλληλα με τη μελέτη της δράσης οπιοειδών και αδρενεργικών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό πραγματοποιήθηκαν και μελέτες δέσμησης δόσης απόκρισης σε ολόκληρα κύτταρα LNCaP χρησιμοποιώντας τριτιωμένη πραζοσίνη παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων μη ραδιοσημασμένης πραζοσίνης. Όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί η πραζοσίνη ανέστειλε τη δέσμηση της [<sup>3</sup>H] πραζοσίνης γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη  $\alpha_1$  υποδοχέων στα κύτταρα LNCaP με χημική συγγένεια (IC<sub>50</sub>) 0,695nM. Επιπρόσθετα και η EKC προκάλεσε παρόμοια αναστολή. Η καμπύλη δόσης-απόκρισης της EKC είναι παράλληλη με αυτή της πραζοσίνης που σημαίνει ότι δεσμεύεται στους  $\alpha_1$  αδρενεργικούς υποδοχείς με μικρότερη όμως συγγένεια (IC<sub>50</sub> 1,82 nM).



**Σχήμα-22.** Αναστολή της δέσμευσης τριτιωμένης πραζοσίνης από την μη ραδιοσημασμένη πραζοσίνη και την EKC στην καρκινική κυτταρική σειρά του προστάτου LNCaP. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα δέσμευσης (δόσης απόκρισης) σε ολόκληρα κύτταρα μετά από τη διαδικασία της οξινολοποίησης. Τα κύτταρα επώαστηκαν με [<sup>3</sup>H] πραζοσίνη παρουσία ή απουσία πραζοσίνης ή EKC. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο λόγος της ειδικής δέσμευσης παρουσία πραζοσίνης ή EKC προς την ειδική δέσμευση απουσία τους.

### Γενικό συμπέρασμα

Η δράση των οπιοειδών στα καρκινικά κύτταρα του προστάτου πραγματοποιείται κυρίως, μέσω των οπιοειδών υποδοχέων. Μέρος της δράσης τους πιθανώς πραγματοποιείται και μέσω άλλων μεμβρανικών συστημάτων υποδοχέων όπως των αδρενεργικών. Όσον αφορά όμως, τα κύτταρα LNCaP όπου δεν υπάρχουν οπιοειδείς υποδοχείς και μόνο ένα μικρό μέρος της δράσης τους πραγματοποιείται μέσω των αδρενεργικών υποδοχέων παραμένει αναπάντητο το ερώτημα για τον τρόπο δράσης τους.

## ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΝΕΩΝ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΟΠΙΟΕΙΔΗ ΔΡΑΣΗ

Όπως αναφέρθηκε, στον διάμεσο προστατικό ιστό έχουν ανιχνευθεί κύτταρα που παράγουν οπιοειδή (Gkonos et al. 1995). Έτσι, μία πιθανή πηγή οπιοειδών ουσιών μπορεί να είναι ο ίδιος ο προστάτης. Εξάλλου, λεμφοκύτταρα τα οποία συρρέουν στον ιστό μετά από καρκινική εξαλλαγή, η β-ενδορφίνη η οποία παράγεται σε άλλες θέσεις του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος ή σε άλλους μη νευρικούς ιστούς και έχει χρόνο ημιζωής >30min (Castanas et al. 1985) θα μπορούσε να αποτελέσει εναλλακτική πηγή οπιοειδών ουσιών. Στο τμήμα αυτό της διατριβής αναφέρουμε την ταυτοποίηση δύο εναλλακτικών πηγών ουσιών με οπιοειδή δραστηριότητα: Η πρώτη αναφέρεται στην ταυτοποίηση μίας νέας καζομορφίνης ειδικής του ανθρώπινου γάλακτος και η δεύτερη στην ταυτοποίηση, για πρώτη φορά στην παγκόσμια βιβλιογραφία, ενός πεπτιδίου που προέρχεται από τον ίδιο τον οπιοειδή υποδοχέα και παρουσιάζει δράση οπιοειδούς αγωνιστού.

**A. Ταυτοποίηση μιας νέας καζομορφίνης ( $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη και το αμίδιο της)**

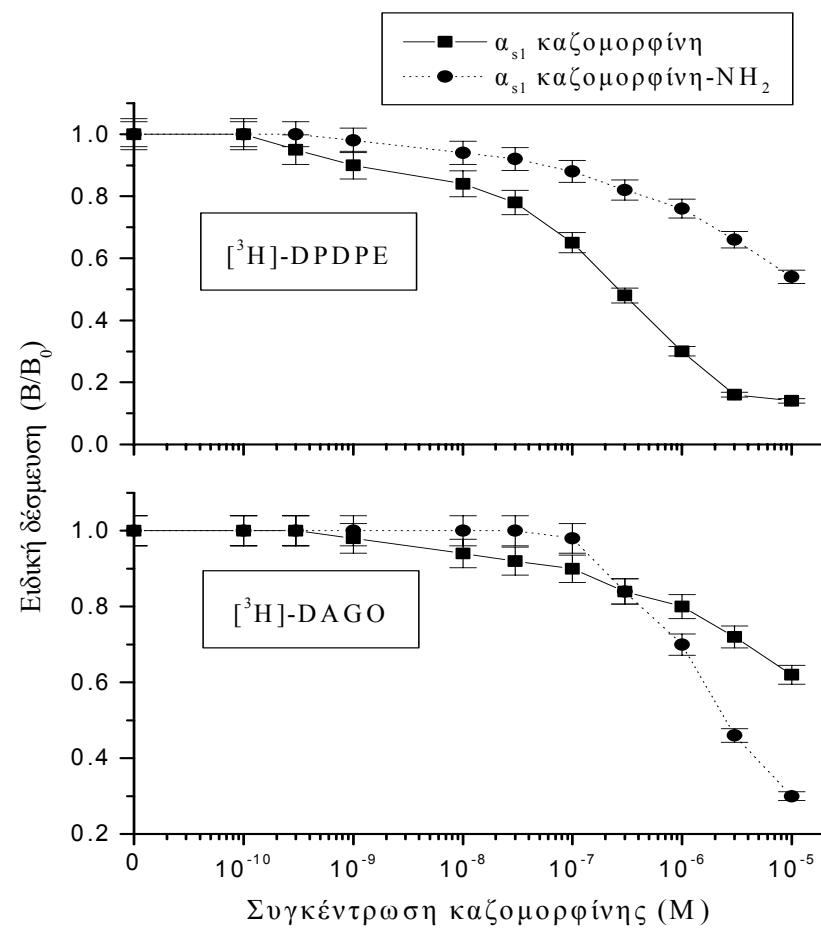
Μέχρι τώρα οι καζομορφίνες, η δράση των οποίων μελετήθηκε, ήταν προϊόντα διάσπασης των  $\alpha$  και  $\beta$  καζεϊνών του γάλακτος των βοοειδών. Σημαντικό όμως μέρος των καζεϊνών του γάλακτος αποτελούν οι  $\alpha_s$  καζεΐνες. Το ανθρώπινο γάλα από τις  $\alpha_s$  καζεΐνες περιέχει μόνο την  $\alpha_{s1}$  καζεΐνη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η πιθανή ύπαρξη πεπτιδίων με οπιοειδή δράση, προερχόμενα από την  $\alpha_{s1}$  καζεΐνη του ανθρώπινου γάλακτος. Πράγματι, από την πρωτοταγή δομή της  $\alpha_{s1}$  καζεΐνης ανιχνεύθηκε ένα πενταπεπτίδιο, η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη, με αλληλουχία Tyr-Val-Pro-Phe-Pro που βρίσκεται στο καρβοξυλικό τμήμα της (156-162). Η αλληλουχία της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης εμφανίζει ομοιότητες με ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια και με καζομορφίνες και έτσι μελετήθηκε η πιθανότητα τόσο η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη όσο και το αμίδιο της να εμφανίζουν οπιοειδή δράση.

**Έλεγχος της πιθανής οπιοειδούς δράσης της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης και του αμιδίου της**

Για την ταυτοποίηση της οπιοειδούς δράσεως της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης, η μελέτη πραγματοποιήθηκε αρχικά σε μεμβρανικά παρασκευάσματα εγκεφάλου επίμυος πλούσια σε  $\mu$  και  $\delta$  οπιοειδείς υποδοχείς, ενώ στη συνέχεια μελετήθηκε η δράση της και σε καρκινικά κύτταρα μαστού (κυτταρική σειρά T47D) όπου ήταν ήδη γνωστή η παρουσία των οπιοειδών υποδοχέων αλλά στα οποία υπάρχουν λίγοι  $\delta$  και καθόλου  $\mu$ .

**Δέσμευση της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης σε ειδικές θέσεις σύνδεσης (υποδοχείς) των οπιοειδών σε μεμβράνες εγκεφάλου επίμυος και στα καρκινικά κύτταρα μαστού T47D**

Στα μεμβρανικά παρασκευάσματα εγκεφάλου επίμυος πραγματοποιήθηκαν πειράματα δέσμευσης δόσης-απόκρισης χρησιμοποιώντας τους [ $^3$ H]-DAGO και [ $^3$ H]-DPDPE αγωνιστές ειδικούς για τους  $\mu$  και  $\delta$  οπιοειδείς υποδοχείς αντίστοιχα.. Όπως φαίνεται στο σχήμα-23 η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη ανέστειλε πλήρως την ειδική δέσμευση του [ $^3$ H]-DPDPE με μέση κατασταλτική συγκέντρωση ( $IC_{50}$ ) 2,6 $\mu$ M ενώ το αμίδιο της, την ανέστειλε μερικώς με  $IC_{50} > 10 \mu$ M. Αντίθετα για τους  $\mu$  υποδοχείς η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη ήταν αυτή που ανέστειλε λίγο τη ειδική δέσμευση του [ $^3$ H]-DAGO σε αυτούς ενώ το αμίδιο της την ανέστειλε σχεδόν πλήρως ( $IC_{50}$  1 $\mu$ M).

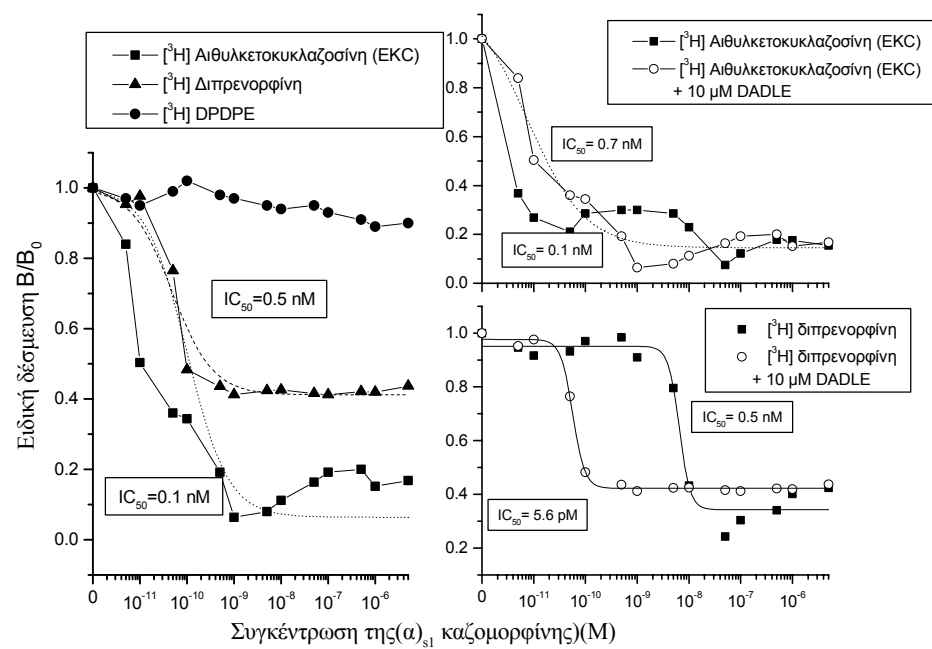


**Σχήμα-23.** Αναστολή της ειδικής δέσμευσης διαφόρων τριτωμένων οπιοειδών από την  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη και το αμίδιο της σε μεμβρανικά παρασκευάσματα εγκεφάλου επίμυος. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα δέσμευσης (δόσης-απόκρισης). Τα μεμβρανικά παρασκευάσματα επώαστηκαν με διάφορους τριτωμένους οπιοειδείς αγωνιστές-ανταγωνιστές παρουσία ή απουσία καζομορφίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο λόγος της ειδικής δέσμευσης παρουσία καζομορφίνης προς την ειδική δέσμευση απουσία καζομορφίνης.

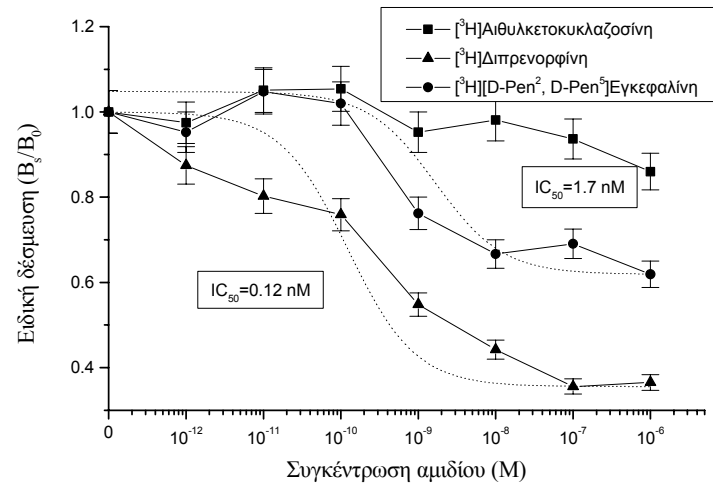
Στα κύτταρα T47D, από προηγούμενες μελέτες (Hatzoglou et al. 1996c) είναι γνωστό ότι έχουν υποδοχείς των οπιοειδών ( $\delta$ ,  $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$ ,  $\kappa_3$ ), έτσι πραγματοποιήθηκαν πειράματα όπου ελέγχθηκε η αναστολή της δέσμευσης ραδιοσημασμένων οπιοειδών αγωνιστών από την  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη και το αμίδιο της, ειδικών για αυτούς τους τύπους οπιοειδών υποδοχέων.



Όπως φαίνεται στο σχήμα-24 η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη ανέστειλε τη δέσμευση της τριτιωμένης αιθυλκετοκυκλοαζοσίνης και διπρενορφίνης ενώ δεν επηρέαζε τη δέσμευση της τριτιωμένης DPDPE (ειδικού αγωνιστή για τους  $\delta$  οπιοειδείς υποδοχείς). Η αναστολή της [ $^3\text{H}$ ] EKC, η οποία συνδέεται με τους  $\delta$ ,  $\mu$ ,  $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$  υποδοχείς ήταν σχεδόν πλήρης και δεν επηρεαζόταν από την παρουσία 10 $\mu\text{M}$  DADLE που συνδέεται με τους  $\delta$ ,  $\mu$ ,  $\kappa_2$  υποδοχείς γεγονός που υποδηλώνει ότι  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη συνδέεται στους  $\kappa_1$  υποδοχείς. Αναστολή της δέσμευσης της [ $^3\text{H}$ ] διπρενορφίνης στους  $\delta$ ,  $\mu$ ,  $\kappa_2$ ,  $\kappa_3$  η οποία όμως επηρεαζόταν από την παρουσία 10 $\mu\text{M}$  DADLE υποδεικνύει δέσμευση τόσο στους  $\kappa_2$ , όσο και στους  $\kappa_3$  υποδοχείς.



**Σχήμα-24.** Αναστολή της ειδικής δέσμευσης διαφόρων τριτιωμένων οπιοειδών από την  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη στην καρκινική κυτταρική σειρά T47D. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα δέσμευσης (δόσης-απόκρισης). Τα κύτταρα επώαστηκαν με διάφορους τριτιωμένους οπιοειδείς αγωνιστές-ανταγωνιστές παρουσία ή απουσία καζομορφίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο λόγος της ειδικής δέσμευσης παρουσία καζομορφίνης προς την ειδική δέσμευση απουσία καζομορφίνης.



**Σχήμα-25.** Αναστολή της ειδικής δέσμευσης διαφόρων τριτωμένων οπιοειδών από το αμίδιο της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης στην καρκινική κυτταρική σειρά T47D. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα δέσμευσης (δόσης απόκρισης). Τα κύτταρα επώαστηκαν με διάφορους τριτωμένους οπιοειδείς αγωνιστές-ανταγωνιστές παρουσία ή απουσία του αμιδίου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο λόγος της ειδικής δέσμευσης παρουσία αμιδίου προς την ειδική δέσμευση απουσία αμιδίου.

Αντικατάσταση του καρβοξυτελικού άκρου της καζομορφίνης με αμινομάδα είχε ως αποτέλεσμα να μην μπορεί να αναστείλει την ειδική δέσμευση της [<sup>3</sup>H] EKC (σχήμα-10). Παρ'ολ'αυτά ανέστειλε την ειδική δέσμευση της διπρενορφίνης η οποία επηρεαζόταν από την παρουσία 10 $\mu$ M DADLE και της [<sup>3</sup>H] DPDPE. Άρα το αμίδιο της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης δεσμεύεται στους  $\delta$  και  $\kappa_3$  οπιοειδείς υποδοχείς. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα X.

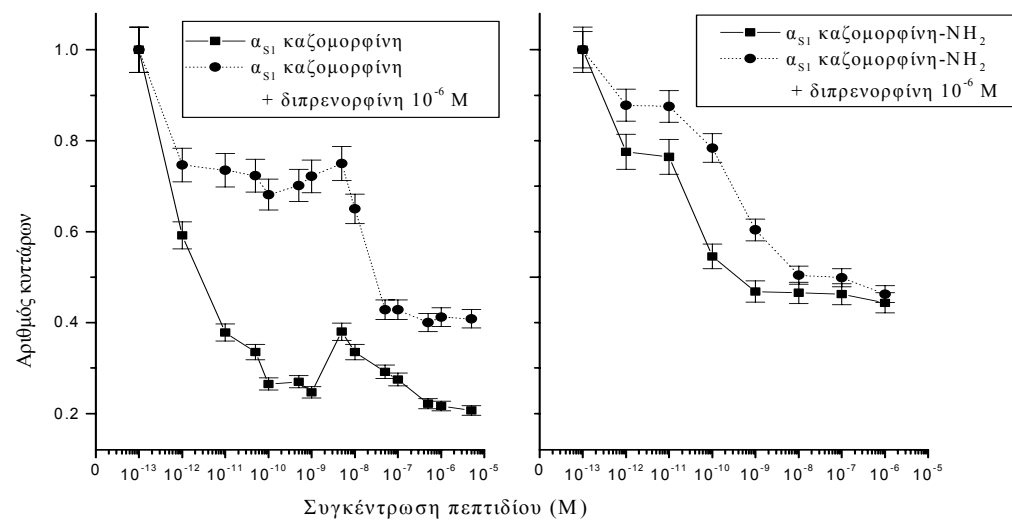
**Πίνακας X.** Αναστολή της ειδικής δέσμευσης ραδιοσημασμένων οπιοειδών αγωνιστών στα κύτταρα T47D από την  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη και το αμίδιο της.

Μέση κατασταλτική Συγκέντρωση IC <sub>50</sub> (nM)					
<sup>3</sup> H] Αγωνιστής	<sup>3</sup> H]DPDPE ή <sup>3</sup> H]DSLET	<sup>3</sup> H]EKC	<sup>3</sup> H]EKC +DADLE	<sup>3</sup> H]- Διπρενορφίνη	<sup>3</sup> H]- Διπρενορφίνη +DADLE
Πεπτίδιο					
$\alpha_{s1}$ καζομορφίνη	>1000	0,1± 0,005	0,7± 0,03	0,5± 0,019	0,006± 0,0002
$\alpha_{s1}$ καζομορφίνη-NH <sub>2</sub>	1,7± 0,078	>1000	>1000	0,12± 0,005	0,2± 0,013

Παρουσιάζεται η μέση τιμή± τυπικό σφάλμα του IC<sub>50</sub> για την αναστολή της ειδικής δέσμευσης των διαφόρων οπιοειδών αγωνιστών όπως υπολογίστηκε μετά από ανάλυση με προσέγγιση σιγμοειδούς καμπύλης των δεδομένων τα οποία παρουσιάζονται στα σχήματα 24 ,25.

#### Επίδραση της $\alpha_{s1}$ καζομορφίνης στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων T47D

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 6<sup>η</sup> μέρα επίδρασης οπότε και παρατηρήθηκε η μέγιστη καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις προκάλεσε καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε ποσοστό 80%. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων T47D είναι 2.02 μέρες μπορούμε να πούμε ότι η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη ανέστειλε σχεδόν πλήρως την ανάπτυξη των κυττάρων. Η δράση της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης (σχήμα-26) ήταν δόσοεξαρτώμενη με μέση κατασταλτική συγκέντρωση (IC<sub>50</sub>) 0,005 nM και σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 10<sup>-8</sup> M αναστρέψιμη από τον οπιοειδή ανταγωνιστή διπρενορφίνη.



**Σχήμα-26. Επίδραση της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων T47D.** Τα κύτταρα επωάστηκαν για 6 μέρες με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις διαφόρων οπιοειδών παρουσία ή απουσία ή απουσία του γενικού ανταγωνιστή των οπιοειδών, διπρενορφίνη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγοι με τα κύτταρα μάρτυρες (control) και παρουσιάζεται η μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τεσσάρων πειραμάτων.

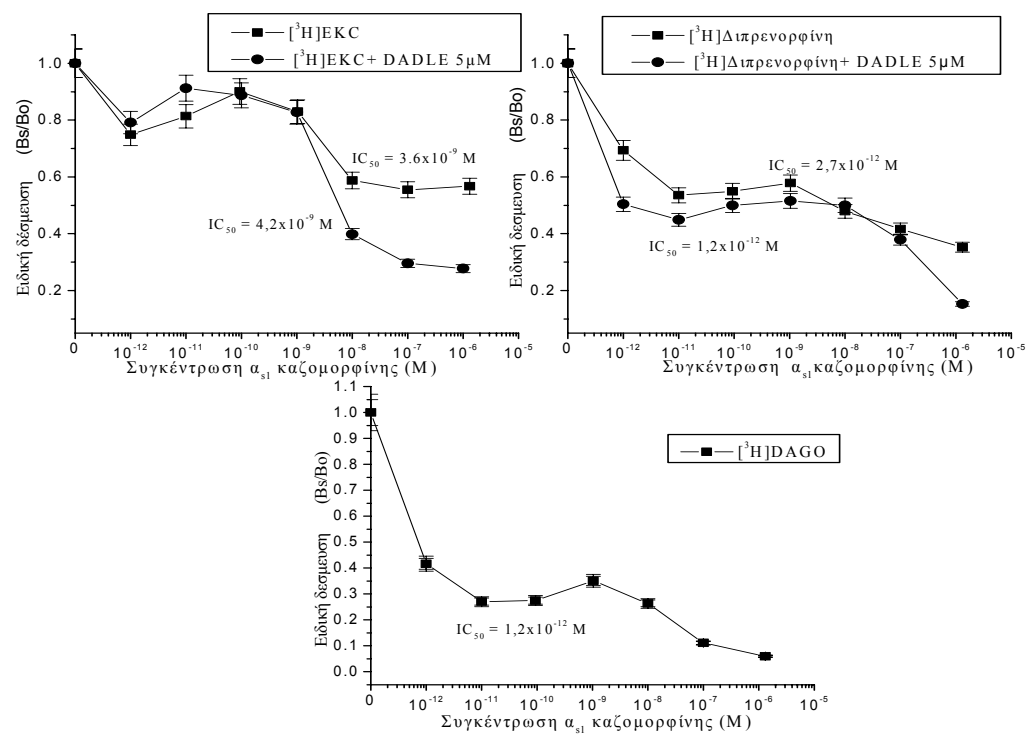
Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού προκάλεσε και το αμιδίο της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης (σχήμα-26), δράση που ήταν όμως μικρότερη, με μέγιστο ποσοστό καταστολής 55% και μέση κατασταλτική συγκέντρωση 0,5 nM ενώ η παρουσία της διπρενορφίνης προκάλεσε μικρή αναστροφή της δράσης.

#### Μελέτη της δράσης της $\alpha_{s1}$ καζομορφίνης και του αμιδίου της στις καρκινικές σειρές του προστάτου DU-145, PC3 και LNCaP

Έχοντας ανιχνεύσει την εξαιρετική οπιοειδή δράση της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης (και του αμιδίου της) σε καρκινικά κύτταρα μαστού ήταν σημαντικό να μελετηθεί και η δράση της και σε άλλα συστήματα. Στην προκειμένη περίπτωση μελετήσαμε την δράση της στον προστάτη. Για τον σκοπό αυτό ελέγχθηκε η ικανότητα δέσμευσής της στους οπιοειδείς υποδοχείς όσο και η δράση της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων προστάτου.

Δέσμευση της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης σε ειδικές θέσεις σύνδεσης (υποδοχείς) των οπιοειδών σε καρκινικά κύτταρα προστάτου

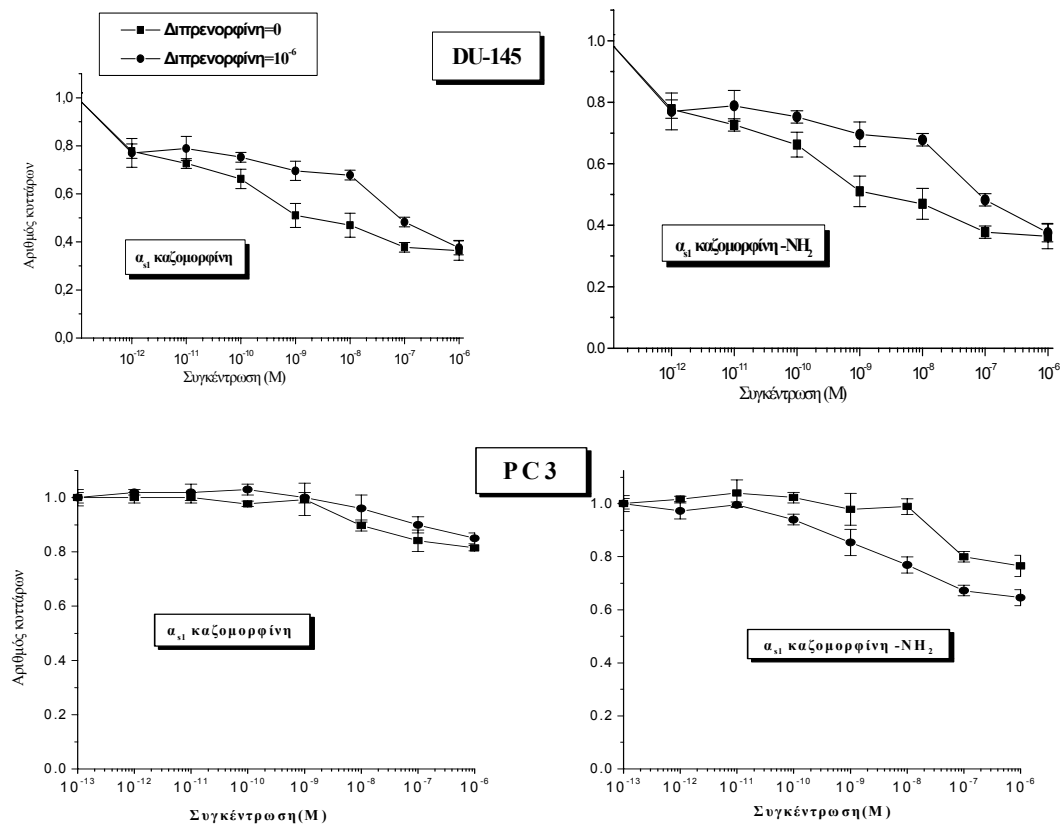
Η ικανότητα δέσμευσης της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης στους οπιοειδείς υποδοχείς μελετήθηκε στην καρκινική κυτταρική σειρά του προστάτου DU-145, στην οποία όπως φαίνεται και από τον Πίνακα VII, ανιχνεύθηκε ο μεγαλύτερος αριθμός οπιοειδών υποδοχέων. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα δέσμευσης (δόσης-απόκρισης) χρησιμοποιώντας ραδιοσημασμένη αιθυλκετοκυκλοζοσίνη (EKC) και διπρενορφίνη. Όπως φαίνεται στο σχήμα-27 η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη ανέστειλε την ειδική δέσμευση της [ $^3$ H] EKC κατά 75% και με  $IC_{50}$  5,7 nM. Χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα τον αγωνιστή DADLE σε μεγάλη συγκέντρωση οπότε και καλύπτει τους  $\mu$  υποδοχείς των κυττάρων DU-145 παρατηρήθηκε ότι η αναστολή της δέσμευσης της [ $^3$ H] EKC επηρεαζόταν ελάχιστα ( $IC_{50}$  4,2 nM ) γεγονός που υποδηλώνει ότι η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη δεσμεύεται κυρίως στους  $\kappa_1$  υποδοχείς, επιβεβαιώνοντας έτσι την κειδικότητα του πεπτιδίου ανάλογη με αυτήν που περιγράφη στην σειρά T47D από καρκίνο του μαστού. Αντίστοιχα η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη ανέστειλε τη δέσμευση της [ $^3$ H]-διπρενορφίνης, αναστολή η οποία πάλι επηρεαζόταν ελάχιστα από την παρουσία 5 $\mu$ M DADLE και άρα οφείλεται στη δέσμευσης της, κυρίως στους  $K_3$  υποδοχείς. Τέλος η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη συνδέεται και με τους  $\mu$  οπιοειδείς υποδοχείς οι οποίοι υπάρχουν στα κύτταρα DU-145, αφού ανέστειλε και την δέσμευση του ειδικού  $\mu$  αγωνιστή [ $^3$ H] DAGO.



**Σχήμα-27.** Αναστολή της ειδικής δέσμευσης διαφόρων τριτωμένων οπιοειδών από την  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη στην καρκινική κυτταρική σειρά DU-145. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα δέσμευσης (δόσης απόκρισης). Τα κύτταρα επώαστηκαν με διάφορους τριτωμένους οπιοειδείς αγωνιστές-ανταγωνιστές παρουσία ή απουσία καζομορφίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο λόγος της ειδικής δέσμευσης παρουσία καζομορφίνης προς την ειδική δέσμευση απουσία καζομορφίνης.

#### Επίδραση της $\alpha_{s1}$ καζομορφίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων DU-145, PC3 και LNCaP

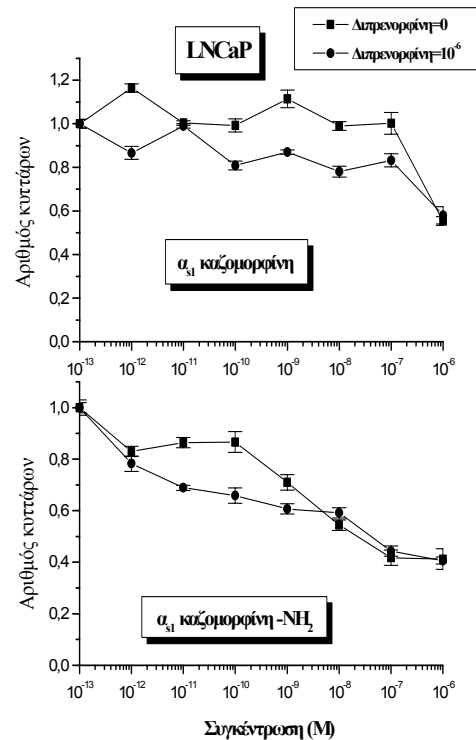
Τα σχήματα 28 και 29 δείχνουν τις καμπύλες δόσης-απόκρισης της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης και του αμιδίου της στα κύτταρα DU-145, PC3, LNCaP απουσία ή παρουσία διπρενορφίνης. Και στις τρεις κυτταρικές σειρές τόσο η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη όσο και το αμίδιο της προκάλεσαν αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Τη μεγαλύτερη δράση παρουσιάζει η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη.



**Σχήμα-28.** Επίδραση της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης και του αμιδίου της στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων DU-145 και PC3 για 4 μέρες, παρουσία ή απουσία του γενικού ανταγωνιστή των οπιοειδών, διπρενορφίνη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τεσσάρων πειραμάτων

στα κύτταρα DU-145 και το αμίδιο στα κύτταρα LNCaP με ποσοστά μέγιστης καταστολής 64% και 59% αντίστοιχα (Πίνακας XI). Όσον αφορά τη διπρενορφίνη, η παρουσία της αντέστρεψε μερικώς τη δράση της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης και του αμιδίου της στα κύτταρα DU-145 και PC3 ενώ την ενίσχυε στα κύτταρα LNCaP.

**Σχήμα-29.** Επίδραση της α<sub>51</sub> καζομορφίνης και του αμιδίου της στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων LNCaP για 6 μέρες, παρουσία ή απουσία του γενικού ανταγωνιστή των οπιοειδών, διπρενορφίνη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα τεσσάρων πειραμάτων

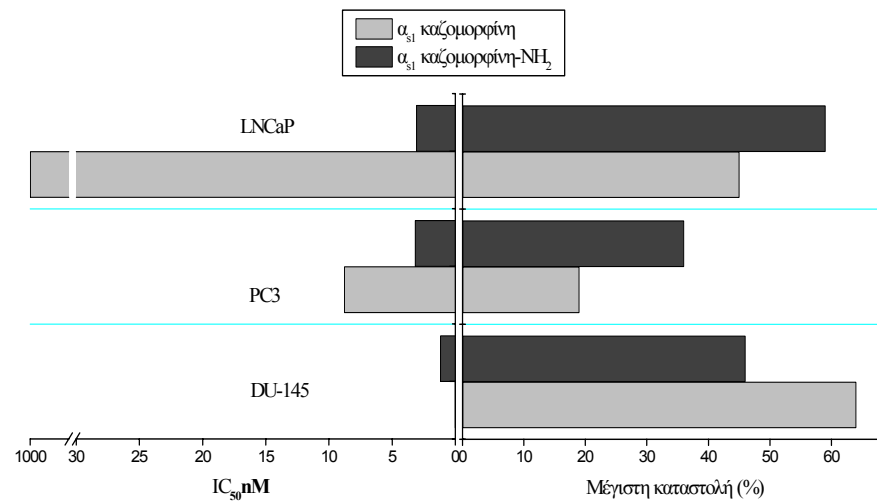


**ΠΙΝΑΚΑΣ XI.** Επίδραση της α<sub>51</sub> καζομορφίνης και του αμιδίου της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των τριών καρκινικών κυτταρικών σειρών του προστάτου.

Κυτταρική σειρά	DU-145		PC3		LNCaP	
	Μέση κατασταλτική Συγκέντρωση IC <sub>50</sub> (nM)	Μέγιστη Αναστολή %	Μέση κατασταλτική Συγκέντρωση IC <sub>50</sub> (nM)	Μέγιστη Αναστολή %	Μέση κατασταλτική Συγκέντρωση IC <sub>50</sub> (nM)	Μέγιστη Αναστολή %
Πεπτίδιο α <sub>51</sub> καζομορφίνη	0,0092 ± 0.00003	64±4	8,8±0.38	19±0.88	1000	45±2.1
+ διπρενορφίνη	0,021±0.0011 65	31±1.6 63±4.5	39±1.78	15±0.7	46±2.3	42±2.01
α <sub>51</sub> καζομορφίνη-NH <sub>2</sub>	1,2±0.04	46±2	3,2±0.14	36±1.5	3,1±0.12	59±3.8
+ διπρενορφίνη	420±23	39±1.9	35±1.6	23±0.9	0,0021±0.0001	59±3.1

Παρουσιάζεται η μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα του IC<sub>50</sub> για την α<sub>51</sub> καζομορφίνη και το αμίδιο της όπως υπολογίστηκε μετά από ανάλυση με προσέγγιση σιγμοειδούς καμπύλης των δεδομένων τα οποία παρουσιάζονται στα σχήμα-28,29 καθώς και της εκατοστιαίας αλλαγής σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.





**Σχήμα-30.** Συγκριτικά αποτελέσματα της επίδρασης της α<sub>s1</sub> καζομορφίνης και του αμιδίου της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των τριών καρκινικών κυτταρικών σειρών του προστάτου. Στο γράφημα δεξιά παρουσιάζεται το μέγιστο ποσοστό καταστολής ενώ αριστερά η μέση κατασταλτική συγκέντρωση IC<sub>50</sub>

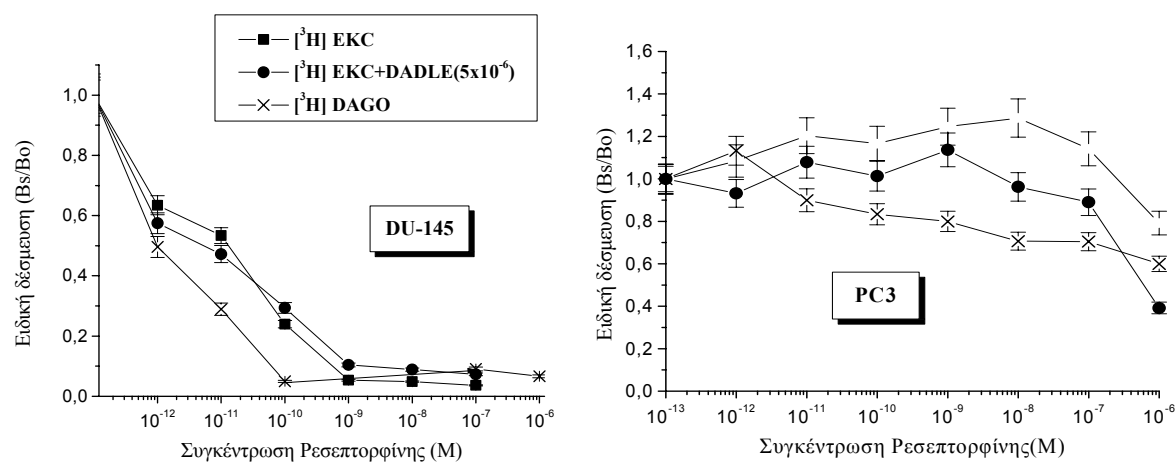
### **B. Ρεσεπτορφίνη - Ένα νέο πεπτίδιο με οπιοειδή δράση**

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων τους (Reisine and Bell 1993). Βρέθηκε ότι ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων με επτά διαμεμβρανικά τμήματα και ότι οι τρεις διαφορετικοί τύποι παρουσιάζουν υψηλή ομολογία περισσότερο μεταξύ των διαμεμβρανικών και ενδοκυττάρων τμημάτων. Στο δεύτερο κοινό διαμεμβρανικό τμήμα των οπιοειδών υποδοχέων υπάρχει η αλληλουχία Tyr-Ile-Phe-Asn-Leu, η οποία περιέχει το αμινοτελικό αμινοξύ τυροσίνη χαρακτηριστικό αμινοξύ όλων των πεπτιδίων με οπιοειδή δράση. Πιθανή οπιοειδής δράση αυτού του πενταπεπτιδίου και απελευθέρωση του τοπικά, ίσως αποτελεί έναν πιθανό τρόπο δράσης των οπιοειδών.

### **Δέσμευση της Ρεσεπτορφίνης σε υποδοχείς των οπιοειδών**

Γνωρίζοντας ότι στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτου DU-145 και PC3 υπάρχουν οπιοειδείς υποδοχείς (μ, κ<sub>1</sub>, κ<sub>3</sub> και μ, κ<sub>1</sub> αντίστοιχα) ελέγχθηκε η δέσμευση της ρεσεπτορφίνης σε αυτούς τους υποδοχείς. Έτσι πραγματοποιήθηκαν

πειράματα με τα οποία μελετήθηκε η αναστολή της δέσμησης ραδιοσημασμένων οπιοειδών αγωνιστών ειδικών για τους οπιοειδείς υποδοχείς από τη ρεσεπορφίνη.



**Σχήμα-31.** Αναστολή της ειδικής δέσμησης διαφόρων τριτωμένων οπιοειδών από την ρεσεπορφίνη στις κυτταρικές σειρές DU-145 και PC3. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα δέσμησης (δόσης-απόκρισης). Τα κύτταρα επώαστηκαν με διάφορους τριτωμένους οπιοειδείς αγωνιστές-ανταγωνιστές παρουσία ή απουσία ρεσεπορφίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο λόγος της ειδικής δέσμησης παρουσία καζομορφίνης προς την ειδική δέσμηση απουσία καζομορφίνης.

Στην κυτταρική σειρά DU-145 (σχήμα-31) βρέθηκε ότι η ρεσεπορφίνη ανέστειλε την ειδική δέσμηση της  $[^3\text{H}]$  EKC αναστολή που δεν επηρεαζόταν από την παρουσία 5  $\mu\text{M}$  DADLE, ( $\text{IC}_{50}$  0,0234 nM) καθώς και την ειδική δέσμηση του  $[^3\text{H}]$  DAGO στους  $\mu$  υποδοχείς ( $\text{IC}_{50}$  0,065 nM).

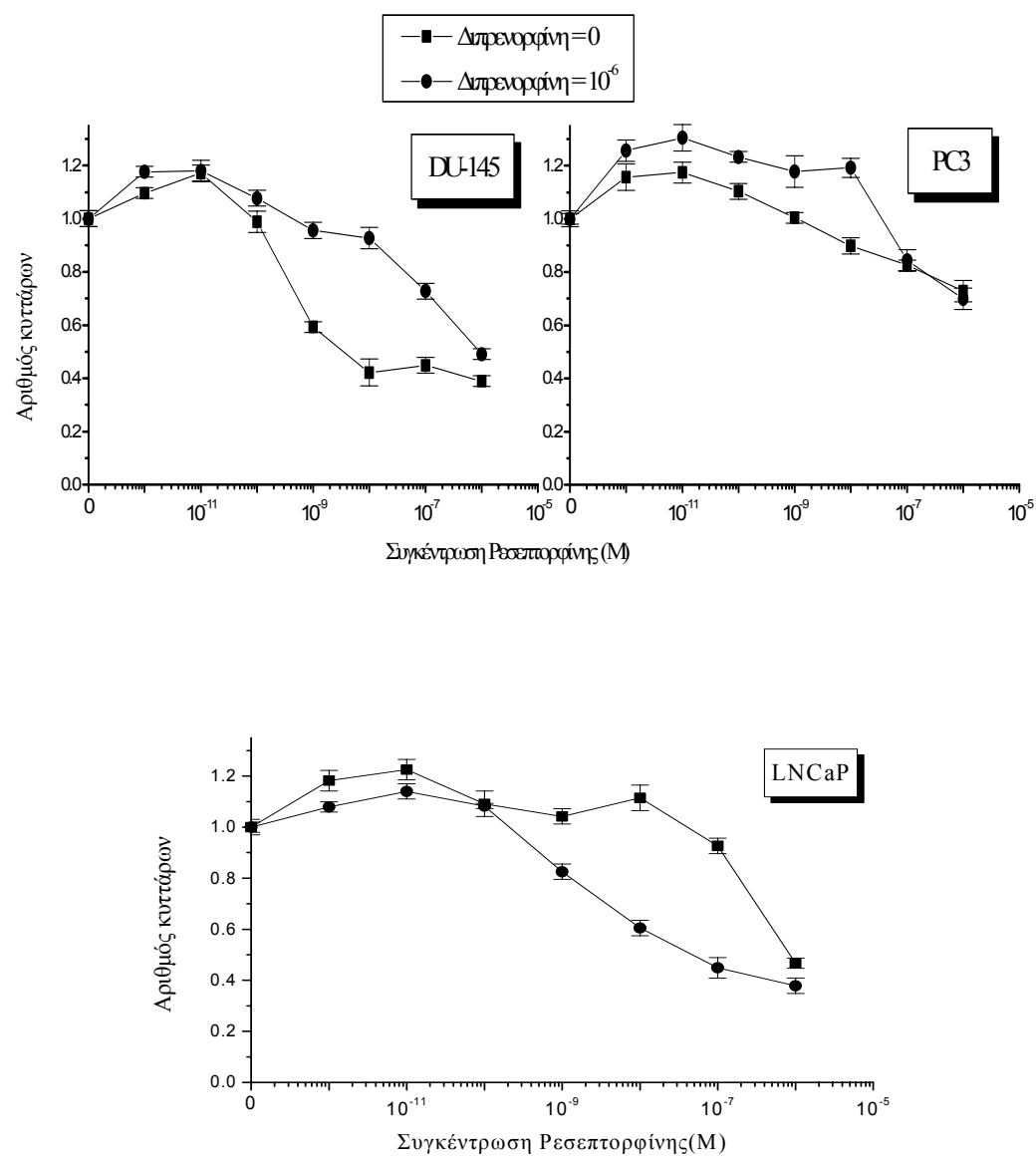
Στην κυτταρική σειρά PC3 (σχήμα-31) παρατηρήθηκε αναστολή της δέσμησης του  $[^3\text{H}]$  DAGO στους  $\mu$  υποδοχείς με  $\text{IC}_{50}$  0,043 nM και μικρή αναστολή της δέσμησης της  $[^3\text{H}]$  EKC στους  $\kappa_1$  υποδοχείς με πολύ μεγάλο  $\text{IC}_{50}$  (>1000 nM). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα XII που ακολουθεί.

**Πίνακας XII.** Αναστολή της ειδικής δέσμησης ραδιοσημασμένων οπιοειδών αγωνιστών από την ρεσεπορφίνη.

$[^3\text{H}]$ Αγωνιστής	Μέση Κατασταλτική Συγκέντρωση $\text{IC}_{50}$ (nM)					
	$[^3\text{H}]$ DPDPE ή DSLET	$[^3\text{H}]$ - DAGO	$[^3\text{H}]$ EKC	$[^3\text{H}]$ - Διπρενορφίνη	$[^3\text{H}]$ EKC +DADLE	$[^3\text{H}]$ - Διπρενορφί νη +DADLE
Κυτταρική σειρά						
DU145	-	0,065 $\pm$ 0,003	0,0234 $\pm$ 0,01	-	0,0287 $\pm$ 0,014	-
PC3	-	0,043 $\pm$ 0,02	>1000	-	>1000	-

Παρουσιάζεται η μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα του  $\text{IC}_{50}$  για την αναστολή της ειδικής δέσμησης των διαφόρων οπιοειδών αγωνιστών όπως υπολογίστηκε μετά από ανάλυση με προσέγγιση σιγμοειδούς καμπύλης των δεδομένων τα οποία παρουσιάζονται στο σχήμα-31.

Επίδραση της Ρεσεπτορφίνης στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων DU-145, PC3 και LNCaP



Σχήμα-32. Επίδραση της ρεσεπτορφίνης στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτου παρουσία ή απουσία του γενικού ανταγωνιστή των οπιοειδών, διπρενορφίνη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τεσσάρων πειραμάτων.

Η ρεσεπτορφίνη και στις τρεις καρκινικές σειρές του προστάτου προκάλεσε καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η μέγιστη καταστολή παρατηρήθηκε στη κυτταρική σειρά DU-145 και στην LNCaP (σχήμα 32), με κοινό ποσοστό μέγιστης καταστολής 60% αλλά διαφορετικό IC<sub>50</sub>, 0,436 nM και 87 nM αντίστοιχα, ενώ στη κυτταρική σειρά PC3 η καταστολή που παρατηρήθηκε ήταν μικρή (27%).

Ταυτόχρονη επίδραση με οπιοειδή ανταγωνιστή είχε ως αποτέλεσμα στις κυτταρικές σειρές DU-145 και PC3 την μειωμένη δράση της Ρεσεπτορφίνης αυξάνοντας το IC<sub>50</sub> κατά δύο λογάριθμους. Αντίθετα στη κυτταρική σειρά LNCaP η παρουσία της διπρενορφίνης ενίσχυε τη δράση της μειώνοντας την τιμή του IC<sub>50</sub> (87 nM) κατά ένα λογάριθμο (2.88 nM).

### **Συμπέρασμα**

Η ρεσεπτορφίνη δεσμεύεται στους μ<sub>1</sub> και κ<sub>1</sub> οπιοειδείς υποδοχείς στις δύο κυτταρικές σειρές DU-145 και PC3, μέσω των οποίων πραγματοποιείται και η δράση της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό η οποία είναι ανστρέψιμη από την διπρενορφίνη. Στην κυτταρική σειρά LNCaP όπου παρουσιάζει σημαντική καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού η δράση της δεν επάγεται μέσω οπιοειδών υποδοχέων.

## ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΕΩΣ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

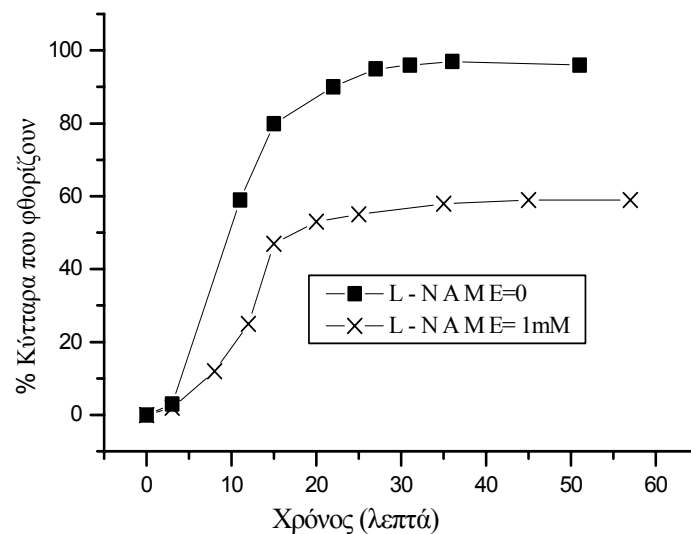
Ο κλασσικός τρόπος δράσεως των οπιοειδών σε διάφορα συστήματα (όπως εξάλλου και ο τρόπος δράσεως όλων των ουσιών που δρουν μέσω υποδοχέων με επτά διαμεμβρανικά τμήματα) είναι η τροποποίηση της συνθέσεως cAMP μέσω της δράσεως των G πρωτεϊνών. Στη παρούσα μελέτη μελετήθηκαν εναλλακτικοί νέοι τρόποι δράσεως των οπιοειδών, δεδομένου ότι αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας αλλά και δεδομένα τα οποία δεν παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη, δεν μπορούν να ερμηνευθούν από τον κλασσικό τρόπο δράσεως των οπιοειδών (π.χ. δράση στην κυτταρική σειρά LNCaP, στην οποία δεν ανιχνεύθηκαν οπιοειδείς υποδοχείς).

**A. Μελέτη πιθανής αλληλεπίδρασης οπιεργικού συστήματος και ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NO<sup>•</sup>)**

Τα τελευταία χρόνια το σύστημα της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NO<sup>•</sup>) και των ενζύμων που το συνθέτουν (συνθάσες της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου, NOS), έχει αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία σε καρδιαγγειακές παθήσεις και σε περιπτώσεις καρκίνου (Wink et al. 1998). Η NO<sup>•</sup> έχει βρεθεί ότι δρά ως κυτταρικός διαβιβαστής, νευροδιαβιβαστής και ενδοκυττάριο δευτερογενές μήνυμα (Colasanti and Suzuki 2000). Αρκετές μελέτες αναφέρουν αλληλεπίδραση μεταξύ του οπιεργικού συστήματος και του συστήματος της NO<sup>•</sup> σε διάφορα συστήματα. Ο ρόλος της στον καρκίνο είναι αντιφατικός (Wink et al. 1998). Η NO<sup>•</sup> μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο, ενώ παράλληλα έχει βρεθεί ότι η παραγωγή της από τα καρκινικά κύτταρα ενισχύει την αγγειογένεση και το μεταστατικό δυναμικό ενός όγκου (Adams et al. 1996; Budziszewska et al. 1999; Bhat et al. 1998). Στην προσπάθεια διερεύνησης του τρόπου δράσεως των οπιοειδών και τη πιθανή αλληλεπίδραση τους με το σύστημα NO<sup>•</sup>/NOS σε καρκινικά κύτταρα, μελετήθηκε η επίδραση των οπιοειδών στο ένζυμο συνθάση της NO<sup>•</sup> (NOS). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε αρχικά σε καρκινικά κύτταρα μαστού (T47D) στα οποία ανιχνεύσαμε αρχικά ότι παράγουν NO<sup>•</sup>.

### Παραγωγή της NO από τα κύτταρα T47D

Η παραγωγή της NO από τα κύτταρα προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την ουσία DAF-DA η οποία παγιδεύεται μέσα στα κύτταρα και μετατρέπεται στη φθορίζουσα μορφή της μόνο παρουσία της NO. Έτσι τα κύτταρα που παράγουν NO φθορίζουν και μπορούν να μετρηθούν σε κυτταρομετρητή ροής (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι 5). Όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί με την πάροδο του χρόνου παρατηρήθηκε αύξηση των κυττάρων που φθορίζουν που σημαίνει αύξηση και της παραγόμενης ποσότητας της NO. Στα κύτταρα τα οποία είχαν προεπωαστεί με τον ανταγωνιστή της NOS, L-NAME παρατηρήθηκε αναστολή της παραγωγής της NO.



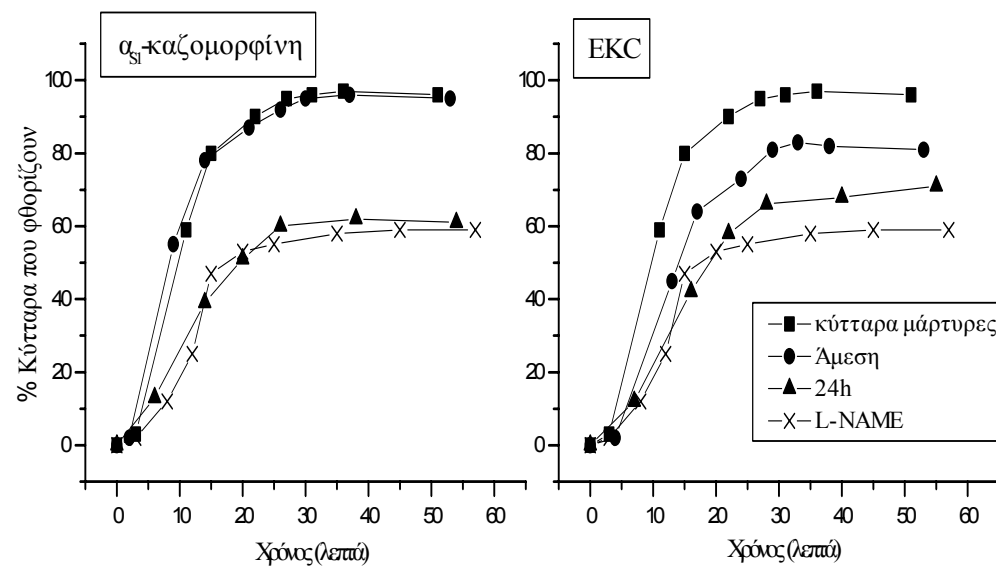
**Σχήμα-33. Παραγωγή της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου από τα κύτταρα T47D.**

Στα κύτταρα προστέθηκε η DAF-DA και ο πληθυσμός των κυττάρων που φθορίζουν λόγω της παραγωγής NO προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής για διάστημα 60 λεπτών. Επιπλέον προσδιορίστηκε η παραγωγή της NO από κύτταρα που είχαν προεπωαστεί για 10 λεπτά με 1mM L-NAME (ανταγωνιστής της NOS). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προέρχονται από πείραμα που επαναλήφθηκε πέντε φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

### Επίδραση των οπιοειδών στη παραγωγή της NO

Κύτταρα T47D επώαστηκαν για 3 λεπτά ή 24 ώρες με οπιοειδή, τους προστέθηκε η DAF-DA και ακολούθησε προσδιορισμός του εξαρτωμένου από το NO φθορίζοντων κυττάρων για τακτά χρονικά διαστήματα (3-60 λεπτών). Τα οπιοειδή που μελετήθηκαν ήταν η EKC και η  $\alpha_1$  καζομορφίνη στην προσπάθειά μας να μελετήσουμε εάν ένα λιπόφιλο αλκαλοειδές και ένα υδρόφιλο πεπτίδιο έχουν ταυτόσημες ή διαφορετικές δράσεις.

Όπως φαίνεται στο σχήμα-34, τα κύτταρα παράγουν NO<sup>•</sup> και μέσα σε διάστημα μιας ώρας το 95% των κυττάρων παρουσιάζουν έντονο φθορισμό. Επίδραση με EKC τόσο άμεσα όσο και μετά από 24ώρη επώαση, είχε ως αποτέλεσμα αναστολή της παραγωγής της NO<sup>•</sup> η οποία παρατηρήθηκε πάρα πολύ γρήγορα (από τα 3 λεπτά περίπου). Αντίθετα, η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη ανέστειλε την παραγωγή της NO<sup>•</sup> μόνο μετά από 24 ώρες επίδραση. Η αναστολή που παρατηρήθηκε είναι όμοια με αυτήν που παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα είχαν προεπωαστεί για 10 λεπτά με τον ανταγωνιστή της NOS, L-NAME.

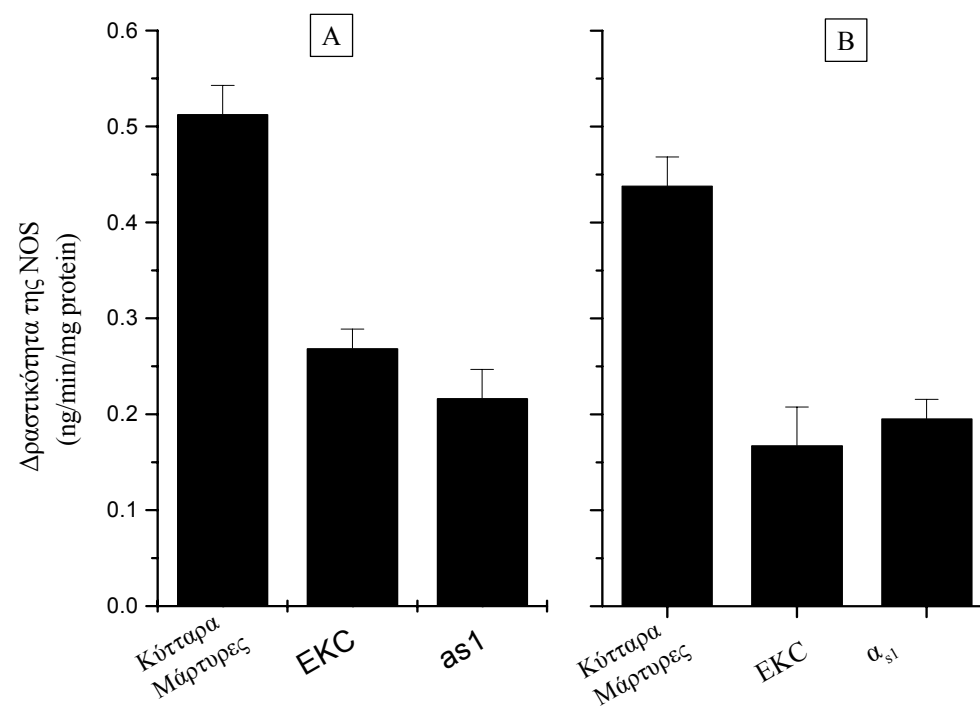


**Σχήμα-34. Επίδραση των οπιοειδών στην παραγωγή NO<sup>•</sup> από τα κύτταρα T47D.** Τα κύτταρα επωάστηκαν με 10<sup>-8</sup> M EKC ή  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη είτε άμεσα είτε για 24 ώρες. Στη συνέχεια τους προστέθηκε η DAF και ο πληθυσμός των κυττάρων που φθορίζουν λόγω της παραγωγής NO<sup>•</sup> προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής σε διάστημα 60 λεπτών. Παράλληλα κύτταρα προεπωάστηκαν για 10 λεπτά και με 1mM L-NAME (ανταγωνιστής της NOS). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προέρχονται από πείραμα που επαναλήφθηκε πέντε φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

#### Επίδραση των οπιοειδών στη συνθάση της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου μονοξειδίου (NOS)

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν μία άμεση δράση των οπιοειδών στην παραγωγή της NO<sup>•</sup>. Με στόχο τη διερεύνηση αυτής της δράσης μελετήθηκε η δραστηριότητα της NOS μετά από επώαση των κυττάρων για 24 ώρες με οπιοειδή. Όπως φαίνεται στο σχήμα-35A η δραστηριότητα της NOS που μετρήθηκε σε ομογενοποίημα κυττάρων ελαττώθηκε περίπου κατά 50% όταν τα κύτταρα είχαν προεπωαστεί με EKC ή με  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη. Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα

όταν η μέτρηση της δραστηριότητας της NOS μετρήθηκε σε κητταρόπλασμα κυττάρων παρουσία οπιοειδών (σχήμα-35B) γεγονός που υποδηλώνει άμεση αλληλεπίδραση των οπιοειδών με τη NOS.



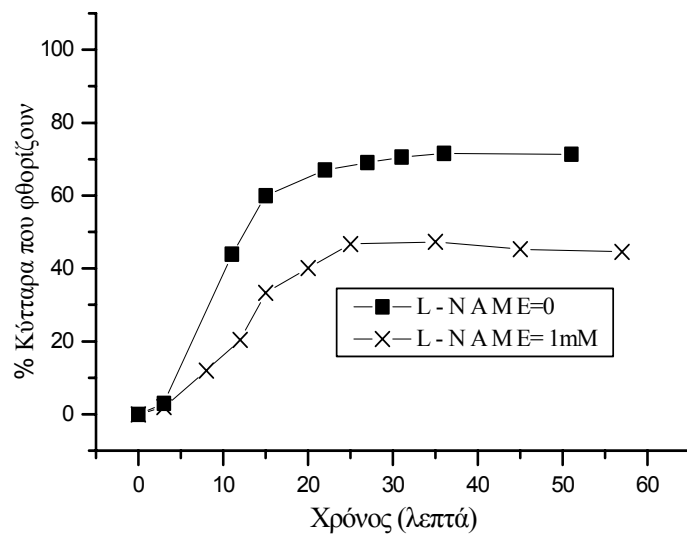
**Σχήμα-35. Επίδραση των οπιοειδών στη δραστηριότητα της συνθετάσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NOS).** **A.** Τα κύτταρα προεπώαστηκαν για 24 ώρες με  $10^{-8}$  M EKC ή  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη και σε ομογενοποίηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της δραστηριότητας της NOS (βλεπε Υλικά και Μέθοδοι 6). **B.** Η μέτρηση της δραστηριότητας της NOS πραγματοποιήθηκε σε ομογενοποίηση κυττάρων παρουσία ή απουσία (κύτταρα μάρτυρες)  $10^{-8}$  M EKC ή  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη. Τα αποτελέσματα δίνονται ως τη μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων εις τριπλούν.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι τα οπιοειδή αναστέλλουν την παραγωγή της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου  $\text{NO}^{\cdot}$  επιδρώντας απευθείας στο ένζυμο (NOS) το οποίο είναι υπεύθυνο για την σύνθεση της.

#### Παραγωγή της $\text{NO}^{\cdot}$ από καρκινικά κύτταρα προστάτου

Παραγωγή της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) ανιχνεύθηκε και στα καρκινικά κύτταρα προστάτου (PC3) (σχήμα-36) καθώς και δραστηριότητα του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της (NOS). Παρ'όλ'αυτά προκαταρκτικές μελέτες έδειξαν ότι τα οπιοειδή δεν επηρεάζουν τη δραστηριότητα της NOS.





**Σχήμα-36. Παραγωγή της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου από καρκινικά κύτταρα προστάτου.** Στα κύτταρα προστέθηκε η DAF και ο πληθυσμός των κυττάρων που φθορίζουν λόγω της παραγωγής NO<sup>•</sup>, προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής για διάστημα 60 λεπτών. Επιπλέον προσδιορίστηκε η παραγωγή της NO<sup>•</sup> από κύτταρα που είχαν προεπωαστεί για 10 λεπτά με 1mM L-NAME (ανταγωνιστής της NOS). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προέρχονται από πείραμα που επαναλήφθηκε πέντε φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

### Συμπέρασμα

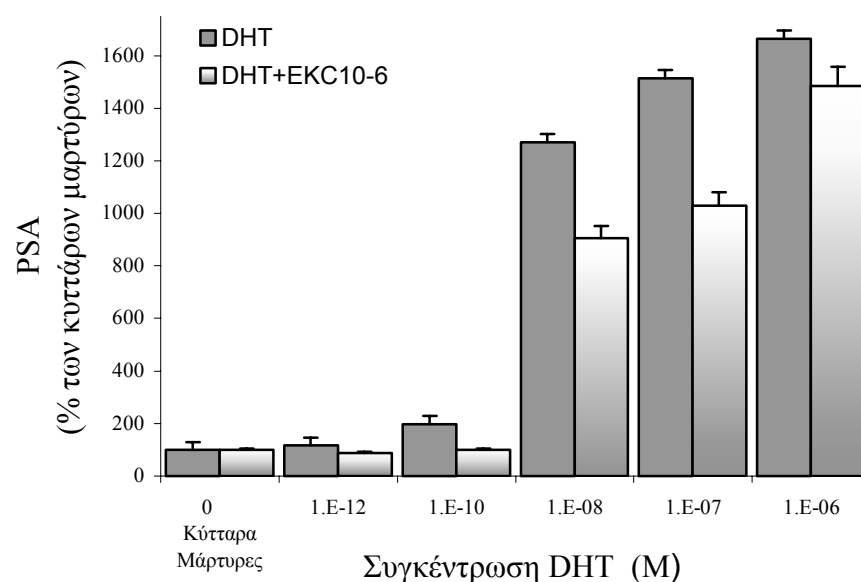
Τα ανωτέρω αποτελέσματα, μολονότι πρακαταρκτικά, υποδηλώνουν ότι, ο μαστός και ο προστάτης εμφανίζονται διαφορετικά ως προς την επίδραση στο σύστημα παραγωγής NO<sup>•</sup>. Απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση του συστήματος, και ιδιαίτερα της διαφορετικής δράσεως αλκαλοειδών και πεπτιδίων, λαμβάνοντας υπ' όψιν τον πιθανό διαφορετικό τρόπο ενδοκυτταρώσεώς τους

### **Β. Μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης οπιοειδών και ανδρογόνων σε καρκινικά κύτταρα του προστάτου**

Όπως προαναφέρθηκε, στην κυτταρική σειρά LNCaP παρατηρήθηκε δράση των οπιοειδών παρόλο που δεν ανιχνεύθηκαν οπιοειδείς υποδοχείς, γεγονός που υποδηλώνει ένα διαφορετικό τρόπο δράσης. Τα κύτταρα LNCaP είναι ορμονοευαίσθητα, φέρουν ανδρογονικούς υποδοχείς και ανταποκρίνονται στην δράση των ανδρογόνων με αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους. Έτσι μελετήθηκε η πιθανότητα, η δράση των οπιοειδών να σχετίζεται με αυτή των ανδρογόνων.

**Επίδραση των οπιοειδών στην επαγόμενη από τα ανδρογόνα έκκριση του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) από την ορμονοευαίσθητη καρκινική κυτταρική σειρά του προστάτου LNCaP**

Τα κύτταρα LNCaP παράγουν ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA) (Hogorzewicz et al. 1983) η έκφραση του οποίου επάγεται από τα ανδρογόνα. Πιθανή αλληλεπίδραση οπιοειδών και ανδρογόνων- ανδρογονικών υποδοχέων θα επηρέαζε και την παραγωγή του PSA. Έτσι, τα κύτταρα LNCaP επώαστηκαν σε καλλιέργεια, για 24 ώρες με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις του βιολογικά δραστικού ανδρογόνου 5α-διυδροτεστοστερόνη (DHT) απουσία ή παρουσία του γενικού οπιοειδούς αγωνιστή αιθυλκετοκυκλαζοσίνη (EKC). Το θρεπτικό καλλιέργειας συλλέχθηκε και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του σε PSA. Όπως φαίνεται στο σχήμα-37 η δόσοεξαρτώμενη επαγωγή του PSA από την DHT αναστέλλεται από την παρουσία  $10^{-6}$  M EKC. Το μέγιστο ποσοστό αναστολής παρατηρήθηκε σε συγκεντρώσεις  $10^{-7}$  και  $10^{-8}$  της DHT όπου παρατηρήθηκε και η αύξηση στην έκκριση του PSA.



**Σχήμα-37. Επίδραση των οπιοειδών στην επαγόμενη από τα ανδρογόνα έκκριση του PSA από τα κύτταρα LNCaP.** Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις DHT απουσία ή παρουσία του γενικού οπιοειδούς αγωνιστή EKC ( $10^{-6}$  M) σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης του PSA στο θρεπτικό καλλιέργειας και αναγωγή της στον αριθμό των κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστά επί των κυττάρων μαρτύρων και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων εις τριπλούν.

**Μελέτη της πιθανής επίδρασης των οπιοειδών στους ενδοκυττάριους ανδρογονικούς υποδοχείς που φέρουν τα κύτταρα LNCaP**

Η δράση των ανδρογόνων παραγματοποιείται μέσω ενδοκυττάρων ανδρογονικών υποδοχέων (Chang et al. 1988). Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω αποτελέσματα θεωρήθηκε σκόπιμη η διερεύνηση της δράσης των οπιοειδών στους ενδοκυττάριους ανδρογονικούς υποδοχείς που φέρει η καρκινική κυτταρική σειρά του προστάτου LNCaP. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε επίδραση με τον γενικό αγωνιστή των οπιοειδών, EKC, για 24, 48 και 96 ώρες σε καλλιέργεια κυττάρων LNCaP και στα κύτταρα μετρήθηκαν ανδρογονικοί υποδοχείς. Τόσο ο αριθμός των υποδοχέων ανά κύτταρο όσο και η συγγένεια δέσμευσης της τεστοστερόνης ( $K_D$ ) στον ανδρογονικό υποδοχέα δεν επηρεαζόταν από την EKC.

**Μελέτη της πιθανής μη γενωμικής δράσης των ανδρογόνων στην καρκινική κυτταρική σειρά του προστάτου LNCaP- Πιθανός τρόπος δράσης**

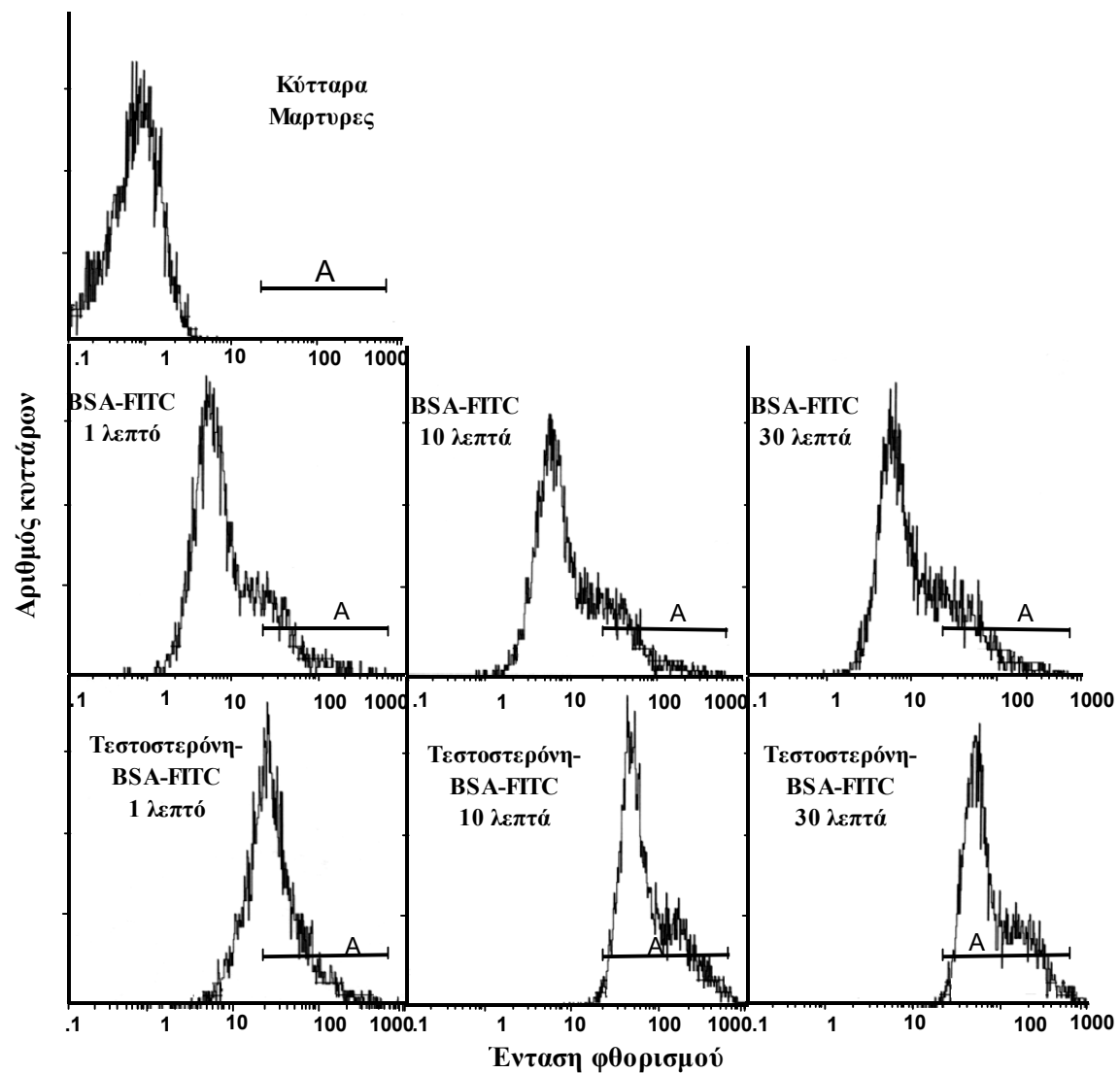
Ο κλασικός τρόπος δράσης των ανδρογόνων, όπως και όλων των στεροειδών ορμονών, είναι μέσω των ενδοκυττάρων υποδοχέων τους οι οποίοι μετά τη σύνδεσή τους με τα ανδρογόνα εισέρχονται στον πυρήνα επηρεάζοντας τη έκφραση διαφόρων γονιδίων όπως αυτό του ειδικού προστατικού αντιγόνου (Hogorzewicz et al.1983; Zhou et al. 1994; Kumar and Tindall 1998). Η αλληλουχία αυτή των γεγονότων είναι χρονοβόρα απαιτώντας τουλάχιστον 45 min. Αρκετές μελέτες όμως έδειξαν ότι τα στεροειδή σε κάποιες περιπτώσεις δρουν πολύ γρήγορα ενώ έχουν δράση ακόμα και σε κύτταρα που δεν φέρουν ενδοκυττάριους υποδοχείς, γεγονός που εξηγήθηκε τα τελευταία χρόνια όταν βρέθηκε ότι υπάρχουν και μεμβρανικές θέσεις σύνδεσης των στεροειδών ενώ η δράση τους είναι μη γενωμική (Brann et al. 1995; Benten et al. 1997; Wehling 1997; Benten et al. 1999b).

Ανίχνευση μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων στα κύτταρα LNCaP

Λαμβάνοντας υπόψιν, τα παραπάνω δεδομένα και έναν αριθμό αναφορών όπου ανιχνεύθηκαν μεμβρανικές θέσεις σύνδεσης και για τα ανδρογόνα σε διάφορους κυτταρικούς τύπους (Lieberherr and Grosse 1994; Benten et al. 1997; Benten et al. 1999a; Benten et al. 1999b; Armen and Gay 2000) πραγματοποιήθηκαν μελέτες για την διερεύνηση της πιθανής ύπαρξή τους και στα κύτταρα LNCaP.

Ανίχνευση θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων στην επιφάνεια των κυττάρων LNCaP με κυτταρομετρία ροής

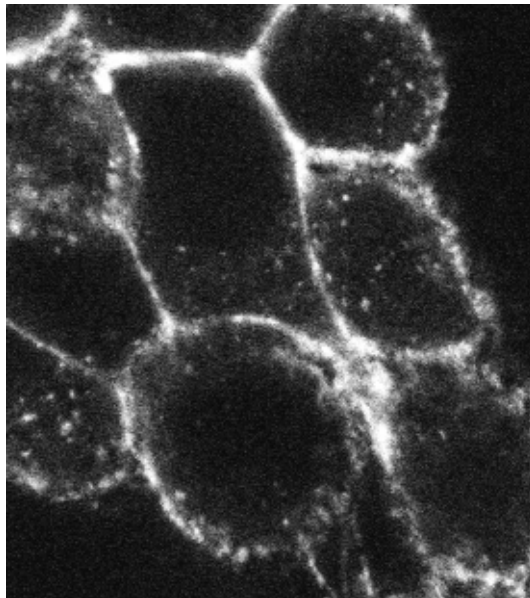
Για την ανίχνευση μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων, τα κύτταρα επώαστηκαν με τεστοστερόνη συνδεδεμένη με BSA για να αποκλειστεί η πιθανότητα παθητικής εισόδου της μέσα στα κύτταρα και με την φθορίζουσα ουσία ισοθειοκυανούχο φλουοροσκεΐνη (FITC) που επιτρέπει την ανίχνευση των φθορίζοντων κυττάρων στον κυτταρομετρητή ροής. Για την ανίχνευση της μη ειδικής σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε BSA-FITC. Μετά από 1 λεπτό επώαση των κυττάρων με  $10^{-7}$  M τεστοστερόνη-BSA-FITC, ειδική σύνδεση παρατηρήθηκε στο 50 % του πληθυσμού ενός δείγματος 10.000 κυττάρων (σχήμα-38) συγκρίνοντας πάντα με τα κύτταρα μάρτυρες και τα κύτταρα που επώαστηκαν με την BSA-FITC για αντίστοιχο χρονικό διάστημα. Με την πάροδο του χρόνου παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης του φθορισμού με μέγιστη τιμή τα 30 λεπτά. Επώαση των κυττάρων με τεστοστερόνη-BSA-FITC παρουσία περίσσειας DHT ( $10^{-4}$  M) είχε σαν αποτέλεσμα μείωση της έντασης το φθορισμού επιβεβαιώνοντας την ειδική σύνδεση της τεστοστερόνης.



Σχήμα-38. Ανίχνευση των κυττάρων LNCaP στα οποία έχει γίνει δέσμευση της τεστοστερόνης-BSA-FITC με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα επώαστηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα με  $10^{-7}$  M τεστοστερόνη-BSA-FITC ή BSA-FITC (για την μη ειδική δέσμευση) και αναλύθηκαν στον κυτταρομετρητή ροής σε ένα δείγμα 10.000 κυττάρων. Η γραμμή A δείχνει σε κάθε χρονική στιγμή τον πληθυσμό των κυττάρων που φθορίζουν λόγω ειδικής δέσμευσης.

**Ανίχνευση θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων στην επιφάνεια των κυττάρων LNCaP με μικροσκοπία συνεστίασης**

Τα κύτταρα επώαστηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα για 30 λεπτά με  $10^{-6}$  M τεστοστερόνη-BSA-FITC και BSA-FITC για τον προσδιορισμό της μη ειδικής δέσμευσης. Ακολούθησε μορφολογική παρατήρηση με μικροσκοπία συνεστίασης. Όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί η επιφάνεια των κυττάρων LNCaP φθορίζει, γεγονός που σημαίνει δέσμευση της τεστοστερόνης-BSA-FITC.



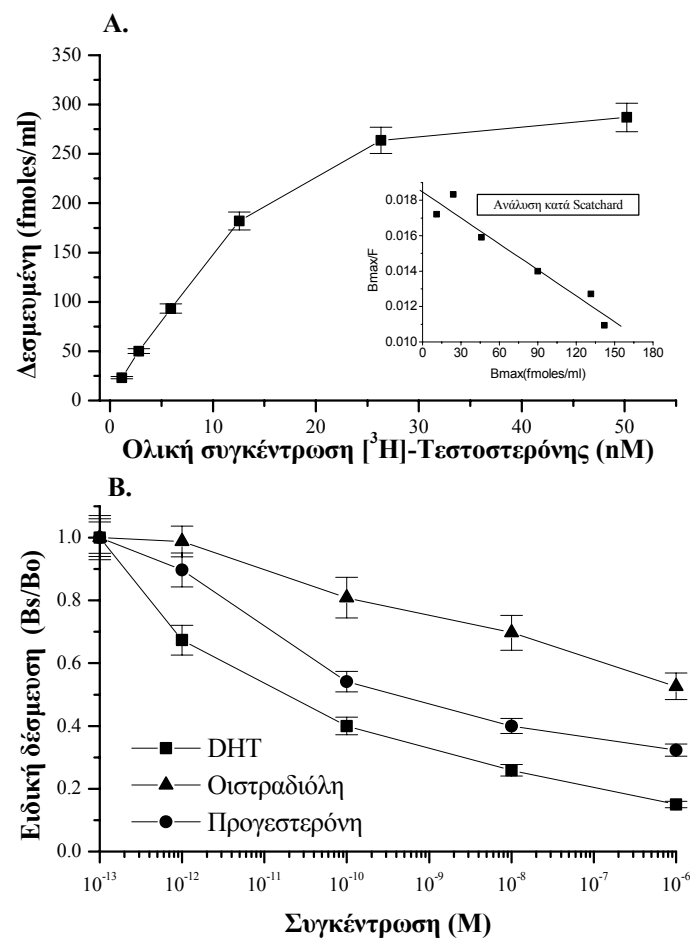
**Σχήμα-39.** Μορφολογική παρατήρηση των κυττάρων LNCaP στα οποία έχει γίνει δέσμευση της τεστοστερόνης-BSA-FITC με μικροσκοπία συνεστίασης. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 30 λεπτά με  $10^{-6}$  M τεστοστερόνη-BSA-FITC ή BSA-FITC (για την μη ειδική δέσμευση) και παρατηρήθηκαν με μικροσκόπιο συνεστίασης.

#### *Ανίχνευση και μελέτη των ιδιοτήτων των θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων με πειράματα δέσμευσης σε μεμβρανικά παρασκευάσματα των κυττάρων LNCaP*

Έχοντας ανιχνεύσει ειδικές θέσεις σύνδεσης των ανδρογόνων στην μεμβράνη των κυττάρων LNCaP, πραγματοποιήθηκαν μελέτες δέσμευσης για το περαιτέρω χαρακτηρισμό τους. Έγινε απομόνωση κυτταρικών μεμβρανών και στη συνέχεια πειράματα δέσμευσης (κορεσμού) όπου μεμβρανικά κυτταρικά παρασκευάσματα επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις ραδιοσημασμένης τεστοστερόνης, κυμαινόμενες από 1 έως 50 nM απουσία ή παρουσία 5 μM DHT (μη ειδική δέσμευση). Όπως φαίνεται στο σχήμα-40Α παρατηρήθηκε ειδική δέσμευση της [ $^3$ H]-τεστοστερόνης στις μεμβράνες των κυττάρων LNCaP ενώ μετά από κάποια μέγιστη οριακή τιμή της ραδιενεργής τεστοστερόνης επέρχεται κορεσμός των θέσεων ειδικής δέσμευσης. Μετά από ανάλυση των αποτελεσμάτων κατά Scatchard βρέθηκε ότι η συγγένεια δέσμευσής της, είναι αρκετά υψηλή ( $10,9 \pm 0,8$  nM ) και ο μέγιστος αριθμός των θέσεων σύνδεσης  $144,3 \pm 11,2$  fmoles/mg πρωτεΐνης, που αντιστοιχεί περίπου σε 13.340 θέσεις ανά κύτταρο.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μελέτες δέσμευσης δόσης-απόκρισης για να διαπιστωθεί η εκλεκτικότητα των μεμβρανικών θέσεων που ανιχνεύθηκαν για τα ανδρογόνα. Μεμβρανικά παρασκευάσματα επώαστηκαν με 5nM [ $^3$ H] τεστοστερόνη παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων DHT ( $10^{-12}$  - $10^{-6}$  M) ή άλλων στεροειδών

ορμονών. Όπως φαίνεται στο σχήμα-40B η DHT ανέστειλε την ειδική δέσμευση της [ $^3\text{H}$ ] τεστοστερόνης με υψηλή συγγένεια σε αντίθεση με την αναστολή που παρατηρήθηκε από την προγεστερόνη και την οιστραδιόλη όπου η συγγένεια δέσμευσης ήταν χαμηλότερη 100 και 1000 φορές αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας έτσι την εκλεκτικότητα των μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης της τεστοστερόνης που ανιχνεύθηκαν.



**Σχήμα-40. Ανίχνευση και μελέτη των φαρμακολογικών ιδιοτήτων των μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων στα κύτταρα LNCaP. Α. Μελέτες δέσμευσης κορεσμού** Μεμβρανικά παρασκευάσματα των κυττάρων LNCaP (2 mg/ml) επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις [ $^3\text{H}$ ] τεστοστερόνης (1-50nM) απουσία ή παρουσία 5μM μη ραδιενεργής τεστοστερόνης για τον προσδιορισμό της μη ειδικής δέσμευσης, στο μικρό σχήμα δίνεται η ανάλυση των αποτελεσμάτων κατά Scatchard και **Β. Μελέτες δόσης-απόκρισης.** Μεμβρανικά παρασκευάσματα των κυττάρων LNCaP (2 mg/ml) επώαστηκαν με 5nM [ $^3\text{H}$ ] τεστοστερόνης παρουσία διαβαθμιζόμενων συγκεντρώσεων DHT, οιστραδιόλης και προγεστερόνης.

Ανίχνευση μόνο του κλασσικού ενδοκυττάριου υποδοχέα των ανδρογόνων με ανοσοϊστοχημεία

Έχοντας ανιχνεύσει μεμβρανικές θέσεις δέσμησης των ανδρογόνων στα κύτταρα LNCaP μελετήθηκε με ανοσοϊστοχημεία η πιθανότητα να πρόκειται για τους ίδιους τους κλασσικούς ανδρογονικούς υποδοχείς οι οποίοι βρίσκονται στη μεμβράνη. Έτσι χρησιμοποιώντας αντίσωμα κατά του κλασσικού ανδρογονικού υποδοχέα έγινε προσπάθεια ανίχνευσης των μεμβρανικών θέσεων στα κύτταρα LNCaP. Όπως φαίνεται στο σχήμα-41 το αντίσωμα ανίχνευσε ανδρογονικούς υποδοχείς κυρίως στον πυρήνα γεγονός που οφείλεται στη μετατόπιση του κλασσικού ανδρογονικού υποδοχέα παρουσία ανδρογόνων. Σε πειράματα στα οποία δεν επιτράπη η είσοδος του αντισώματος στο εσωτερικό του κυττάρου, δεν παρατηρήθηκε καμία χρώση στην κυτταρική μεμβράνη, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι μεμβρανικές θέσεις δέσμησης των ανδρογόνων στα κύτταρα LNCaP είναι διαφορετικές από τους ενδοκυττάριους υποδοχείς, τουλάχιστον ανοσολογικά. Το παραπάνω εύρημα συμφωνεί με μελέτες σχετικές με την ύπαρξη μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης των στεροειδών οι οποίες αναφέρουν ότι οι θέσεις αυτές είναι διαφορετικές από τους κλασσικούς ανδρογονικούς υποδοχείς (Brann et al. 1995; Wehling 1997; Grazzini et al. 1998; Nadal et al. 1998; Nemere and Farach-Carson 1998).

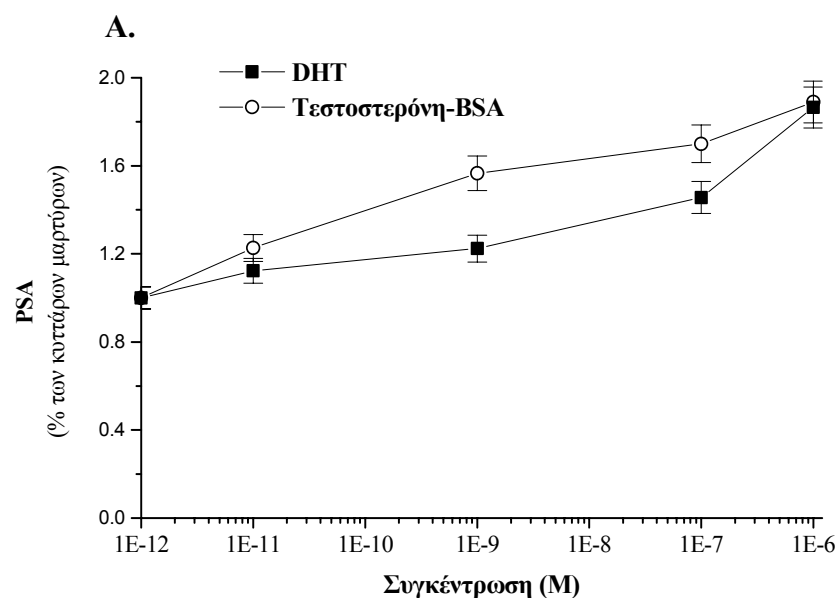


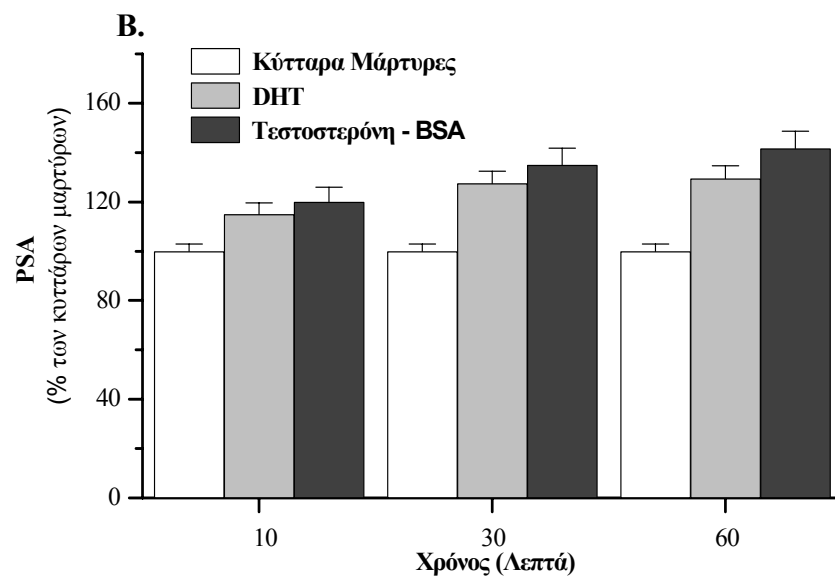
**Σχήμα-41. Ανίχνευση του κλασσικού ενδοκυττάριου ανδρογονικού υποδοχέα με ανοσοϊστοχημεία.** Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες Superfrost Plus μονιμοποιήθηκαν με ακετόνη και επώαστηκαν με αντίσωμα κατά του κλασσικού ανδρογονικού υποδοχέα. Η θέση σύνδεσης του αντισώματος έγινε ορατή με τη χρήση δευτέρου αντισώματος συνδεδεμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση και του συστήματος ανίχνευσης του δευτέρου αντισώματος (Fast Red). Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο σε μεγένθυση x 400.



Ταχεία, μη γενωμική, δράση των ανδρογόνων στην έκκριση του ειδικού προστατικού αντιγόνου από τα κύτταρα LNCaP

Έχοντας ανιχνεύσει την ύπαρξη μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων μελετήθηκε εάν μικρού χρονικού διαστήματος έκθεση των κυττάρων LNCaP στα ανδρογόνα, επηρεάζει την έκκριση του PSA. Τα κύτταρα επώαστηκαν για μικρά χρονικά διαστήματα (10, 30 και 60 λεπτά) με  $10^{-7}$  M DHT και ακολούθησε προσδιορισμός της συγκέντρωσης του PSA στο θρεπτικό καλλιέργειας. Όπως φαίνεται στο σχήμα-42, ακόμη και μόνο 10 λεπτά επώαση των κυττάρων με την DHT είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της εκκρινόμενης ποσότητας του PSA σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες. Αντίστοιχα, επώαση των κυττάρων με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις τεστοστερόνη-BSA, ένα ανάλογο το οποίο δεν μπορεί να διασχίσει την κυτταρική μεμβράνη, είχε ως αποτέλεσμα δοσοεξαρτώμενη επαγωγή της έκκρισης του PSA (σχήμα-41), υποδηλώνοντας μία μεμβρανική δράση των ανδρογόνων. Η δράση αυτή ήταν δοσοεξαρτώμενη (σχήμα-42B).





**Σχήμα-42 Ταχεία επίδραση των ανδρογόνων στην έκκριση του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA). Α. Επίδραση της DHT και της τεστοστερόνης-BSA για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.** Τα κύτταρα επώαστηκαν με  $10^{-7}$  M DHT ή τεστοστερόνη-BSA σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για διαφορετικά χρονικά διαστήματα **Β. Δοσοεξαρτώμενη δράση της DHT και της τεστοστερόνης-BSA για 30 λεπτά.** Τα κύτταρα επώαστηκαν με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις DHT ή τεστοστερόνη-BSA σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για 30 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης του PSA στο θρεπτικό υλικό και αναγωγή της στον αριθμό των κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστά επί των κυττάρων μαρτύρων και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων εις τριπλούν.

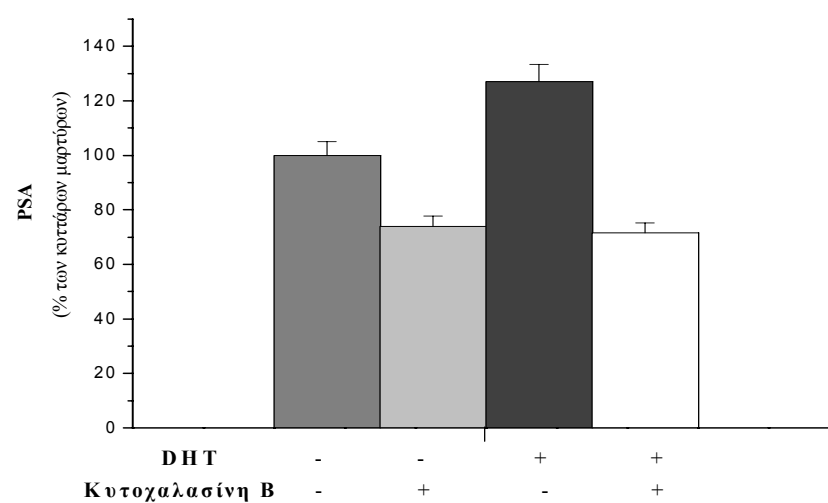
Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια και όταν στη θέση της DHT χρησιμοποιήθηκε τεστοστερόνη συνδεδεμένη με BSA. Η BSA καθιστά ανίκανη την τεστοστερόνη να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι η ταχεία επίδραση των ανδρογόνων στην έκκριση του PSA δεν περιλαμβάνει την είσοδο της DHT μέσα στα κύτταρα και τη σύνδεση της στους ενδοκυττάριους υποδοχείς.

Συμπερασματικά λοιπόν τα ανδρογόνα παρουσιάζουν ταχεία χρονοεξαρτώμενη και δοσοεξαρτώμενη επίδραση στην έκκριση του PSA, υποδεικνύοντας ένα μη γενωμικό τρόπο δράσης ο οποίος δεν προϋποθέτει την είσοδό τους στο εσωτερικό του κυττάρου.

#### Μελέτη της ταχείας επίδρασης των ανδρογόνων στον κυτταροσκελετό των κυττάρων LNCaP

*Επίδραση της κυτοχλασίνης στην ταχέως επαγόμενη έκκριση του ειδικού προστατικού αντιγόνου από τα ανδρογόνα, στα κύτταρα LNCaP*

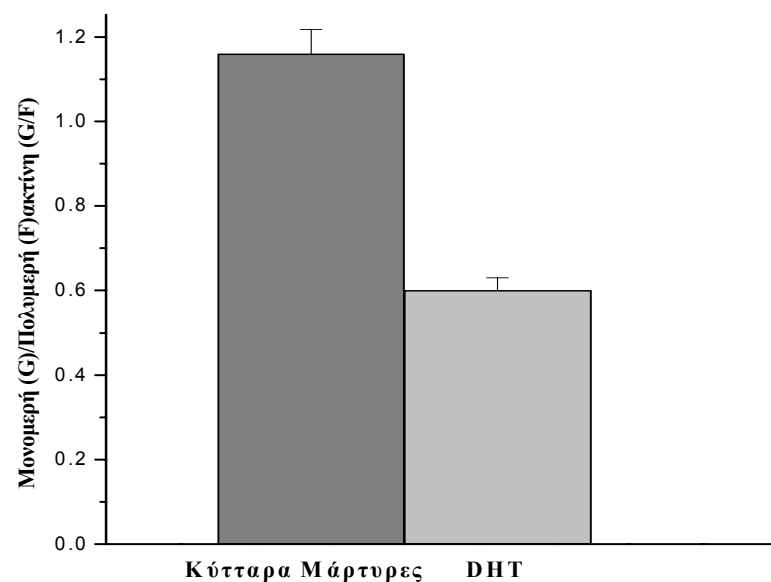
Το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA) είναι μία σερίνη-πρωτεάση και ενδοκυττάρια αποθηκεύεται σε κυστίδια (Bilhartz et al. 1991). Στην έκκριση του συμμετέχει ο κυτταροσκελετός και φυσικά επηρεάζεται από παράγοντες που αλλάζουν το κυτταροσκελετό. Για να ελεγχθεί αν στην μεμβρανική επαγωγή της έκκρισης του PSA από τα ανδρογόνα στα κύτταρα LNCaP, εμπλέκεται ο κυτταροσκελετός χρησιμοποιήθηκε η κυτοχλασίνη B, που προκαλεί εξειδικευμένα αποπολυμερισμό της ινιδιακής ακτίνης και αναστέλλει τη συγκρότηση του μικροϊνιδιακού πλέγματος (MacLean-Fletcher and Pollard 1980). Όπως φαίνεται στο σχήμα-43 προ-επώαση των κυττάρων με  $10^{-6}$  M κυτοχλασίνη B είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση της έκκρισης του PSA από τα κύτταρα μάρτυρες ενώ ανέστειλε πλήρως την επαγωγή της έκκρισης του στα κύτταρα που επώαστηκαν με  $10^{-7}$  M DHT. Η αναστολή αυτή υποδεικνύει εμπλοκή του κυτταροσκελετού της ακτίνης στη μεμβρανική δράση της τεστοστερόνης. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα όταν αντί της DHT χρησιμοποιήθηκε η τεστοστερόνη-BSA.



**Σχήμα-43. Επίδραση της κυτοχλασίνης B στην ταχέως επαγόμενη έκκριση του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) από τα ανδρογόνα στα κύτταρα LNCaP.** Τα κύτταρα προ-επώαστηκαν με κυτοχλασίνη B για 30 λεπτά και στη συνέχεια επώαστηκαν με ή χωρίς  $10^{-7}$  M DHT για άλλα 30 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης του PSA στο θρεπτικό καλλιέργειας και αναγωγή της στον αριθμό των κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστά επί των κυττάρων μαρτύρων και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων εις τριπλούν.

### Επίδραση των ανδρογόνων στη δυναμική ισορροπία μεταξύ μονομερούς και πολυμερούς ακτίνης

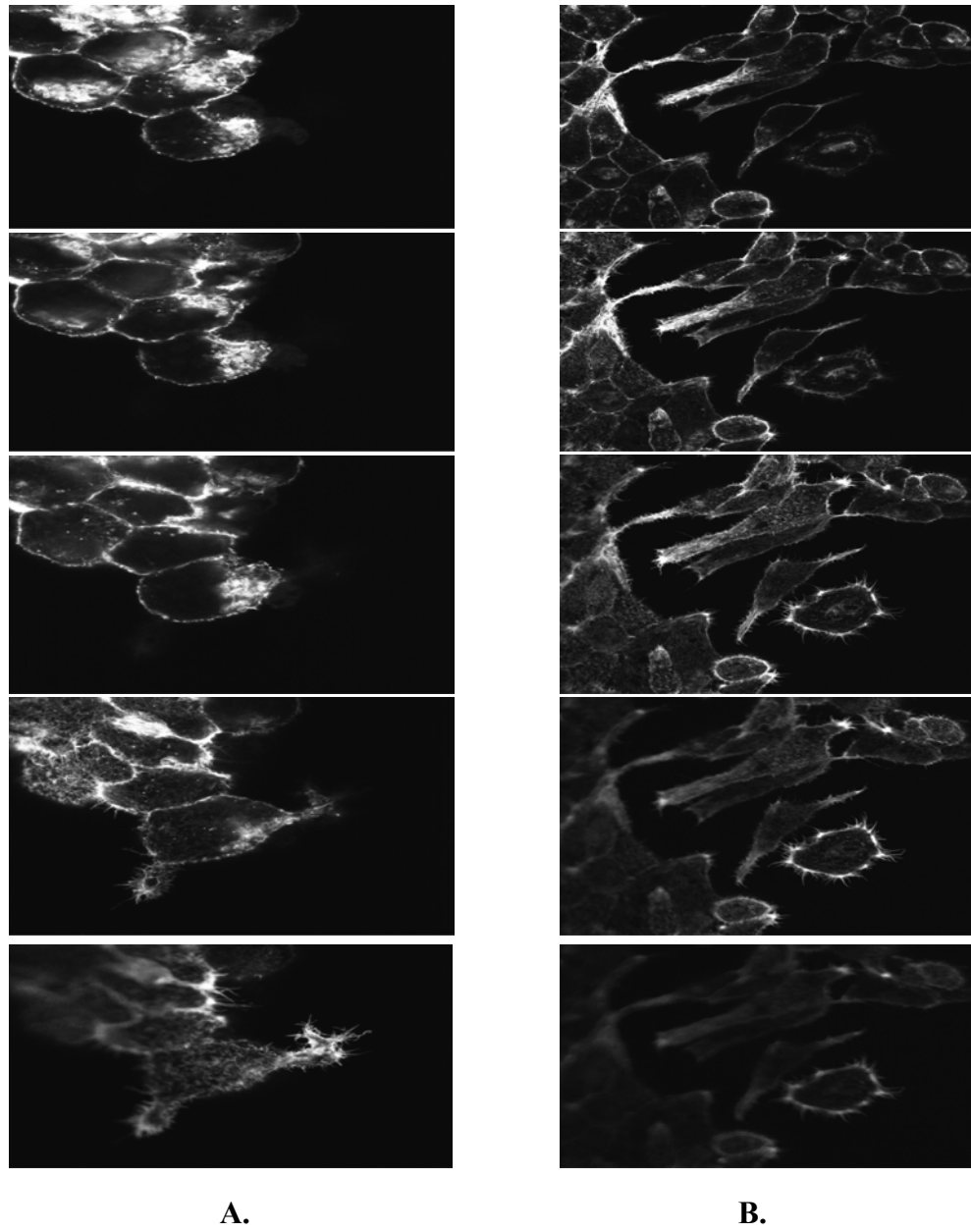
Για την περαιτέρω ανάλυση της αλληλεπίδρασης των μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης της τεστοστερόνης και του κυτταροσκελετού διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση της τεστοστερόνης στη δυναμική ισορροπία ανάμεσα στη μονομερή (G) και πολυμερή (F) ακτίνη. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά με  $10^{-7}$  M DHT και στη συνέχεια έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων της μονομερούς (G) και της πολυμερούς (F) ακτίνης με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης στο διαλυτό στο Triton κλάσμα των κυτταρικών πρωτεϊνών και στο μη διαλυτό αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στο σχήμα-44 ο λόγος της πολυμερούς προς την μονομερή ακτίνη (G/F) μετά από 10 λεπτά επίδραση με DHT ελαττώθηκε σε 0,6 από 1,08 που ήταν στα κύτταρα μάρτυρες. Η μείωση του λόγου G/F της ακτίνης υποδεικνύει αύξηση της πολυμερούς ακτίνης. Η αύξηση αυτή σημαίνει ότι DHT προκαλεί αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετικού πλέγματος της ακτίνης η οποία πιθανώς πραγματοποιείται μέσω των εξειδικευμένων θέσεων πρόσδεσης των ανδρογόνων.



**Σχήμα-44.** Τροποποίηση της μονομερούς (G) και πολυμερούς ακτίνης (F) ακτίνης στα κύτταρα LNCaP μετά από μικρού χρονικού διαστήματος έκθεση σε DHT. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά με  $10^{-7}$  M DHT σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Η διαλυτή και η μη διαλυτή στο Triton ακτίνη προσδιορίστηκε με ανοσοαποτύπωση (Υλικά και Μέθοδοι 12). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο λόγος μονομερούς προς πολυμερή ακτίνη και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα δύο ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν.

*Μορφολογική μελέτη της επίδρασης των ανδρογόνων στην οργάνωση των ινιδίων ακτίνης*

Τα παραπάνω ποσοτικά αποτελέσματα που αφορούν τη ταχεία μεταβολή του πολυμερισμού της ακτίνης στα κύτταρα LNCaP που προκαλείται από τα ανδρογόνα παρατηρήθηκαν και με εφαρμογή μικροσκοπίας συνεστίασης.

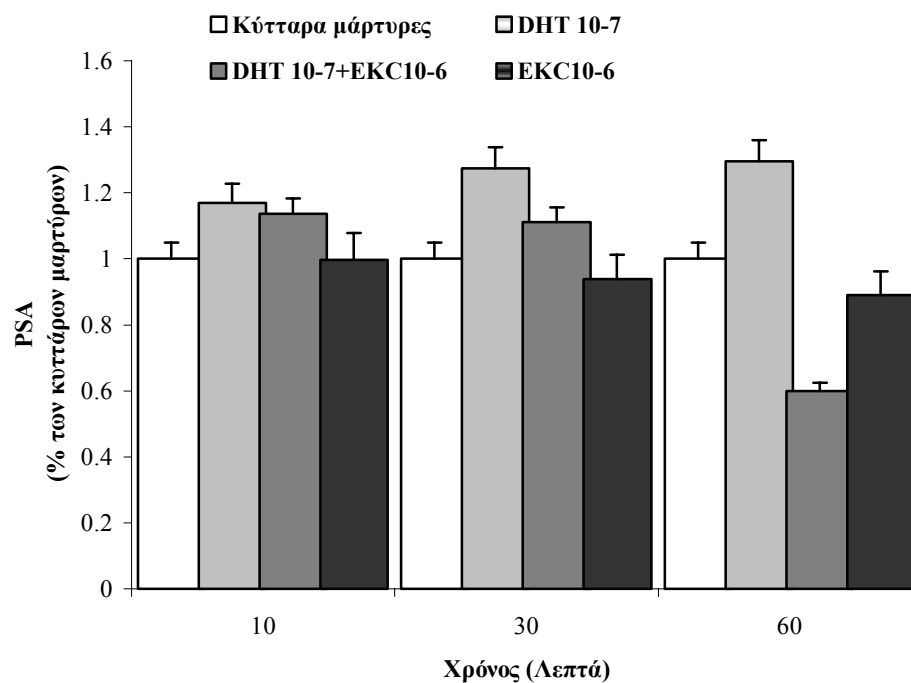


**Σχήμα-45.** Εικόνα των μικροϊνιδίων της ακτίνης των κυττάρων LNCaP με μικροσκοπία συνεστίασης μετά από χρώση ροδαμίνης-φαλοϊδίνης. **A.** Κύτταρα μάρτυρες **B.** Κύτταρα που επώαστηκαν με  $10^{-7}$  M DHT για 10 λεπτά. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες. Στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν και τα μικροϊνίδια της ακτίνης βάφτηκαν με ροδαμίνη-φαλοϊδίνη (Υλικά και Μέθοδοι 11). Παρατηρήθηκαν με μικροσκόπιο συνεστίασης σε μεγέθυνση x100.

Η άμεση δράση των ανδρογόνων στην επαναδιοργάνωση των μικροϊνιδίων της ακτίνης στα κύτταρα LNCaP μελετήθηκε με μικροσκοπία συνεστίασης, μετά από επώαση των κυττάρων με  $10^{-7}$  M DHT για 10 λεπτά και εφαρμογή άμεσου ανοσοφθορισμού με τη χρήση ροδαμίνης-φαλλοϊδίνης. Η μέθοδος επιτρέπει την παρατήρηση μόνο της πολυμερούς ακτίνης γιατί βασίζεται στην ειδική σύνδεση της φαλλοϊδίνης με τα μικροϊνίδια της πολυμερούς ακτίνης (Faulstich et al. 1983) με ταυτόχρονο φθορισμό της ροδαμίνης. Όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί η επίδραση με DHT έχει ως αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση των ινιδίων ακτίνης κάτω από την κυτταρική μεμβράνη. Η παρατήρηση αυτή συμβαδίζει με ταχεία δράση της DHT στην έκκριση του PSA.

#### **Επίδραση των οπιοειδών, στην ταχέως επαγόμενη από τα ανδρογόνα, έκκριση του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) από κύτταρα LNCaP**

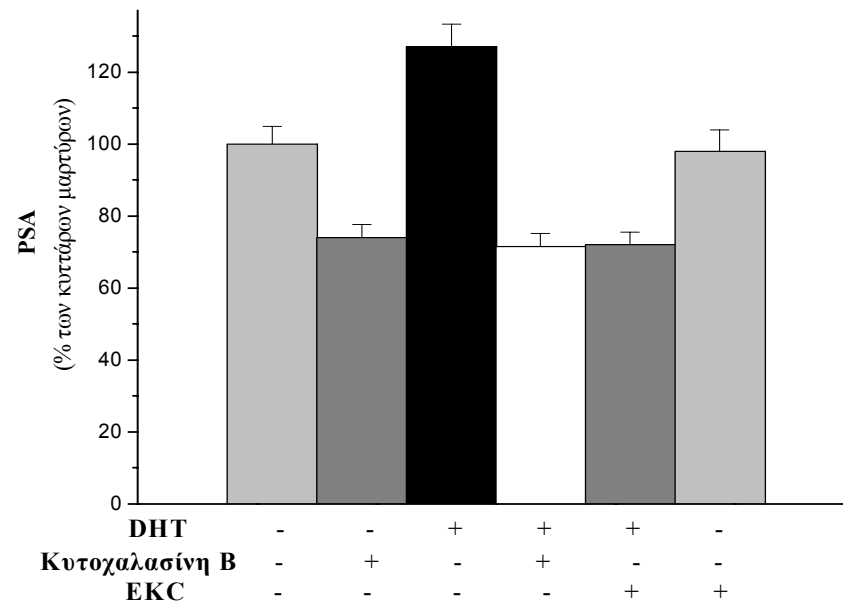
Λαμβάνοντας υπόψιν αποτελέσματα που περιγράφηκαν σε προηγούμενες ενότητες, όπως ότι μετά από επίδραση μικρού χρονικού διαστήματος τα ανδρογόνα επάγουν την έκκριση του PSA από τα κύτταρα LNCaP, καθώς και ότι η EKC ανέστειλε την έκκριση του PSA μετά από επίδραση σε μεγάλους χρόνους (Βλέπε σχήμα 37), κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί πιθανή δράση της και σε μικρά χρονικά διαστήματα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με  $10^{-7}$  M DHT απουσία ή παρουσία  $10^{-6}$  EKC για διάφορα χρονικά διαστήματα (10, 30 και 60 λεπτά). Όπως φαίνεται στο σχήμα-46 η EKC ανέστειλε την επαγόμενη από τα ανδρογόνα έκκριση του PSA. Η μέγιστη αναστολή παρατηρήθηκε στα 60 λεπτά ενώ θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι επώαση των κυττάρων μόνο με EKC δεν επηρέαζε την έκκριση του PSA.



**Σχήμα-46. Ταχεία επίδραση των οπιοειδών στην επαγόμενη από τα ανδρογόνα έκκριση του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA).** Τα κύτταρα επώαστηκαν με  $10^{-7}$  M DHT απουσία ή παρουσία  $10^{-6}$  M EKC σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης του PSA στο θρεπτικό υλικό και αναγωγή της στον αριθμό των κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστά επί των κυττάρων μαρτύρων και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων εις τριπλούν.

#### **Μελέτη της επίδρασης των οπιοειδών στις επαγόμενες από τα ανδρογόνα αλλαγές στον κυτταροσκελετό στα καρκινικά κύτταρα του προστάτου (LNCaP)**

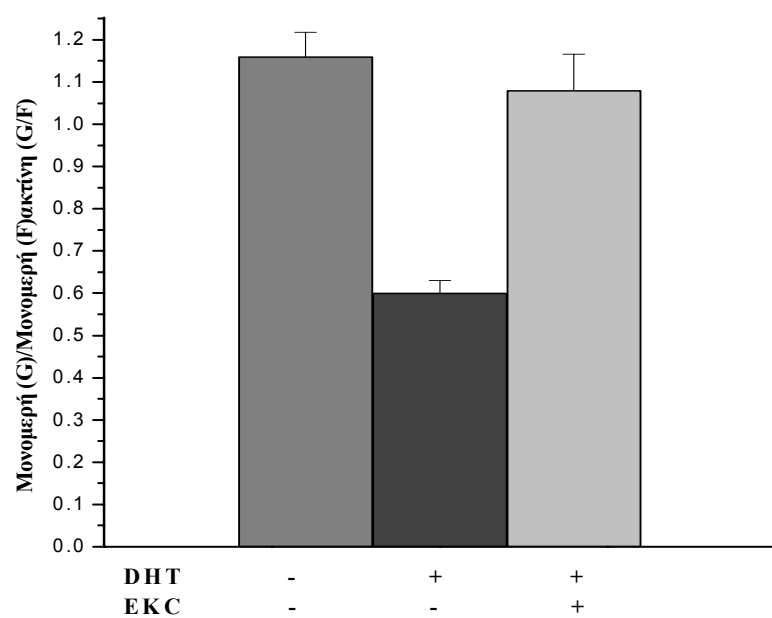
Τα ανωτέρω αποτελέσματα έδειξαν ότι η επαγόμενη από τα ανδρογόνα έκκριση του PSA αναστέλλονταν όταν τα κύτταρα είχαν προεπωαστεί με κυτοχλασίνη η οποία επηρεάζει το μικροϊνιδιακό πλέγμα της ακτίνης υποδηλώνοντας εμπλοκή του κυτταροσκελετού της ακτίνης στη μεμβρανική δράση της τεστοστερόνης. Επώαση των κυττάρων με DHT παρουσία  $10^{-6}$  EKC για 30 λεπτά είχε ως αποτέλεσμα αναστολή της έκκρισης του PSA (σχήμα-47) παρόμοια με την αναστολή που παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα είχαν προεπωαστεί με την κυτοχλασίνη. Άρα, η ανασταλτική δράση της EKC στην έκκριση του PSA πιθανώς οφείλεται στη δράση της στον κυτταροσκελετό.



**Σχήμα-47. Επίδραση της EKC στην ταχέως επαγόμενη έκκριση του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) από τα ανδρογόνα στα κύτταρα LNCaP.** Τα κύτταρα είτε προ-επώστηκαν με κυτοχλασίνη Β για 30 λεπτά και στη συνέχεια επώστηκαν με ή χωρίς  $10^{-7}$  M DHT για άλλα 30 λεπτά είτε επώστηκαν με  $10^{-7}$  M DHT απουσία ή παρουσία  $10^{-6}$  EKC για 30 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης του PSA στο θρεπτικό καλλιέργειας και αναγωγή της στον αριθμό των κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστά επί των κυττάρων μαρτύρων και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων εις τριπλούν.

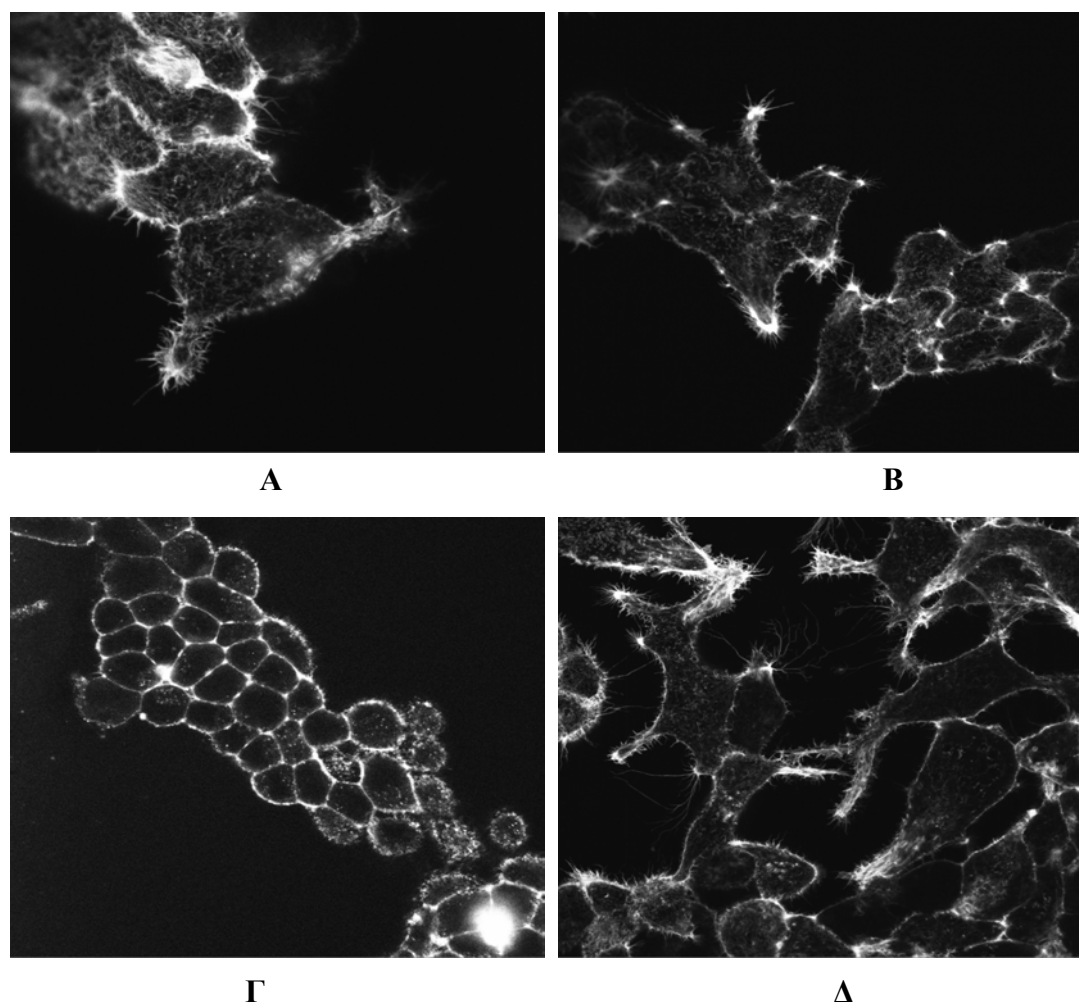
Για την επιβεβαίωση του παραπάνω ευρήματος μελετήθηκε η επίδραση της EKC στον πολυμερισμό της ακτίνης που προκαλείται από τα ανδρογόνα. Ο λόγος της G/F της ακτίνης σε κύτταρα που επώστηκαν με DHT παρουσία EKC επαναφέρονταν στα επίπεδα των κυττάρων μαρτύρων (σχήμα-48).





**Σχήμα-48.** Επαναφορά της μονομερούς (G) και πολυμερούς ακτίνης (F) ακτίνης στα επίπεδα των κυττάρων μαρτύρων μετά από μικρού χρονικού διαστήματος έκθεση σε DHT παρουσία EKC. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά με  $10^{-7}$  M DHT απουσία ή παρουσία  $10^{-6}$  EKC σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Η διαλυτή και η μη διαλυτή στο Triton ακτίνη προσδιορίστηκε με ανοσοαποτύπωση (Υλικά και Μέθοδοι 10). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο λόγος μονομερούς προς πολυμερή ακτίνη και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα δύο ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν.

Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα με μορφολογική παρατήρηση σε μικροσκόπιο συνεστίασης των ινιδίων της ακτίνης μετά από χρώση ροδαμίνης φαλοϊδίνης σε κύτταρα στα οποία είχε γίνει δεκάλεπτη επίδραση με DHT παρουσία EKC (σχήμα-49). Επιπλέον, ο οπιοειδής ανταγωνιστής διπρενορφίνη δεν παρουσίαζε καμμία επίδραση.



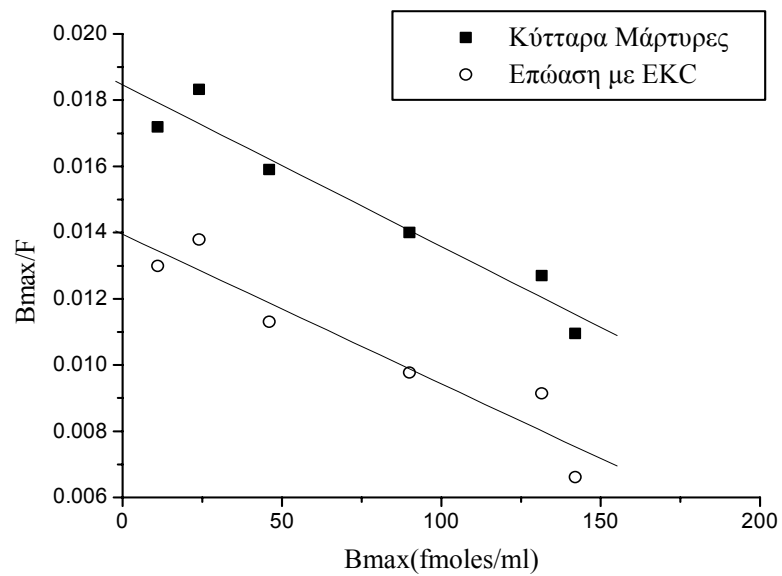
**Σχήμα-49.** Εικόνες των μικροϊνιδίων της ακτίνης των κυττάρων LNCaP με μικροσκοπία συνεστίασης μετά από χρώση ροδαμίνης-φαλοϊδίνης. **A.** Κύτταρα μάρτυρες **B.** Κύτταρα που επωάστηκαν με  $10^{-7}$  M DHT για 10 λεπτά παρουσία  $10^{-6}$  M EKC **Γ.** Κύτταρα που επωάστηκαν με διπρενορφίνη  $10^{-5}$  M **Δ.** Κύτταρα που επωάστηκαν με EKC  $10^{-6}$  M παρουσία διπρενορφίνης  $10^{-5}$  M. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες. Στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν και τα μικροϊνίδια της ακτίνης βάφτηκαν με ροδαμίνη-φαλοϊδίνη (Υλικά και Μέθοδοι 11). Παρατηρήθηκαν με μικροσκόπιο συνεστίασης σε μεγέθυνση x100.

#### **Μελέτη της πιθανής επίδρασης των οπιοειδών στις μεμβρανικές θέσεις σύνδεσης των ανδρογόνων που φέρουν τα κύτταρα LNCaP**

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα η ταχέως επαγόμενη από τα ανδρογόνα έκκριση του PSA πραγματοποιείται μέσω θέσεων που ανιχνεύθηκαν στη μεμβράνη των κυττάρων LNCaP. Η ελάττωσή της του επαγόμενου από τα ανδρογόνα PSA παρουσία EKC αποτελεί ένδειξη για πιθανή αλληλεπίδραση οπιοειδών και ανδρογονικών υποδοχέων.

Κύτταρα LNCaP επωάστηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα (24, 48 και 96 ώρες) με  $10^{-6}$  EKC και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση των μεμβρανών

τους και ανίχνευση των μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης με μελέτες δέσμευσης-κορεσμού. Στα κύτταρα που επώαστηκαν με EKC για 96 ώρες βρέθηκε ότι ο αριθμός των υποδοχέων ήταν μικρότερος ( $85 \pm 5,2$  fmoles/mg πρωτεΐνης) ενώ η χημική συγγένεια παρέμεινε η ίδια (σχήμα-50).



**Σχήμα-50.** Ανίχνευση και μελέτη των φαρμακολογικών ιδιοτήτων των μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων στα κύτταρα LNCaP μετά από επίδραση 96 ωρών με EKC. Μελέτες δέσμευσης κορεσμού. Μεμβρανικά παρασκευάσματα των κυττάρων LNCaP (2 mg/ml) τα οποία προηγουμένως είχαν καλλιεργηθεί για 96 ώρες παρουσία  $10^{-6}$  EKC, επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις [ $^3$ H] τεστοστερόνης (1-50nM) απουσία ή παρουσία 5μM μη ραδιενεργής τεστοστερόνης για τον προσδιορισμό της μη ειδικής δέσμευσης. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε κατά Scatchard

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου του οπιεργικού συστήματος στην ανάπτυξη και τον έλεγχο των νεοπλασματικών όγκων του προστάτου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 3 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτου με διαφορετικό βαθμό διαφοροποίησης έτσι ώστε να αντιπροσωπεύουν τα διάφορα στάδια προστατικού καρκίνου. Η κυτταρική σειρά LNCaP είναι αυτή με το μέγιστο βαθμό διαφοροποίησης (Horoszewicz et al. 1983), εκφράζει ενεργούς ανδρογονικούς υποδοχείς και ανταποκρίνεται στη δράση των ανδρογόνων. Αντιπροσωπεύει έτσι ένα πρώιμο στάδιο προστατικού καρκίνου, όπου τα καρκινικά κύτταρα ανταποκρίνονται στη θεραπεία στέρησης των ανδρογόνων. Η κυτταρική σειρά PC3, φέρει ανδρογονικούς υποδοχείς οι οποίοι όμως, λόγω μετάλλαξης, δεν είναι λειτουργικοί (Yuan et al. 1993) με αποτέλεσμα τα κύτταρα να μην ανταποκρίνονται στα ανδρογόνα και τέλος η κυτταρική σειρά DU-145 η οποία δεν φέρει ανδρογονικούς υποδοχείς (Tilley et al. 1990). Οι δύο αυτές ορμονοάντοχες κυτταρικές σειρές αντιπροσωπεύουν προχωρημένα στάδια της νόσου, όπου τα κύτταρα δεν ανταποκρίνονται στην ορμονοθεραπεία.

#### Επίδραση των οπιοειδών στο ρυθμό πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων προστάτου

Είναι γνωστό ότι τα οπιοειδή επηρεάζουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού διαφόρων κυττάρων. Η δράση τους στις περισσότερες περιπτώσεις είναι κατασταλτική όπως στα φυσιολογικά κύτταρα γλοίας ποντικού (Stiene-Martin and Hauser 1990; Stiene-Martin et al. 1991), εμβρυικών κυττάρων γλοίας (Zagon and McLaughlin 1991) εμβρυικών κυττάρων αμφιβληστροειδούς (Isayama and Zagon 1991) καθώς και πολλών νεοπλασματικών κυττάρων. Έτσι, κατασταλτική δράση των οπιοειδών έχει παρατηρηθεί σε κύτταρα S20Y νευροβλαστώματος ποντικού (Zagon and McLaughlin 1989) ανθρώπινα KF κύτταρα ωοθηκών (Kikuchi et al. 1987; Kikuchi et al. 1989) ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού (Hatzoglou et al. 1996) κύτταρα φαιοχρωμοκυτώματος ποντικού (Venihaki et al. 1996), καρκινικά κύτταρα πνεύμονα (Maneckjee et al. 1990; Maneckjee and Minna 1990; Maneckjee and Minna 1992), ενδομητρίου (Hatzoglou et al. 1995) και νεφρών (Hatzoglou et al. 1996). Όσον αφορά τον προστάτη ο οπιοειδής αγωνιστής βρεμαζοσίνη έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη του μετασχευόμενου όγκου Dunning R3327H (Reubi 1985).

Όπως είναι γνωστό, να για τεκμηριωθεί οπιοειδής δράση η οποία πραγματοποιείται μέσω ειδικών υποδοχέων τρία κριτήρια πρέπει να εκπληρώνονται: Πρώτον η δράση τους να είναι δόσοεξαρτώμενη, δεύτερον να είναι αναστρέψιμη παρουσία ειδικού ανταγωνιστή και τρίτον να μπορούν να ανιχνευθούν ειδικοί υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη.

Στη μελέτη μας ερευνήθηκε η πιθανή επίδραση των οπιοειδών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων προστάτου. Χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικοί οπιοειδείς αγωνιστές οι οποίοι καλύπτουν το σύνολο των διαφορετικών υποτύπων των οπιοειδών υποδοχέων μέσω των οποίων πραγματοποιείται κυρίως η δράση τους (βλέπε Υλικά-Μέθοδοι 4A). Συνολικά, η δράση των οπιοειδών ήταν διαφορετική σε κάθε κυτταρική σειρά σε σχέση με τη ύπαρξη και τη χημική συγγένεια τους για τις θέσεις σύνδεσης τους. Παρόλα αυτά και στις τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις, παρατηρήθηκε δράση σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Πιο συγκεκριμένα, στις κυτταρικές σειρές DU-145 και LNCaP η δράση όλων των οπιοειδών που μελετήθηκε ήταν κατασταλτική, με την EKC να παρουσιάζει το μέγιστο ποσοστό καταστολής 76% και 72% αντίστοιχα (Σχήματα-10,12). Στην κυτταρική σειρά PC3 (σχήμα-11) το ανάλογο της Leu<sup>5</sup>-ενκεφαλίνης DSLET δεν είχε καμία δράση ενώ το μέγιστο ποσοστό καταστολής παρουσίαζε η ετορφίνη με 44% και IC<sub>50</sub> 0,034 nM (Πίνακας III).

Όπως προαναφέρθηκε, ένας τρόπος τεκμηρίωσης της οπιοειδούς δράσεως είναι η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρουσία περίσσειας ανταγωνιστών. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο γενικός οπιοειδής ανταγωνιστής διπρενορφίνη. Στη περίπτωση των τριών καρκινικών κυτταρικών σειρών του προστάτου η διπρενορφίνη είχε δύο διαφορετικά αποτελέσματα. Σε κάποιες περιπτώσεις όπως σε αυτή των κυττάρων DU-145 και PC3 ανέστειλε τη δράση των οπιοειδών άλλοτε σχεδόν πλήρως άλλοτε μερικώς που σημαίνει ότι η δράση τους πραγματοποιείται μέσω ειδικών θέσεων δέσμευσης, ενώ στην κυτταρική σειρά LNCaP είτε δεν επηρέαζε καθόλου τη δράση τους, είτε όπως στις περισσότερες περιπτώσεις, την ενίσχυε (Βλέπε σχήμα-12). Η τελευταία δράση της διπρενορφίνης υποδηλώνει ότι η δράση τους πιθανώς πραγματοποιείται μέσω άλλων υποδοχέων από αυτούς των οπιοειδών όπου αγωνιστές και ανταγωνιστές μπορούν να δεσμευτούν. Πράγματι σε καρκινικά κύτταρα μαστού και νεφρών έχει βρεθεί η δράση των οπιοειδών και πιο συγκεκριμένα της μορφίνης, μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω υποδοχέων σωματοστατίνης (Hatzoglou et al. 1995a; Hatzoglou et al. 1996b). Τέλος,

υπάρχουν αναφορές ότι οι οπιοειδείς ανταγωνιστές μπορεί να έχουν από μόνοι τους κατασταλτική δράση στον ρυθμό πολλαπλασιασμού όγκων ή καρκινικών κυττάρων (Aylsworth et al. 1979; Zagon and McLaughlin 1981; Zagon and McLaughlin 1983; Kikuchi et al. 1987b).

Όσον αφορά τώρα, την ύπαρξη οπιοειδών υποδοχέων στις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, στις περισσότερες περιπτώσεις ανιχνεύθηκαν οπιοειδείς υποδοχείς (πίνακας III) η χημική συγγένεια των οποίων είναι συγκρίσιμη με τις συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τα οπιοειδή. Πιο συγκεκριμένα, στη κυτταρική σειρά DU-145 ανιχνεύθηκαν  $\mu$ ,  $\kappa_1$  και  $\kappa_3$  οπιοειδείς υποδοχείς ενώ δεν ανιχνεύθηκαν  $\delta$  και  $\kappa_2$ . Τα αποτελέσματα αυτά εξηγούν την κατασταλτική, κατά δόσοεξαρτώμενο και αναστρέψιμο τρόπο, δράση των οπιοειδών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους, εκτός από τη περίπτωση του DSLET το οποίο έχει δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ δεν ανιχνεύθηκαν  $\delta$  οπιοειδείς υποδοχείς. Στην κυτταρική σειρά PC3 ανιχνεύθηκαν υποδοχείς  $\mu$  και  $\kappa_1$  εξηγώντας επίσης την αναστρέψιμη δράση των οπιοειδών ενώ το DSLET σε αυτήν την περίπτωση δεν παρουσίαζε καμμία δράση. Τέλος στα κύτταρα LNCaP δεν ανιχνεύθηκαν οπιοειδείς υποδοχείς γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τη δράση των οπιοειδών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό παρουσία διπρενορφίνης, η οποία είτε δεν ανέστειλλε την δράση τους είτε την ενίσχυε.

Σημαντικό επίσης εύρημα, ήταν το γεγονός ότι για να γίνει η ανίχνευση των υποδοχέων (πίνακας VI) χρειάστηκε να πραγματοποιηθεί οξινοποίηση των κυττάρων, διαδικασία η οποία απομακρύνει ενδογενώς παραγόμενους αγωνιστές επιτρέποντας την ανίχνευση του συνολικού αριθμού των υποδοχέων, και υποδηλώνοντας πιθανή αυτόλογη έκκριση οπιοειδών από τα καρκινικά κύτταρα. Εν όψει όμως της γνωστής αποπτωτικής δράσεως των οπιοειδών και της ανιχνεύσεως της ρεσεπτορφίνης, όπως θα αναλυθεί κατωτέρω, η οξινοποίηση πιθανώς απομακρύνει την τελευταία από τους οπιοειδείς υποδοχείς της κυτταρικής επιφανείας.

Τα τελευταία χρόνια εκτός από τα αλκαλοειδή οπιοειδή υπάρχουν αναφορές ότι πεπτίδια προερχόμενα από τις  $\alpha$  (Loukas et al. 1983; Zioudrou et al. 1979) και  $\beta$  (Teschemacher et al. 1997; Teschemacher and Coch 1991) καζεΐνες του αγελαδινού γάλακτος καθώς και την ανθρώπινη  $\beta$  καζεΐνη (Brantl 1984) αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Hatzoglou et al. 1996a; Hatzoglou et al. 1996). Στον προστάτη μελετήθηκε η δράση της  $\alpha$  καζεΐνης 90-95, της  $\alpha$  καζεΐνης 90-96, της  $\beta$  καζομορφίνης και της  $\beta$  καζομορφίνης 1-5. Η δράση τους ήταν διαφορετική μεταξύ

των τριών κυτταρικών σειρών και στην πλειοψηφία τους ανέστειλαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Στη κυτταρική σειρά DU-145 (Σχήμα-14) τη μέγιστη δράση παρουσίασε η β-καζομορφίνη, η δράση της οποίας σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από  $10^{-6}$  αναστελλόταν πλήρως παρουσία διπρενορφίνης. Στα κύτταρα LNCaP και PC3 τη μέγιστη δράση παρουσίασε η α καζεΐνη 90-95 με ποσοστά 59% και 47% αντίστοιχα (Σχήματα-15,16, Πίνακας IV). Συγκριτικά, η δράση των καζομορφινών στην κυτταρική σειρά PC3 ήταν η μικρότερη, αφού κάποιες από αυτές δεν είχαν καμία δράση, για παράδειγμα η α καζεΐνη 90-96. Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με το είδος των υποτύπων των οπιοειδών υποδοχέων που ανιχνεύθηκαν σε κάθε κυτταρική σειρά και τους υποδοχείς στους οποίους έχει βρεθεί ότι δεσμεύονται οι καζομορφίνες (Hatzoglou et al. 1996a; Hatzoglou et al. 1996c).

Τα τελευταία χρόνια, μετά την ανακάλυψη της σημαντικής οπιοειδούς δράσεως που παρουσιάζουν οι καζομορφίνες έχει γίνει προσπάθεια σύνθεσης διαφόρων αναλόγων τους έτσι ώστε να μην είναι επιρρεπή σε ενζυματική διάσπαση και παράλληλα να ενισχυθεί και η δράση τους. Έτσι, μελετήθηκε και η δράση τριών αναλόγων της β καζομορφίνης 1-5 στην αλληλουχία της οποίας (Tyr-Pro-Phe-Pro gly) έχει προστεθεί μία πλευρική ομάδα στη θέση 2 ή 3. Αποτέλεσμα της προσθήκης ήταν και τα τρία ανάλογα να παρουσιάζουν αυξημένη σταθερότητα στο πλάσμα ενώ όσον αφορά την οπιοειδή δράση τους η β καζομορφίνη 1-5 [Pro2Ψ (CH<sub>2</sub>-NH)] έχει δράση ανταγωνιστή με την β καζομορφίνη 1-5 [Phe3Ψ (CH<sub>2</sub>-NH)] και τη β καζομορφίνη 1-5 [Pro2Ψ (CHOH-CH<sub>2</sub>-NH)] να παραμένουν αγωνιστές όπως και η β καζομορφίνη 1-5. Σχετικά με την ικανότητα δέσμευσής τους στους οπιοειδείς υποδοχείς μελέτες αναφέρουν ότι η προσθήκη είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της δέσμευσής τους, στους μι οπιοειδείς υποδοχείς (Delaet et al. 1992). Στον προστάτη η δράση των τριών αναλόγων μελετήθηκε στην κυτταρική σειρά DU-145 η οποία φέρει και τους περισσότερους οπιοειδείς υποδοχείς. Βρέθηκε ότι σε αντίθεση με τις προηγούμενες μελέτες, η παρουσία της πλευρικής ομάδας, ελάττωσε την ικανότητα δέσμευσής τους στους μι οπιοειδείς υποδοχείς, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις ενίσχυσε την δέσμευσή τους στους κάππα υποδοχείς (Σχήμα-19). Η δράση των δύο αναλόγων-αγωνιστών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό παρέμεινε ανασταλτική κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο και ήταν πιο έντονη από αυτή της β καζομορφίνης 1-5 κατά ένα εκατομμύριο φορές τουλάχιστον, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στην αύξηση της συγγένειας με την οποία δεσμεύονται στους κάππα υποδοχείς (Πίνακας-IX).



Συγκρίνοντας τη δράση των καζομορφινών με αυτή των αλκαλοειδών οπιοειδών είναι φανερό ότι η δράση τους είναι λιγότερη έντονη, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε πιθανή διάσπαση των πεπτιδίων στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας, στο ότι ενδογενή οπιοειδή ή η ρεσεπτορφίνη σκεπάζουν τις θέσεις δέσμευσής τους ενώ θα μπορούσε επίσης να οφείλεται και στη χαμηλή συγγένεια δέσμευσής τους, κάτι το οποίο δεν ισχύει, δεδομένου ότι η δράση τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό πραγματοποιείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

#### Προέλευση των οπιοειδών στον προστάτη

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα ο καρκίνος του προστάτου ιστολογικά είναι πολύ πιο συχνός, αλλά μόλις το 1-2 % αυτών θα εξελιχθούν σε κλινική νόσο (Carter et al. 1990a; Carter and Coffey 1990b; Boring et al. 1991). Εξήγηση του φαινομένου αυτού δεν είναι δυνατή ακόμη ούτε και σήμερα. Πιθανολογείται βέβαια, και είναι η πιο αποδεκτή εξήγηση, ότι οφείλεται στο γεγονός πως παράγοντες που υπάρχουν στον προστάτη επηρεάζουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Carter et al. 1990c) όπως για παράδειγμα η παρουσία διαφόρων νευροπεπτιδίων (Gkonos et al. 1995; Noordzij et al. 1995). Τα νευροπεπτίδια πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον λειτουργικό έλεγχο του μικροπεριβάλλοντος του φυσιολογικού προστατικού ιστού. Για παράδειγμα, νευροπεπτίδια στις νευρικές απολήξεις επηρεάζουν την σύνθεση και την έκκριση των εκκριτικών προϊόντων του προστάτου ενώ επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των κυττάρων του. Μία πληθώρα νευροπεπτιδίων έχουν ανιχνευθεί στον προστάτη όπως η σωματοστατίνη, το νευροπεπτίδιο Y (Juaranz et al. 2001), το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο, η πρωτεΐνη σχετιζόμενη με την παραθυροειδική ορμόνη, ο εκλυτικός παράγοντας της γαστρίνης και η ουσία P (Gu et al. 1983; Gkonos et al. 1995). Σημαντική πηγή νευροπεπτιδίων στον προστάτη αποτελούν τα νευροενδοκρινή κύτταρα, ο ρόλος των οποίων δεν είναι ξεκάθαρος. Παρ'ολ'αυτά, υπάρχουν στοιχεία ότι επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Gkonos et al. 1995). Ο πληθυσμός των νευροενδοκρινικών κυττάρων στο φυσιολογικό προστάτη είναι πάρα πολύ μικρός, υπάρχουν όμως και στον εμβρυικό προστάτη και μάλιστα από την 13η εβδομάδα κύησης. Η εμφάνισή τους πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι σχετίζονται με την ωρίμανση του προστατικού αδένου και λειτουργούν παρακρινικά στην εκκριτική διαφοροποίηση των εξωκρινών επιθηλιακών κυττάρων του προστάτου (Xue et al. 2000). Ο αριθμός τους αυξάνει στο

προστατικό καρκίνωμα και σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου σε ορμονοαντοχή (Cox et al. 1999).

Για τα οπιοειδή ειδικότερα, τα στοιχεία που υπάρχουν είναι κάπως αντιφατικά. Σε τομές ανθρώπινου προστάτη δεν παρατηρήθηκε ανοσοδραστικότητα για την εγκεφαλίνη (Gu et al. 1983). Οι Krieger και οι συνεργάτες ανίχνευσαν β ενδορφίνη και άλλα πεπτίδια προερχόμενα από το γονίδιο POMC, στον προστάτη τρωκτικών (Krieger 1984), ενώ σε ανθρώπινο ενήλικο προστάτη έχουν ανιχνευθεί νευρικές ίνες που περιέχουν Leu-εγκεφαλίνη (Tainio 1995) και σε εμβρυικό ανθρώπινο προστάτη οι Jen και Dixon (Jen and Dixon 1995) έδειξαν με ανοσοϊστοχημεία την ύπαρξη ειδικών νευρικών ινών της Met και Leu εγκεφαλίνης οι οποίες σχετίζονται με τις λείες μυικές ίνες. Επίσης, νευροπεπτίδια συμπεριλαμβανομένου και αυτών της Met και της Leu-εγκεφαλίνης έχουν ανιχνευθεί σε αυτόνομα γάγγλια τα οποία υπάρχουν στον προστάτη. Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι πεπτιδεργικοί νευρώνες πιθανώς να ελέγχουν την αύξηση του όγκου επηρεάζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Gkonos et al. 1995).

Εκτός από τα οπιοειδή πεπτίδια που είναι διαθέσιμα στον προστάτη και παράγονται τοπικά, υπάρχει η δυνατότητα αυτά να φτάνουν στον προστάτη και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Αυτή η περίπτωση όμως αφορά μόνο την β ενδορφίνη η οποία παράγεται κυρίως από την υπόφυση και το ανοσολογικό σύστημα αφού είναι το μόνο ενδογενές πεπτίδιο με ικανοποιητικά μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής (Scholar et al. 1987).

Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι εκτός από τα κλασσικά οπιοειδή, οπιοειδή δράση μπορούν να παρουσιάσουν και πεπτίδια προερχόμενα από τις τροφές (εξορφίνες), την αιμοσφαιρίνη ή τις καζεΐνες του γάλακτος. Πράγματι, έχει βρεθεί ότι οι καζομορφίνες, οι οποίες μπορούν να διασχίσουν τον εντερικό φραγμό και έχουν ανιχνευθεί στο αίμα μετά από κατανάλωση γάλακτος (Tome et al. 1987; Mahe et al. 1989; Nyberg et al. 1989), αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων μαστού (Hatzoglou et al. 1996a; Hatzoglou et al. 1996b; Hatzoglou et al. 1996c) και με την παρούσα μελέτη και των καρκινικών κυττάρων προστάτου. Μελετήθηκαν καζομορφίνες που προερχόταν από τις α και β καζεΐνες του γάλακτος των βοοειδών καθώς και συνθετικά ανάλογά τους. Τα αποτελέσματά μας πράγματι δείχνουν ότι τα πεπτίδια αυτά αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (σχήματα-14,15), κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο, υποδηλώνοντας μια πιθανή δράση

της διατροφής στην καρκινική νόσο. Πράγματι, επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η διατροφή επηρεάζει την δημιουργία και εξέλιξη του καρκίνου του προστάτου. Η μέχρι τώρα γνώση αναφορικά με τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα θεωρεί ως υποβοηθητικούς παράγοντες της δημιουργίας καρκίνου. Αυτό έχει κυρίως συσχετισθεί με το λίπος των γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα ευρήματα της παρούσης μελέτης όμως δείχνουν ότι εκτός από την επιβαρυντική δράση του λίπους, πεπτίδια προερχόμενα από τις καζεΐνες του γάλακτος παρουσιάζουν προστατευτικές δράσεις, επανατοποθετώντας τα γαλακτοκομικά προϊόντα σαν προστατευτικά για την εξέλιξη του Ca προστάτου, σαν την τομάτα (Agarwal and Rao 2000; Kotake-Nara et al. 2001) και το κόκκινο κρασί (Kampa et al. 2000).

Σημαντικό όμως μέρος των καζεϊνών αποτελούν και οι  $\alpha_s$  καζεΐνες. Κρίθηκε λοιπόν σκόπιμο η μελέτη της δράσης ενός πενταπεπτιδίου (Tyr-Val -Pro -Phe -Pro) που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της  $\alpha_{s1}$  καζεΐνης του ανθρωπίνου γάλακτος. Η αλληλουχία του, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Έχει αρκετές ομοιότητες με αυτήν των ενδογενών οπιοειδών πεπτιδίων έχοντας τυροσίνη στη θέση 1 και φαινυλαλανίνη στη θέση 4 ενώ παρουσιάζει ομολογία με την αλληλουχία άλλων καζομορφινών όπως της μορφισεπτίνης (Tyr-Pro-Phe-Pro). Επιπρόσθετα, στο καρβοξυτελικό άκρο του, το πενταπεπτίδιο συνδέεται με το αμινοξύ προλίνη (Pro) και με τη γλουταμίνη (Gln) στο αμινοτελικό (Gln-Tyr-Pro-Phe-Pro-Pro). Οι δεσμοί Pro-Pro και Gln-Tyr αποτελούν πιθανές θέσεις δράσης ενδοπεπτιδίων όπως οι προπυλ-ενδοπεπτιδάσες οι οποίες διασπούν τους δεσμούς Pro-XAA (Loh et al. 1984; Bond and Butler 1987) και άλλες ενδοπεπτιδάσες οι οποίες είναι λιγότερο ειδικές. Με τη δράση αυτών των ενδοπεπτιδίων είναι πιθανή η απελευθέρωση του πενταπεπτιδίου.

Αρχικά λοιπόν, για να μελετηθεί η δράση του σε καρκινικά κύτταρα χρειαζόμασταν ένα κυτταρικό μοντέλο στο οποίο να είναι γνωστό ότι ανταποκρίνεται στα οπιοειδή και ότι φέρει οπιοειδείς υποδοχείς μέσω των οποίων πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο η δράση τους. Έτσι χρησιμοποιήθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού T47D. Τα κύτταρα φέρουν οπιοειδείς υποδοχείς ( $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$ ,  $\kappa_3$  και  $\delta$ ) ενώ τα οπιοειδή παρουσιάζουν κατασταλτική δράση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού τους (Hatzoglou et al. 1996a; Hatzoglou et al. 1996b; Hatzoglou et al. 1996c). Το πενταπεπτίδιο αυτό που ονομάστηκε  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη, σύμφωνα με τη μελέτη μας, παρουσιάζει εξαιρετικά ισχυρή δράση: (1) Βρέθηκε ότι αναστέλλει τη δέσμευση διαφόρων οπιοειδών αγωνιστών (Σχήμα-24) αλληλεπιδρώντας με υψηλή συγγένεια και με τους τρεις υπότυπους των κάππα οπιοειδών υποδοχέων ( $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$  και  $\kappa_3$ ) (πίνακας

X), ενώ παρουσιάζει σημαντική, αλλά με χαμηλότερη συγγένεια δέσμευση στους δέλτα και μι υποδοχείς σε μεμβρανικά παρασκευάσματα εγκεφάλου επίμυος, (2) Αντικατάσταση του καρβοξυτελικού της άκρου με αμινομάδα επηρεάζει σημαντικά τη συγγένεια της για τους οπιοειδείς υποδοχείς. Πράγματι το αμίδιο της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης δεν αλληλεπιδρά με τους  $\kappa_1$  και τους  $\kappa_2$  ενώ ενισχύεται η δέσμευση της στους  $\kappa_3$  και δεσμεύεται στους  $\delta$  οπιοειδείς υποδοχείς (πίνακας X). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η χαμηλότερη συγγένεια δέσμευσης της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης και του αμιδίου της στους υποδοχείς  $\mu$  και  $\delta$  στις μεμβράνες εγκεφάλου σε σχέση με τα κύτταρα T47D. Πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι α) το ότι τα πειράματα δέσμευσης με τα μεμβρανικά παρασκευάσματα πραγματοποιούνται σε υποτονικό διάλυμα, ενώ τα πειράματα στα ολόκληρα κύτταρα T47D σε ισοτονικό και είναι γνωστό ότι η ιοντική ισχύς επηρεάζει την δέσμευση των οπιοειδών (Castanas et al. 1985; Bourhim et al. 1993) και β) το ότι η  $\alpha_s$  καζομορφίνη προέρχεται από την ανθρώπινη  $\alpha_s$  καζεΐνη η οποία ελέγχεται σε ομόλογο σύστημα (τα κύτταρα T47D) και σε ένα ετερόλογο (μεμβρανική εγκεφαλική επίμυος). Έτσι είναι πιθανόν η συγγένεια ενός ανθρώπινου πεπτιδίου για το ομόλογό του σύστημα να ενισχύεται σε σχέση με ένα ετερόλογο σύστημα. Συγκρίνοντας τις τιμές των  $IC_{50s}$  για την αναστολή της δέσμευσης της ραδιοσημασμένης EKC, της διπρενορφίνης και του DPDPE με αυτές άλλων καζομορφινών οι οποίες προέρχονται από την καζεΐνη βοός, στα ίδια κύτταρα (Hatzoglou et al. 1996a; Hatzoglou et al. 1996c) προκύπτει ότι η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη και το αμίδιο της παρουσιάζουν πολύ μεγαλύτερη χημική συγγένεια. Πιο συγκεκριμένα, η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη είναι είκοσι φορές πιο δραστική στο να αναστέλλει τη δέσμευση της EKC από τη  $\beta$ -καζομορφίνη βοός ( $IC_{50}$  0,1 και 2,42 nM αντίστοιχα) και δέκα φορές από την  $\beta$  καζομορφίνη 1-5. Επιπλέον, το αμίδιο της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης είναι τουλάχιστον εικοσιπέντε φορές πιο δραστικό από την  $\beta$  καζομορφίνη βοός αναστέλλοντας τη δέσμευση της διπρενορφίνης ( $IC_{50}$  0,2 και 4,9 nM αντίστοιχα) και περίπου το ίδιο δραστικό με την  $\alpha$  καζεΐνη 90-96 όσον αφορά τη δέσμευση τους στους  $\delta$  οπιοειδείς υποδοχείς. Άρα η συγγένεια της  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης είναι τουλάχιστον 100 φορές μεγαλύτερη από αυτή που έχει αναφερθεί σε άλλες μελέτες για πεπτίδια προερχόμενα από την  $\alpha$  και  $\beta$  καζομορφίνη (Brantl et al. 1979; Lottspeich et al. 1980; Chang et al. 1981; Loukas et al. 1983), (3) Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν μελετώντας τη δράση τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μετά από έξι ημέρες επίδρασης, η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη ανέστειλε σχεδόν πλήρως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η αντικατάσταση του καρβοξυλικού άκρου με την αμινομάδα είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού μέγιστης

καταστολής σε 55%, ποσοστό το οποίο είναι συγκρίσιμο με αυτό των  $\alpha$  και  $\beta$  καζομορφινών στην ίδια κυτταρική σειρά (Hatzoglou et al. 1996a; Hatzoglou et al. 1996c).

Γνωρίζοντας λοιπόν, ότι η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη είναι ένα πολύ δραστικό οπιοειδές πεπτίδιο μελετήθηκε η δράση του σε καρκινικά κύτταρα προστάτου. Και στις τρεις καρκινικές σειρές του προστάτου η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη και το αμίδιο της ελάττωναν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Στις κυτταρικές σειρές DU-145 και PC3 η δράση τους επηρεαζόταν από τον γενικό ανταγωνιστή διπρενορφίνη ενώ στην σειρά LNCaP η παρουσία του ανταγωνιστή ενίσχυε την δράση της  $\alpha_{s1}$ -καζομορφίνης και του αμιδίου της. Συγκριτικά η μέγιστη δράση με υψηλή χημική συγγένεια, παρατηρήθηκε στη κυτταρική σειρά DU-145 (Σχήμα-30). Συμπερασματικά λοιπόν, η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη αποτελεί το πιο δραστικό πεπτίδιο που μελετήθηκε έως τώρα συγκρίνοντας το με ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια.

Πρόσφατα βρέθηκε ότι χημική συγγένεια για τους οπιοειδείς υποδοχείς παρουσιάζει ένας αριθμός συνθετικών πεπτιδίων τα οποία δημιουργήθηκαν μετά από έρευνα βιβλιοθηκών με πεπτίδια (Becker et al. 1999; Balboni et al. 2000). Μελετώντας την αλληλουχία των αμινοξέων του οπιοειδούς υποδοχέα, βρέθηκε μια αλληλουχία 5 αμινοξέων (Tyr-Ile-Phe-Asn-Leu) στο κοινό διαμεμβρανικό τμήμα των διαφορετικών υποτύπων (Πίνακας XIII).

**ΠΙΝΑΚΑΣ XIII.** Αλληλουχία του δεύτερου διαμεμβρανικού τμήματος σε διάφορους οπιοειδείς υποδοχείς.

Αλληλουχία	Υποδοχέας
ni <b>yifnl</b> aladalatstl	Μι(ανθρώπου)
i <b>yifnl</b> aladalvtttmpfqst	κάππα1 (ανθρώπου)KOR-1
i <b>yifnl</b> aladtvl1ltlpfqgt	κάππα3 (ανθρώπου)KOR-3
i <b>yifnl</b> aladtvl1ltlpfqgt	κάππα3 (ποντικού)

Η αλληλουχία του πενταπεπτιδίου παρουσιάζεται με έντονα γράμματα.

Συγκρίνοντας αυτήν την αλληλουχία με άλλα οπιοειδή παρατηρήθηκε ότι έχει το αμινοξύ τυροσίνη (Tyr) στη θέση 1 η  $\beta$ -καζομορφίνη, η  $\beta$ -καζομορφίνη 1-5 και η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη και το αμινοξύ λευκίνη (Leu) στη θέση 5 όπως η λευκίνη-Εγκεφαλίνη. Το πενταπεπτίδιο αυτό συντέθηκε και μελετήθηκε η πιθανή οπιοειδής δράση του στα καρκινικά κύτταρα του προστάτου δεδομένου ότι παρουσιάζει ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά με οπιοειδή πεπτίδια. Οι μελέτες μας έδειξαν ότι έχει

χαρακτηριστικά ενός οπιοειδούς αγωνιστή τουλάχιστον όσο αφορά τη δόσοεξαρτώμενη και αναστρέψιμη δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (σχήμα-32) και τη δέσμευση του σε οπιοειδείς υποδοχείς (σχήμα-31). Πράγματι, βρέθηκε ότι δεσμεύεται στους οπιοειδείς υποδοχείς και κυρίως στους μι και κάππα υποδοχείς (Πίνακας XII). Όσον αφορά τώρα τη δράση του στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό προκαλεί ελάττωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού και των τριών καρκινικών κυτταρικών σειρών κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Η μέγιστη αναστολή παρατηρήθηκε στα κύτταρα DU-145 και LNCaP (ποσοστό μέγιστης αναστολής 60%). Η δράση του ήταν αναστρέψιμη παρουσία διπρενορφίνης στα κύτταρα DU-145 και PC3 ενώ στα LNCaP ενισχύοταν (σχήμα-32). Συγκρίνοντας τώρα τις τιμές των IC<sub>50</sub> με αυτές άλλων οπιοειδών πεπτιδίων στις ίδιες καρκινικές κυτταρικές σειρές, η δράση τους είναι ισχυρή και παρόμοια με αυτή της α<sub>s1</sub> καζομορφίνης.

Επειδή, όπως αναφέρθηκε, την αλληλουχία του πενταπεπτιδίου την συναντάμε στο δεύτερο κοινό διαμεμβρανικό τμήμα του οπιοειδούς υποδοχέα και λόγω της οπιοειδούς δράσης που παρουσιάζει την ονομάσαμε **ρεσεπτορφίνη**. Η αλληλουχία της ρεσεπτορφίνης υπάρχει σε όλους τους οπιοειδείς υποδοχείς που έχουν μελετηθεί και σε διάφορα είδη οργανισμών (πίνακας XIV). Απαντάται όμως μόνο στον οπιοειδή υποδοχέα (Zhoron and Ananthanarayanan 2000) και δεν ανιχνεύεται σε άλλους υποδοχείς που ανήκουν στην ίδια οικογένεια των μεμβρανικών υποδοχέων με τα επτά διαμεμβρανικά τμήματα, όπως τους σωματινεργικούς υποδοχείς οι οποίοι παρουσιάζουν τη μέγιστη ομολογία με τους οπιοειδείς, σε διάφορα είδη οργανισμών (Reisine and Bell 1993). Παρ'όλ'αυτά στην ίδια θέση στους διάφορους υπότυπους των υποδοχέων σωματοστατίνης (sst1-5) υπάρχει μία αλληλουχία (Tyr- Ile[ή Leu]-Leu-Asn-Leu) η οποία διαφέρει κατά ένα αμινοξύ (Yamada et al. 1992a; Yamada et al. 1992b; Rohrer et al. 1993; Yamada et al. 1993a; Yamada et al. 1993b). Στην αλληλουχία της ρεσεπτορφίνης δύο ή τρία από τα αμινοξέα της (Phe-Asn-Leu) συμμετέχουν στη δημιουργία της θέσης σύνδεσης των οπιοειδών (Zhoron and Ananthanarayanan 2000) γεγονός που εξηγεί την ύπαρξή της σε όλους τους οπιοειδείς υποδοχείς και μόνο σε αυτούς.

**ΠΙΝΑΚΑΣ XIV.** Η θέση της ρεσεπτορφίνης στην αλληλουχία των οπιοειδών υποδοχέων σε διαφορετικά είδη οργανισμών.

Υποδοχέας	Πηγή	Μήκος (α.α.)	Θέση της Ρεσεπτορφίνης	Βιβλιογραφία
δέλτα	Ψαριού (Zebrafish)	373	90-94	(Barrallo et al. 1998)
δέλτα	Ανθρώπου	372	87-91	(Knapp et al. 1994)
μι	Ανθρώπου	400	98-102	(Bare et al. 1994; Wang et al. 1994; Mestek et al. 1995)
μι variant	Ανθρώπου	392	107-112	(Bare et al. 1994)
μι	Ποντικού	367	86-90	(Nishi et al. 1994)
μι	Αρουραίου	398	69-100	(Chen et al. 1993; Eppler et al. 1993; Fukuda et al. 1993; Thompson et al. 1993; Wang et al. 1993; Zastawny et al. 1994; Bunzow et al. 1995; Sedqi et al. 1995)
μι	Βοειδών	401	109-113	(Onoprishvili et al. 1999)
κάππα	Αρουραίου	380	97-101	(Meng et al. 1993)
κάππα	Ινδικού χοιριδίου	380	97-101	(Xie et al. 1994)
κάππα	Ποντικού	380	97-101	(Nishi et al. 1994)
κάππα	Ανθρώπου	380	97-101	(Mansson et al. 1994; Zhu et al. 1995)
Orphan	Ανθρώπου	370	89-93	(Mollereau et al. 1994; Wick et al. 1995)
Orphan	Αρουραίου	357	86-90	(Halford et al. 1995)
Orphan	Ποντικού	367	87-92	(Nishi et al. 1994; Halford et al. 1995; Pan et al. 1995; Matthes et al. 1996)
Orphan	Αρουραίου	367	86-90	(Bunzow et al. 1994; Chen et al. 1994; Fukuda et al. 1994; Wang et al. 1994; Wick et al. 1994; Lachowicz et al. 1995)

Τα παραπάνω αποτελέσματα γίνονται πιο ενδιαφέροντα όταν συνδυαστούν με πιθανή τοπική απελευθέρωση της ρεσεπτορφίνης. Πράγματι υπάρχει αυτή η δυνατότητα αν σκεφτεί κανείς ότι το αμινοξύ που προηγείται της ρεσεπτορφίνης στην αλληλουχία του υποδοχέα είναι η ισολευκίνη (Ile) ενώ αυτό που έπεται είναι η αλανίνη (Ala) και ότι οι δεσμοί -Ile – Tyr- και -Leu – Ala- αποτελούν θέσεις όπου μπορούν να δράσουν οι πεπτιδάσες και να οδηγήσουν στην απελευθέρωσή της από το μόριο του υποδοχέα (Loh et al. 1984; Bond and Butler 1987). Παρ'ολ'αυτά λόγω της θέσης της στο διαμεμβρανικό τμήμα του υποδοχέα, δηλαδή στο υδρόφοβο περιβάλλον της μεμβράνης, προστατεύεται από τη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων, θα μπορούσε όμως να απελευθερωθεί μετά από κυτταρικό θάνατο. Στην περίπτωση αυτή, μετά από την καταστροφή των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων τμημάτων του οπιοειδούς υποδοχέα και της κυτταρικής μεμβράνης, η δράση εξωπεπτιδασών στη

θέση -1 και ενδοπεπτιδασών στη θέση 6 θα είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της. Εάν ένας τέτοιος μηχανισμός ισχύει, η δράση των οπιοειδών θα μπορούσε να ενισχυθεί μετά από επίδραση οπιοειδών ή άλλων παραγόντων που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Έτσι θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι μετά από επίδραση με οπιοειδή που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο η απελευθέρωση της ρεσεπτορφίνης θα μπορούσε να επάγει ένα τοπικό σύστημα θετικής παλίνδρομης ρύθμισης μεταφέροντας τη δράση των οπιοειδών σε γειτονικά κύτταρα τα οποία φέρουν οπιοειδείς υποδοχείς. Αυτός ο μηχανισμός θα μπορούσε να εξηγήσει τη χρονική καθυστέρηση που παρατηρείται στη δράση των οπιοειδών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση σε μία σειρά από καρκινικές κυτταρικές σειρές και στην δράση της οξινοποιήσεως προκειμένου να ανιχνευθούν οπιοειδείς υποδοχείς. Παρ'ολ'αυτά, η εμπλοκή της ρεσεπτορφίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό παραμένει άκρως υποθετική έως τη στιγμή που θα ανιχνευθεί ελεύθερα σε κυτταρικές καλλιέργειες μετά από επαγόμενο κυτταρικό θάνατο.

Η ρεσεπτορφίνη αποτελεί την πρώτη περίπτωση ανιχνεύσεως ενός αγωνιστή στην αλληλουχία του υποδοχέα του. Εξαιρετικά ενδιαφέροντα θα ήταν η πιθανή ανίχνευση παρόμοιων πεπτιδίων στην υπεροικογένεια των υποδοχέων με τα επτά διαμεμβρανικά τμήματα έτσι ώστε να διερευνηθεί εάν αφορά μόνο τον οπιοειδή υποδοχέα ή ισχύει και για τους άλλους υποδοχείς.

#### Πιθανός τρόπος δράσης των οπιοειδών

Η δράση των οπιοειδών όπως είναι γνωστό πραγματοποιείται μέσω ειδικών θέσεων στην κυτταρική μεμβράνη, τους οπιοειδείς υποδοχείς. Οι οπιοειδείς υποδοχείς είναι ετερογενείς και διακρίνονται κυρίως σε τρεις υπότυπους τους μι, τους δέλτα και τους κάππα (Βλέπε εισαγωγή σελ. 22). Πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων με επτά διαμεμβρανικά τμήματα (Σχήμα-7) (Reisine and Bell 1993; Raynor et al. 1996). Σχετικά με την ύπαρξη οπιοειδών υποδοχέων στον προστάτη μόνο μία αναφορά υπάρχει για τον χαρακτηρισμό δ, μ και κ οπιοειδών υποδοχέων σε μία περίπτωση εμβρυικού προστατικού ραβδομυοσαρκώματος (Zagon et al. 1987).

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι σε καρκινικά κύτταρα προστάτου, η δράση των οπιοειδών πραγματοποιείται μέσω οπιοειδών υποδοχέων, όχι όμως αποκλειστικά.



Πιο συγκεκριμένα στις κυτταρικές σειρές DU-145 και PC3 η κατασταλτική δράση των οπιοειδών (αλκαλοειδών και καζομορφινών) αναστέλλεται από την παρουσία του γενικού οπιοειδούς ανταγωνιστή διπρενορφίνη, γεγονός που συμβαδίζει με την ανίχνευση οπιοειδών υποδοχέων στη μεμβράνη των κυττάρων αυτών. Το γεγονός ότι σε κάποιες περιπτώσεις, παρουσία ανταγωνιστή, η αναστολή της δράσης τους δεν ήταν πλήρης υποδηλώνει δράση πιθανώς και μέσω άλλου μεμβρανικού συστήματος υποδοχέων. Στην κυτταρική σειρά LNCaP η ανασταλτική δράση των οπιοειδών δεν ήταν αναστρέψιμη παρουσία ανταγωνιστή, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις ενισχύονταν (σχήμα-12). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι η δράση τους δεν πρέπει να πραγματοποιείται μέσω οπιοειδών υποδοχέων. Πράγματι, στα κύτταρα LNCaP δεν ανιχνεύθηκαν οπιοειδείς υποδοχείς (Πίνακας VII). Άρα λοιπόν γεννιέται το ερώτημα, μέσω ποιών άλλων μεμβρανικών υποδοχέων θα μπορούσε να πραγματοποιείται η δράση τους;

Οι οπιοειδείς υποδοχείς παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ομολογία με τους υποδοχείς της σωματοστατίνης (Kieffer et al. 1992). Η σωματοστατίνη είναι ένα δεκατετραπεπτιδίο το οποίο παράγεται στον υποθάλαμο και το πάγκρεας αλλά έχει ανιχνευθεί και σε μία σειρά φυσιολογικών και καρκινικών ιστών (Reisine 1995a). Η δράση της είναι επίσης κατασταλτική και πραγματοποιείται μέσω πέντε διαφορετικών υποτύπων υποδοχέων (sst-1 έως 5) οι οποίοι έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηρισθεί φαρμακολογικά σε διάφορους ιστούς (Reisine and Bell 1995b). Υποδοχείς σωματοστατίνης έχουν ανιχνευθεί και στον προστάτη (Reubi et al. 1995; Tatoud et al. 1995; Reubi et al. 1996; Reubi et al. 1997; Sinisi et al. 2001). Έτσι κρίθηκε σκόπιμο η μελέτη της πιθανής ύπαρξης υποδοχέων σωματοστατίνης στις τρεις καρκινικές σειρές του προστάτου και της πιθανής δέσμευσης των οπιοειδών σε αυτούς, όπως έχει βρεθεί ότι συμβαίνει σε καρκινικά κύτταρα μαστού και νεφρών (Hatzoglou et al. 1996a, b, c). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν την ύπαρξη μικρού αριθμού υποδοχέων σωματοστατίνης με πολύ υψηλή χημική συγγένεια ( $IC_{50}$  0,0092 nM και 0,044 nM αντίστοιχα) (Σχήμα-20), ενώ δεν ανιχνεύθηκαν υποδοχείς στην κυτταρική σειρά LNCaP. Παρ'ολ'αυτά και στις δύο σειρές που ανιχνεύθηκαν υποδοχείς δεν βρέθηκε δέσμευση των οπιοειδών σε αυτούς γεγονός που διαφοροποιεί τον προστάτη από άλλους ιστούς (π.χ. μαστό) στους οποίους έχει προηγουμένως ανιχνευθεί δράση των οπιοειδών μέσω υποδοχέων σωματοστατίνης.

Οι οπιοειδείς υποδοχείς παρουσιάζουν επίσης ομολογία και με τους αδρενεργικούς υποδοχείς οι οποίοι ανήκουν στη ίδια υπεροικογένεια των διαμεμβρανικών υποδοχέων που συζεύγγονται με G πρωτεΐνες. Μέσω των

αδρενεργικών υποδοχέων πραγματοποιείται η δράση των ενδογενών κατεχολαμινών (νορεπινεφρίνης και επινεφρίνης) σε διάφορα κύτταρα-στόχους. Διακρίνονται κυρίως σε δύο τύπους τους  $\alpha$  και τους  $\beta$  οι οποίοι με τη σειρά τους διακρίνονται σε διάφορους υπότυπους  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  και  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$ .  $\alpha_1$  αδρενεργικοί υποδοχείς έχουν ανιχνευθεί στον φυσιολογικό προστατικό αδένα τόσο με μελέτες δέσμησης (Lepor et al. 1990) όσο και με PCR (Faure et al. 1994). Αυτοραδιογραφική ανάλυση έδειξε ότι βρίσκονται στο ινομύδες στρώμα του φυσιολογικού ιστού (Kobayashi et al. 1993). Παράλληλα  $\beta$  αδρενεργικοί υποδοχείς έχουν ανιχνευθεί σε φυσιολογικό προστάτη ποντικού όπου έχουν συσχετισθεί με τα επίπεδα τεστοστερόνης (Marchetti and Labrie 1988), ενώ  $\alpha_1$  και  $\alpha_2$  υποδοχείς έχουν ανιχνευθεί σε προστατικό αδένωμα (Morita 1991; Morita and Kondo 1992; Moriyama et al. 1999). Τέλος,  $\alpha_1$  αδρενεργικοί υποδοχείς έχουν ανιχνευθεί σε καρκινικό προστατικό ιστό τόσο σε επιθηλιακά όσο και σε στρωματικά κύτταρα (Tseng-Crank et al. 1995). Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω δεδομένα, και το γεγονός ότι έχει παρατηρηθεί αλληλεπίδραση οπιοειδών με τους  $\alpha_2$  (Simantov et al. 1982; Lee et al. 1988) μελετήθηκε η πιθανή αλληλεπίδραση των οπιοειδών με τους αδρενεργικούς υποδοχείς η οποία θα εξηγούσε και την δράση των οπιοειδών στη κυτταρική σειρά LNCaP η οποία δεν βρέθηκε να έχει οπιοειδείς υποδοχείς στην μεμβράνη της. Αρχικά ελέγχθηκε η δράση της EKC παρουσία του  $\alpha_1$  αδρενεργικού ανταγωνιστή πραζοσίνη. Παρατηρήθηκε ότι η παρουσία της πραζοσίνης επηρέαζε την ανασταλτική δράση της EKC ενώ η πραζοσίνη μόνη της παρουσίαζε κατασταλτική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν πρώτον την ύπαρξη  $\alpha_1$  αδρενεργικών υποδοχέων και δεύτερον ότι η δράση της EKC πραγματοποιείται μερικώς μέσω αυτών των υποδοχέων. Πράγματι, μελέτες δέσμησης επιβεβαίωσαν το γεγονός ανιχνεύοντας  $\alpha_1$  αδρενεργικούς υποδοχείς με υψηλή συγγένεια ( $IC_{50}$  0,695 nM) στους οποίους δεσμεύεται και η EKC με μικρότερη συγγένεια ( $IC_{50}$  1,82 nM) (σχήμα-22). Η κυτταρική σειρά LNCaP είναι αρκετά καλά διαφοροποιημένη διατηρώντας πολλά από τα χαρακτηριστικά του φυσιολογικού ιστού όπως και την παρουσία των  $\alpha_1$  αδρενεργικών υποδοχέων οι οποίοι δεν ανιχνεύονται στις κυτταρικές σειρές DU-145 και PC3 (Kyprianou and Benning 2000) που είναι λιγότερο διαφοροποιημένες.

Παράλληλα με τον τρόπο δράσεως των οπιοειδών που περιλαμβάνει σύνδεσή τους με μεμβρανικούς υποδοχείς μελετήθηκε πιθανή αλληλεπίδρασή τους με το σύστημα της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου ( $NO\cdot$ ). Η ελεύθερη ρίζα

του μονοξειδίου του αζώτου (NO<sup>•</sup>) είναι μία μικρή και αρκετά ασταθής ρίζα που παράγεται από διάφορα κύτταρα και σε διάφορα είδη οργανισμών. Ο ρόλος της βασίζεται στο πολύ μικρό μέγεθος της και τη διαχυτικότητα της με αποτέλεσμα να αποτελεί ένα νέο είδος αγγελιοφόρου που δρά ανεξάρτητα από κανάλια και ειδικούς μεταφορείς (Bredt and Snyder 1994), επηρεάζει ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταγωγής σήματος και μακροπρόθεσμα την έκφραση διαφόρων γονιδίων (Bogdan 2001). Παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών λειτουργιών συμμετέχοντας στις νευροδιαβιβάσεις, την πήξη του αίματος τη ρύθμιση της πίεσης καθώς και στην ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να μπορεί να καταστρέψει καρκινικά κύτταρα και ενδοκυττάρια παράσιτα. Υψηλές συγκεντρώσεις της NO<sup>•</sup> μπορεί να έχουν είτε ευεργετικό (αντιμικροβιακή δράση) είτε καταστροφικό αποτέλεσμα, που να οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (Colasanti and Suzuki 2000). Ο ρόλος στον καρκίνο δεν είναι ξεκάθαρος. Έχει βρεθεί ότι συμμετέχει τόσο στην προαγωγή όσο και στην αναστολή καρκινικών όγκων, γεγονός που πιθανώς σχετίζεται με την συγκέντρωσή της στο περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων (Brennan 2000). Μία σειρά από μελέτες αναφέρουν αλληλεπίδραση μεταξύ του οπιοειδούς συστήματος και αυτό της NO<sup>•</sup> σε διάφορα όργανα. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι παράγοντες που σχετίζονται με την NO<sup>•</sup> αναστέλλουν τη δράση της μορφίνης στην στεροειδογένεση (Adams et al. 1996) ενώ αναστολείς της σύνθεσής της NO<sup>•</sup> (NOS) αναστρέφουν τη δράση των οπιοειδών ανταγωνιστών (Budziszewska et al. 1999) μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Επιπλέον, η NO<sup>•</sup> και η αργινίνη ελαττώνουν την αποτελεσματικότητα της μορφίνης (Babey et al. 1994; Bhargava et al. 1997a) μέσω τροποποίησης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του cGMP χωρίς να επηρεάζει τη δέσμευση της στους υποδοχείς (Bhargava and Cao 1997b). Αντίθετα έχει βρεθεί ότι η μορφίνη προκαλεί άμεσα έκκριση NO<sup>•</sup> στον καρδιακό κόλπο (Bilfinger et al. 1998) ενώ στο αγγειακό ενδοθήλιο βρέθηκε ότι ο μι οπιοειδής υποδοχέας δρα τουλάχιστον μερικώς μετά από σύζευξη με τη cNOS και την iNOS (Stefano et al. 1995; Stefano et al. 2000). Παράγοντες που προκαλούν απελευθέρωση της NO<sup>•</sup> εμποδίζουν την δημιουργία εθισμού στα οπιοειδή (Majeed et al. 1994; Lue et al. 1999) και έχουν χρησιμοποιηθεί πειραματικά ως αγωγή στο σύνδρομο στέρησης των οπιοειδών. Μι οπιοειδείς υποδοχείς συνεντοπίζονται στο νευρικό σύστημα αρουραίου (Ding et al. 1998d). Τέλος, ο U-50488H, ένας κάππα οπιοειδής αγωνιστής αναστέλλει τη δραστηριότητα της nNOS in vitro (Barjavel and Bhargava 1994).

Τα κύτταρα T47D βρέθηκε ότι παράγουν NO<sup>•</sup> (σχήμα-33) ενώ επίδραση των κυττάρων με οπιοειδή (EKC και α<sub>s1</sub> καζομορφίνη) για 24 ώρες είχε ως αποτέλεσμα

ελάττωση της παραγωγής της (σχήμα-34). Άμεση επίδραση με οπιοειδή είχε παρόμοιο αποτέλεσμα γεγονός που υποδεικνύει πιθανή άμεση επίδραση των οπιοειδών στην παραγωγή της NO<sup>•</sup>. Πράγματι η δραστηριότητα του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για την σύνθεση της NO<sup>•</sup> (NOS) ελαττώθηκε μετά από επίδραση με οπιοειδή (σχήμα-35). Ιδιαίτερης σημασίας όμως ήταν το εύρημα ότι τα οπιοειδή επηρεάζουν τη δραστηριότητα της NOS όχι μόνο μετά από εικοσιτετράωρη επίδραση αλλά και άμεσα που σημαίνει ότι πιθανώς αλληλεπιδρούν με το ίδιο το ένζυμο. Ελάττωση της δραστηριότητας της NOS παρατηρήθηκε μετά από άμεση επίδραση τόσο με την EKC όσο και με την α<sub>51</sub> καζομορφίνη ενώ μόνο η EKC είχε ως αποτέλεσμα άμεση ελάττωση της παραγωγής NO<sup>•</sup>. Αυτό σημαίνει ότι για να πραγματοποιηθεί οποιαδήποτε αλληλεπίδραση των οπιοειδών με τη NOS πρέπει να βρεθούν στο κυτταρόπλασμα σε ενεργή μορφή. Μελέτες αναφέρουν ότι μετά από επίδραση με οπιοειδή το σύμπλοκο οπιοειδές-υποδοχέας εισέρχεται στο κύτταρο με ενδοσωμάτια τα οποία κατευθύνονται προς τα λυσοσώματα όπου πραγματοποιείται διάσπαση του υποδοχέα ή/και του οπιοειδούς. Η όλη διαδικασία μεταφοράς του συμπλόκου αρχίζει αμέσως (μέσα σε λίγα λεπτά) μόλις πραγματοποιηθεί η επίδραση και φτάνει στο μέγιστο μέσα σε 4 ώρες (Gaudriault et al. 1997; Ko et al. 1999). Έπειτα, εάν η επίδραση του οπιοειδούς διαρκεί μικρό χρονικό διάστημα ο υποδοχέας επανέρχεται στην πλασματική μεμβράνη ενώ διαφορετικά κατευθύνεται στα λυσοσώματα. Τα αλκαλοειδή οπιοειδή τα οποία είναι υδρόφοβα μπορούν και εισέρχονται απευθείας στο κυτταρόπλασμα. Αντίθετα για τα πεπτίδια απαιτείται ενεργός μεταφορά με ενδοκύττωση που διαμεσολαβείται από υποδοχείς και στη συνέχεια είτε διασπώνται είτε παρουσιάζουν ενδοκυττάρια δράση. Πράγματι έχει βρεθεί ότι η β-ενδορφίνη αλληλεπιδρά με ενδοκυττάριας θέσεις σύνδεσης υποδηλώνοντας ενδοκυττάρωσή της σε ενεργή μορφή (Schweigerer et al. 1985), ενώ ανάλογα των εγκεφαλικών έχει βρεθεί ότι ανακυκλώνονται στο θρεπτικό καλλιέργειας μετά από ενδοκυττάρωση συμπλόκου υποδοχέας-οπιοειδές και λυσοσωμική διάσπαση του υποδοχέα (Law et al. 1984). Οι ανθρώπινοι κάππα οπιοειδείς υποδοχείς ενδοκυτταρώνονται επίσης πολύ γρήγορα και μετά από 20 λεπτά το 40% αυτών ανευρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Μετά την απομάκρυνση του οπιοειδούς αγωνιστή οι υποδοχείς επανεμφανίζονται στην κυτταρική μεμβράνη (Li et al. 1999) ενώ υπάρχουν και αναφορές ότι κάππα εκλεκτικά οπιοειδή πεπτίδια προκαλούν μείωση των υποδοχέων (Jordan et al. 2000). Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι μετά από την αλληλεπίδραση του οπιοειδούς με τον υποδοχέα, το σύμπλοκο βρίσκεται μέσα στο κύτταρο πολύ γρήγορα και θα μπορούσε έτσι να

αποτελέσει πιθανή εξήγηση για τη γρήγορη δράση των οπιοειδών στην NOS και κατ' επέκταση στη παραγωγή της NO'.

Στα καρκινικά κύτταρα του προστάτου ανιχνεύθηκε επίσης παραγωγή της NO' (σχήμα-36) ενώ προκαταρκτικές μελέτες έδειξαν ότι επίδραση με οπιοειδή επηρεάζει τη παραγωγή της και αποτελεί επίσης πιθανό τρόπο δράσης των οπιοειδών στον προστάτη όπως και στον μαστό παρόλο που δεν παρατηρήθηκε άμεση επίδραση στη NOS. Τα αποτελέσματά μας αυτά όμως είναι πολύ πρόδρομα και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την επιβεβαίωσή τους.

Οι τρεις κυτταρικές σειρές του προστάτου που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας είναι διαφορετικές κυρίως όσον αφορά την ανταπόκρισή τους στα ανδρογόνα, γεγονός που οφείλεται στην απουσία ή παρουσία λειτουργικών ανδρογονικών υποδοχέων. Η κυτταρική σειρά LNCaP φέρει λειτουργικούς ανδρογονικούς υποδοχείς και ανταποκρίνεται στα ανδρογόνα, η κυτταρική σειρά PC3 φέρει ανδρογονικούς υποδοχείς οι οποίοι όμως λόγω μετάλλαξης δεν είναι λειτουργικοί και έτσι δεν ανταποκρίνεται στα ανδρογόνα όπως επίσης και η κυτταρική σειρά DU-145 η οποία όμως δεν εκφράζει ανδρογονικούς υποδοχείς. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η πιο διαφοροποιημένη κυτταρική σειρά η LNCaP δεν εμφανίζει οπιοειδείς υποδοχείς, ενώ η λιγότερο διαφοροποιημένη (DU-145) φέρει τους περισσότερους. Μπορούμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι η εμφάνιση των οπιοειδών υποδοχέων πιθανώς να σχετίζεται με έναν λιγότερο διαφοροποιημένο και πιο επιθετικό φαινότυπο. Αντίθετα, έντονη κατασταλτική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό παρατηρήθηκε τόσο σε ορμονοευαίσθητες (LNCaP) όσο και σε ορμονοάντοχες κυτταρικές σειρές (PC3, DU-145).

Λαμβάνοντας λοιπόν υπ' όψιν ότι στα κύτταρα LNCaP που φέρουν ανδρογονικούς υποδοχείς τα οπιοειδή έχουν δράση απουσία οπιοειδών υποδοχέων η μελέτη μας επικεντρώθηκε σε αυτή την κυτταρική σειρά προσπαθώντας να ανιχνεύσουμε τον τρόπο δράσεως των οπιοειδών, ο οποίος πρέπει να είναι διάφορος του κλασσικού τρόπου δράσεως τους.

Η δράση των ανδρογόνων όπως προαναφέρθηκε πραγματοποιείται μετά από σύνδεσή τους με τους ανδρογονικούς υποδοχείς. Πρόκειται για ενδοκυττάριους υποδοχείς αφού τα ανδρογόνα, όπως και όλες οι στεροειδείς ορμόνες, είναι λιποδιαλυτά μόρια, ικανά να διασχίζουν την κυτταρική μεμβράνη. Το σύμπλοκο στεροειδής ορμόνη-υποδοχέας εισέρχεται στον πυρήνα, όπου και επηρεάζει τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων. Αυτός ο γενωμικός τρόπος δράσης, αφορά όλα τα

στεροειδή και επιτυγχάνεται σε μεγάλα χρονικά διαστήματα από τη στιγμή της έκθεσης σε αυτά, διότι περιλαμβάνει σχετικά χρονοβόρες διαδικασίες όπως η σύνθεση mRNA και πρωτεϊνών (Zhou et al. 1994; Quigley et al. 1995).

Αντιπροσωπευτικό γονίδιο, η μεταγραφή του οποίου ελέγχεται από τα ανδρογόνα είναι αυτό του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA). Το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA) είναι μία πρωτεάση, εκκρίνεται από τα κύτταρα του προστάτου και αποτελεί δείκτη εξωκρινής διαφοροποίησης των κυττάρων υπό την δράση ανδρογόνων (Bilhartz et al. 1991; Oesterling 1991). Έτσι αρχικά μελετήθηκε η δράση των οπιοειδών στη έκκριση του PSA από τα κύτταρα LNCaP. Πιο συγκεκριμένα εικοσιτετράωρη επίδραση των κυττάρων με οπιοειδή και με αιθυλκετοκυκλοζοσίνη (EKC) είχε ως αποτέλεσμα αναστολή της επαγόμενης από τα ανδρογόνα έκκρισης του PSA η οποία όμως δεν είναι αποτέλεσμα άμεσης επίδρασης των οπιοειδών στους ανδρογονικούς υποδοχείς αφού όπως διαπιστώθηκε τα οπιοειδή δεν επηρεάζουν ούτε τον αριθμό ούτε τη συγγένεια σύνδεσης των ανδρογόνων με αυτούς.

Πρόσφατα μια σειρά από μελέτες αναφέρθηκαν στη δυνατότητα των στεροειδών ορμονών να παρουσιάζουν ταχεία δράση η οποία φυσικά δεν μπορεί να πραγματοποιείται μέσω των κλασσικών στεροειδών υποδοχέων (McEwen 1991; Wehling 1997; Watson et al. 1999b; Borski 2000). Αρκετές μάλιστα μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης μέσω των οποίων πραγματοποιείται η ταχεία δράση τους, παρέχοντας έτσι μια εξήγηση για την ταχεία δράση των στεροειδών σε κύτταρα ή κυτταρικές σειρές που δε φέρουν στεροειδείς υποδοχείς (μη γενωμική δράση).

Η πρώτη μαρτυρία για μη γενωμική δράση της τεστοστερόνης ανακοινώθηκε το 1984. Οι Diez και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η τεστοστερόνη ενισχύει τη δραστικότητα φωσφορυλίωσης του γλυκογόνου στο ήπαρ κοτόπουλου μέσω ενός μηχανισμού που δεν περιλαμβάνει πρωτεϊνική σύνθεση, αλλά εξαρτάται από το ασβέστιο (Diez et al. 1984). Μεμβρανικές θέσεις σύνδεσης της τεστοστερόνης ανιχνεύθηκαν σε οστεοβλάστες και κύτταρα Sertoli, (Gorczyńska and Handelsman 1995; Armen and Gay 2000), T λεμφοκύτταρα ποντικού (CD4 και CD8 θετικά) προκαλώντας ενδοκυττάρια εισροή ασβεστίου (Benten et al. 1997; Benten et al. 1999b) μακροφάγα (Benten et al. 1999a), κύτταρα επιδιδιμίδας (Felden et al. 1992) και κύτταρα κοιλιακής μοίρας προστάτη ποντικού (Konoplyva and Popoff 1992). Στην τελευταία περίπτωση παρατηρήθηκε δράση της τεστοστερόνης μόνο σε συγκεντρώσεις 0,14 έως 14 nM μέσω ενεργοποίησης μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης

μοριακού βάρους 180 kDa. Επιπλέον σε αορτή ποντικού παρατηρήθηκε δράση της τεστοστερόνης μέσω μεμβρανικών θέσεων που προκαλούν ενεργοποίηση διαύλων ιόντων καλίου ( $K^+$ ), ενώ σε εκκριτικά κύτταρα στομάχου ποντικού βρέθηκε ότι η τεστοστερόνη επηρεάζει την έκκριση χλωρίου μέσω ενός μηχανισμού που σχετίζεται με την forskolin (Leung et al. 2001).

Ο αυξανόμενος αριθμός μελετών που σχετίζεται με την ανίχνευση μεμβρανικών θέσεων σύνδεσης των ανδρογόνων σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι η DHT επάγει την έκκριση του PSA σε μικρά χρονικά διαστήματα, μας έδωσε το έναυσμα για την μελέτη της ταχείας δράσης των ανδρογόνων πιθανώς μέσω ύπαρξης μεμβρανικών υποδοχών και στα κύτταρα LNCaP.

Βρέθηκε ότι η DHT προκαλεί δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη αύξηση της έκκριση του PSA, ενώ δράση η οποία παρατηρείται μόλις μετά από επίδραση 10 λεπτών (σχήμα-42). Η σύνθεση και η έκκριση του PSA όπως είναι γνωστό είναι αποτέλεσμα γενωμικής δράσης της τεστοστερόνης μετά από σύνδεση της σε ενδοκυττάρους ανδρογονικούς υποδοχείς. Η πολύ γρήγορη όμως δράση που περιγράφηκε παραπάνω, δεν απαιτεί την είσοδο της τεστοστερόνης στο κύτταρο αφού, χρησιμοποιώντας τεστοστερόνη συνδεδεμένη με BSA η οποία δεν μπορεί να περάσει μέσα στο κύτταρο, παρατηρήθηκε παρόμοια δράση. Έτσι λοιπόν, το γεγονός αυτό υποδεικνύει δράση στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης. Πράγματι, χρησιμοποιώντας τεστοστερόνη-BSA-FITC ανιχνεύθηκε τόσο με κυτταρομετρία ροής όσο και μικροσκοπία συνεστίασης, δέσμευσή της στη μεμβράνη των κυττάρων LNCaP (σχήματα-38,39).

Μία πιθανή εξήγηση της δέσμευσης της τεστοστερόνης στη κυτταρική μεμβράνη θα μπορούσε να αποτελεί η δέσμευση της στις σφαιρίνες που προσδένονται με στεροειδείς ορμόνες (SHBG) και ακολούθως η δέσμευση της τεστοστερόνης-SHBG στους υποδοχείς των SHBG στην κυτταρική μεμβράνη (Nakhla et al. 1990; Nakhla and Rosner 1996; Ding et al. 1998a) ή η παρουσία ενδοκυττάρων υποδοχών δεσμευμένων στην κυτταρική μεμβράνη. Παρ'ολ'αυτά, το γεγονός ότι η δράση της τεστοστερόνης παρατηρήθηκε σε ολόκληρα κύτταρα χρησιμοποιώντας την τεστοστερόνη-BSA και σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, καθώς και η δράση της σε παρασκευάσματα μεμβρανών μετά από δράση υπερήχων και έντονο πλύσιμο, αποκλείουν τις ανωτέρω πιθανότητες.

Απομόνωση κυτταρικών μεμβρανών και πειράματα δέσμευσης οδήγησαν στην ανίχνευση εκλεκτικών θέσεων δέσμευσης των ανδρογόνων με σταθερά διάστασης ( $K_D$ ) 10.9 nM και αριθμό θέσεων 144,3 fmoles/mg πρωτεΐνης που

αντιστοιχούν περίπου σε 13.340 υποδοχείς ανά κύτταρο (σχήμα-40). Η χημική συγγένεια των μεμβρανικών θέσεων δέσμευσης της τεστοστερόνης που ανιχνεύθηκαν στα κύτταρα LNCaP είναι παρόμοια με αυτή που βρέθηκε σε διάφορα άλλα ανθρώπινα και ζωικά κύτταρα ή κυτταρικές σειρές (Felden et al. 1992; Gorczynska and Handelsman 1995; Benten et al. 1997; Benten et al. 1999a; Armen and Gay 2000). Επιπλέον, ανοσοιστοχημικές μελέτες χρησιμοποιώντας αντίσωμα κατά του κλασσικού υποδοχέα έδειξαν ότι οι μεμβρανικές αυτές θέσεις είναι διαφορετικές από τον κλασσικό ανδρογονικό υποδοχέα, τουλάχιστον ανοσολογικά (σχήμα-41).

Η κυτταρική έκκριση είναι μία από τις κυτταρικές λειτουργίες όπως η ενδοκύττωση (Sako and Kusumi 1994) και η εξωκύττωση (Hesketh and Pryme 1991), η ενεργότητα διαφόρων πρωτεϊνών μεταφοράς (Jessen and Hoffmann 1992) και ιοντικών διαύλων όπως διαύλων νατρίου (Papakonstanti et al. 1996; Papakonstanti et al. 2000) στις οποίες συμμετέχει ο κυτταροσκελετός της ακτίνης με αλλαγές στην κατάσταση πολυμερισμού της (Sontag et al. 1988; Kiley et al. 1992; Papakonstanti et al. 1996). Αλλαγές στον κυτταροσκελετό της ακτίνης παίζουν κεντρικό ρόλο στον τρόπο με τον οποίο τα διάφορα ερεθίσματα επάγουν κυτταρικές αποκρίσεις. (Cantiello et al. 1991a, b; Theodoropoulos et al. 1992; Cantiello et al. 1993; Fuller et al. 1994; Koukouritaki et al. 1996; Koukouritaki et al. 1997). Σε αρκετές περιπτώσεις, ο κυτταροσκελετός της ακτίνης αποτελεί στόχο της μη γενωμικής δράσης διαφόρων ορμονών όπως η ινσουλίνη (Vedeler et al. 1991; Kirkeeide et al. 1993), οι θυροειδείς ορμόνες (Davis and Davis 1996; Leonard and Farwell 1997), τα οιστρογόνα (Gorodeski 1998), ή τα γλυκοκορτικοειδή (Koukouritaki et al. 1996).

Στη περίπτωση της ταχεία επαγόμενης από τα ανδρογόνα, έκκρισης του PSA από τα κύτταρα LNCaP φαίνεται ότι εμπλέκεται ο κυτταροσκελετός της ακτίνης. Αυτό διαπιστώθηκε όταν η παρουσία της κυτοχλασίνης Β, η οποία αποτελεί παράγοντα αποπολυμερισμού των μικροϊνιδίων της ακτίνης, ανέστειλε την επαγόμενη από τα ανδρογόνα έκκριση του PSA (σχήμα-43). Επιπλέον, μελετήθηκε τόσο η δράση της τεστοστερόνης όσο και της τεστοστερόνης-BSA στον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Παρατηρήθηκε, μεταβολή στη δυναμική ισορροπία πολυμερισμού της ακτίνης, δεδομένου ότι βρέθηκε ελάττωση του λόγου της μονομερούς (G)/πολυμερή ακτίνη(F) που υποδηλώνει σημαντική αύξηση των επιπέδων της F ακτίνης (σχήμα-44), στοιχεία τα οποία συμφωνούν με την ταχεία αύξηση της έκκρισης του PSA παρουσία ανδρογόνων. Μορφολογική παρατήρηση των κυττάρων με εφαρμογή μικροσκοπίας συνεστίασης έδειξε αναδιοργάνωση του



ινιδιακού πλέγματος της ακτίνης και ανακατανομή της κάτω από την κυτταρική μεμβράνη (σχήμα-45).

Διαπιστώνοντας λοιπόν, με την παρούσα μελέτη, ότι τα ανδρογόνα παρουσιάζουν και ταχεία επίδραση στην έκκριση του PSA από τα κύτταρα LNCaP, δράση η οποία πραγματοποιείται μέσω μεμβρανικών υποδοχέων κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση των οπιοειδών και στην ταχεία δράση τους. Πράγματι η ταχέως επαγόμενη έκκριση του PSA αναστέλλεται παρουσία EKC (σχήμα-46). Πιθανό τρόπος δράσης θα μπορούσε να αποτελεί η επίδραση και των οπιοειδών στον κυτταροσκελετό της ακτίνης, αφού η αναστολή που παρατηρήθηκε ήταν παρόμοια με αυτή της κυτοχλασίνης (σχήμα-47). Σχετικά πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα οπιοειδή μπορούν να προκαλέσουν σύντομες μεταβολές στην κατάσταση πολυμερισμού της ακτίνης οδηγώντας στον αποπολυμερισμό του μικροϊνιδιακού πλέγματος σε επιθηλιακά κύτταρα εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου (Papakonstanti et al. 1998) και καρκινικά κύτταρα μαστού (Panagiotou et al. 1999) ενώ σταθεροποιούν τα ινίδια της ακτίνης καταστέλλοντας τη βασική και την επαγόμενη από την νικοτίνη έκκριση των κατεχολαμινών από τα κύτταρα PC12 (Dermitzaki et al. 2001). Βρέθηκε λοιπόν, ότι η EKC αναστέλλει τον πολυμερισμό της ακτίνης (σχήμα-48) που είναι αποτέλεσμα της δράσης των ανδρογόνων, ερμηνεύοντας έτσι και τη δράση της EKC στην επαγόμενη από τα ανδρογόνα έκκριση του PSA.

Παράλληλα με τη μελέτη της δράσης της EKC στον κυτταροσκελετό μελετήθηκε και πιθανή επίδραση της στους μεμβρανικούς υποδοχείς της τεστοστερόνης που ανιχνεύθηκαν. Επίδραση των κυττάρων με EKC για 96 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του αριθμού των μεμβρανικών υποδοχέων ενώ δεν επηρέαζε την συγγένεια δέσμευσης των ανδρογόνων σε αυτούς (σχήμα-50).

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι τα οπιοειδή σε μικρά χρονικά διαστήματα επηρεάζουν την επαγόμενη από τα ανδρογόνα έκκριση του PSA, μετά από δράση στον κυτταροσκελετό της ακτίνης ενώ σε μεγάλα χρονικά διαστήματα λόγω ελάττωσης του αριθμού των μεμβρανικών ανδρογονικών υποδοχέων. Η ελάττωση αυτή θα μπορούσε επίσης να αποτελέσει πιθανή εξήγηση της δράσης της EKC στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

## Γενικά Συμπεράσματα-Προοπτικές

Ο καρκίνος του προστάτου αποτελεί τον πιο συχνό καρκίνο στους άνδρες και τη δεύτερη αιτία θανάτου μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Σημαντικό ρόλο παίζουν τα ανδρογόνα, απουσία των οποίων παρατηρείται συνήθως μείωση του μεγέθους του όγκου. Σε πολλές όμως περιπτώσεις παρατηρείται υποτροπή της νόσου λόγω της δημιουργίας ορμονοαντοχής. Η παρουσία καρκινικών εστιών στο φυσιολογικό προστατικό αδένα είναι πάρα πολύ συχνή, μικρό όμως ποσοστό θα οδηγηθεί σε καρκίνο. Άμεσες κυτταρικές αλληλεπιδράσεις καθώς επίσης και ουσίες (αυξητικοί παράγοντες, νευροπεπτίδια) που υπάρχουν τοπικά είναι δυνατόν να οδηγήσουν στη δημιουργία και την επαγωγή ενός όγκου ή στο κυτταρικό θάνατο.

Τα αποτελέσματά μας συνηγορούν υπέρ ενός πιθανού ρυθμιστικού ρόλου των οπιοειδών στον προστάτη. Βρέθηκε ότι εξωγενείς αλλά και ενδογενείς ή τροφικά προερχόμενοι οπιοειδείς αγωνιστές, αναστέλλουν το πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων προστάτου και η δράση τους διαμεσολαβείται κυρίως μέσω οπιοειδών υποδοχέων. Παράλληλα, αλληλεπιδρούν με τους  $\alpha_1$  αδρενεργικούς υποδοχείς αλλά όχι με τους υποδοχείς σωματοστατίνης, τροποποιούν τον κυτταροσκελετό της ακτίνης, επηρεάζουν τη ταχεία μη γενωμική δράση των ανδρογόνων και ελαττώνουν τον αριθμό των μεμβρανικών ανδρογονικών υποδοχέων που ανιχνεύθηκαν στα κύτταρα LNCaP. Τέλος, αλληλεπιδρούν με το σύστημα της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου.

Επομένως, το οπιεργικό σύστημα θα μπορούσε να αποτελεί ουσιαστικό παράγοντα ελέγχου του καρκινικού κυττάρου με δεδομένο ότι στον προστάτη έχουν βρεθεί κύτταρα που παράγουν οπιοειδή, ενώ εναλλακτικά, μπορούν να φτάσουν και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, κυρίως τα τροφικώς προερχόμενα πεπτίδια (καζομορφίνες).

Παράλληλα με τα δύο νέα οπιοειδή πεπτίδια που ταυτοποιήθηκαν, παρουσιάζεται ένας νέος πιθανός τρόπος παρουσίας οπιοειδών πεπτιδίων τοπικά (ρεσεπτορφίνη) και ένα οπιοειδές πεπτίδιο προερχόμενο από ανθρώπινη πρωτεΐνη, η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη, με ισχυρή κατασταλτική δράση.

Επιπλέον τα παραπάνω δεδομένα παρέχουν στοιχεία για μία πιθανή νέα, ίσως πιο φυσιολογική, προσέγγιση στη φαρμακευτική αγωγή του καρκίνου του προστάτου.

Η συνέχεια της παρούσης ερευνητικής προσπάθειας περιλαμβάνει μελέτες που αφορούν α) την ανίχνευση της παραγωγής οπιοειδών από τα καρκινικά κύτταρα

του προστάτου καθώς και την παρουσία της ρεσεπτορφίνης στο θρεπτικό υλικό μετά από κυτταρικό θάνατο, β) τη περαιτέρω διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των οπιοειδών με το σύστημα NO/NOS, και τέλος τη διερεύνηση του μηχανισμού που ρυθμίζει τις ταχείες μεταβολές στην κατάσταση πολυμερισμού της ακτίνης ως απόκριση στα ανδρογόνα και τα οπιοειδή.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του προστάτου αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο, στον άντρα. Η συχνότητα εμφάνισης και η θνησιμότητα από καρκίνο του προστάτου αυξάνονται ραγδαία προϋούσης της ηλικίας. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του χωρίς όμως ο ρόλος τους να είναι ξεκάθαρος. Επιπλέον, στον προστατικό αδένα παρόλο που η ύπαρξη καρκινικών εστιών είναι πάρα πολύ συχνή, ένας μικρός μόνο αριθμός θα οδηγήσει στη δημιουργία όγκου. Πιθανολογείται ότι αυτό οφείλεται σε διάφορους παράγοντες που δρουν τοπικά και προάγουν ή αναστέλλουν τη δημιουργία του. Πιθανό παράγοντα αποτελούν τα νευροπεπίδια γενικότερα και ειδικότερα τα οπιοειδή τα οποία θα μπορούσαν να ανευρίσκονται στον προστατικό αδένα είτε μετά από παραγωγή τους τοπικά, είτε μέσω της κυκλοφορίας (πχ β-ενδορφίνη ή τροφικής προέλευσης πεπίδια). Τα αποτελέσματα της παρούσης διατριβής παρέχουν στοιχεία για το πιθανό ρόλο των οπιοειδών στον καρκίνο του προστάτου.

Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι τα οπιοειδή, αλκαλοειδή, πεπίδια αλλά και καζομορφίνες παρουσιάζουν δράση σε καρκινικά κύτταρα προστάτου (DU-145, PC3 και LNCaP) ελαττώνοντας τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους. Η δράση τους αυτή στις κυτταρικές DU-145 και PC3 στις περισσότερες περιπτώσεις ήταν αναστρέψιμη παρουσία του γενικού οπιοειδούς ανταγωνιστή διπρενορφίνη, γεγονός που υποδεικνύει δράση μέσω ειδικών θέσεων δέσμευσης. Πράγματι, ανιχνεύθηκαν οπιοειδείς υποδοχείς και στις δύο κυτταρικές σειρές. Στη κυτταρική σειρά DU-145 ανιχνεύθηκαν οι  $\mu_1$ ,  $\kappa_1$  και  $\kappa_3$  υπότυποι των οπιοειδών υποδοχέων στους οποίους δεσμεύονται με υψηλή συγγένεια, ενώ στην κυτταρική σειρά PC3 οι  $\mu_1$  και  $\kappa_1$  υπότυποι. Αντίθετα, στην κυτταρική σειρά LNCaP όπου η διπρενορφίνη δεν ανέστρεφε τη δράση των οπιοειδών και σε κάποιες περιπτώσεις την ενίσχυε δεν ανιχνεύθηκαν οπιοειδείς υποδοχείς. Η ανασταλτική δράση των καζομορφινών ήταν λιγότερο έντονη από αυτή των αλκαλοειδών και των άλλων πεπτιδίων που μελετήθηκαν.

Με δεδομένο ότι κάθε κυτταρική σειρά επιλέχθηκε με βάση την ανταπόκρισή της στα ανδρογόνα έτσι ώστε να αντιπροσωπεύει διαφορετικά στάδια της νόσου παρατηρούμε ότι η εμφάνιση των οπιοειδών υποδοχέων θα μπορούσε να σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου σε ορμονοαντοχή.

Η δράση όμως των οπιοειδών στα καρκινικά κύτταρα του προστάτου δεν πραγματοποιείται αποκλειστικά μέσω των οπιοειδών υποδοχέων. Στο συμπέρασμα αυτό καταλήγουμε γιατί στα κύτταρα DU-145 και PC3 η δράση τους δεν είναι

πλήρως αναστρέψιμη από τη διπρενορφίνη και φυσικά γιατί στα κύτταρα LNCaP δεν ανιχνεύθηκαν οπιοειδείς υποδοχείς. Ελέγχθηκε έτσι η πιθανότητα η δράση τους να πραγματοποιείται πρώτον μέσω άλλων μεμβρανικών συστημάτων υποδοχέων και δεύτερον να δρουν αλληλεπιδρώντας με άλλα συστήματα.

Ανιχνεύθηκε μικρός αριθμός υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα DU-145 και PC3, στους οποίους όμως τα οπιοειδή δεν δεσμεύονται, σε αντίθεση με τον καρκίνο του μαστού, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν στα κύτταρα LNCaP. Στη κυτταρική σειρά LNCaP ανιχνεύθηκαν όμως  $\alpha_1$  αδρενεργικοί υποδοχείς στους οποίους δεσμεύεται η EKC και μικρό μέρος της δράσης της διαμεσολαβείται μέσω των  $\alpha_1$  αδρενεργικών υποδοχέων.

Επιπλέον, στα κύτταρα LNCaP παρατηρήθηκε ταχεία μη γενωμική δράση των ανδρογόνων η οποία έχει ως αποτέλεσμα αύξηση της έκκρισης του PSA και η οποία πραγματοποιείται μέσω ειδικών θέσεων δέσμευσης των ανδρογόνων οι οποίες ανιχνεύθηκαν στη μεμβράνη των κυττάρων. Αποτέλεσμα της δέσμευσης της τεστοστερόνης στους μεμβρανικούς υποδοχείς είναι η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στην οποία οφείλεται και η αύξηση στην έκκριση του PSA. Όσον αφορά τα οπιοειδή βρέθηκε ότι η EKC αναστέλλει την επαγόμενη από τα ανδρογόνα έκκριση του PSA τόσο σε σύντομα χρονικά διαστήματα πιθανώς αλληλεπιδρώντας με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης, όσο και σε μεγάλα χρονικά διαστήματα πιθανώς ελαττώνοντας τον αριθμό των μεμβρανικών ανδρογονικών υποδοχέων.

Τέλος, βρέθηκε ότι διαφορετικό τρόπο δράσης των οπιοειδών πιθανώς να αποτελεί και το σύστημα της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου. Πράγματι, καρκινικά κύτταρα μαστού βρέθηκε ότι παράγουν NO<sup>•</sup> και ότι τα οπιοειδή ανέστειλαν την παραγωγή της αλληλεπιδρώνας απευθείας με το ένζυμο υπεύθυνο για τη σύνθεση της (NOS). Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτου βρέθηκε επίσης ότι παράγουν NO<sup>•</sup> τα οπιοειδή όμως δεν επηρεάζουν άμεσα τη δραστηριότητα της NOS υποδηλώνοντας έναν διαφορετικό μηχανισμό.

Παράλληλα με τα διάφορα οπιοειδή, των οποίων η δράση μελετήθηκε ταυτοποιήθηκαν και δύο νέα πεπτίδια: α) η  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη, η οποία προέρχεται από την αλληλουχία της  $\alpha_s$  καζείνης του ανθρώπινου γάλακτος και θα μπορούσε να απελευθερωθεί με τη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων. Παρουσιάζει ισχυρή οπιοειδή δράση αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των τριών καρκινικών κυτταρικών σειρών του προστάτου καθώς και καρκινικών κυττάρων μαστού. Η δράση της πραγματοποιείται κυρίως μέσω των κάππα οπιοειδών υποδοχέων στους

οποίους δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια αλλά και τους μι. Αντικατάσταση του καρβοξυλικού της άκρου με αμινομάδα είχε ως αποτέλεσμα ελάττωση της δράσης της. β) Η ρεσεπτορφίνη η οποία παρουσιάζει ισχυρή ανασταλτική δράση μέσω των οπιοειδών υποδοχέων. Η ιδιαίτερη σημασία της έγκειται στο γεγονός ότι η αλληλουχία της απαντάται στο δεύτερο κοινό διαμεμβρανικό τμήμα των οπιοειδών υποδοχέων σε μια σειρά από διαφορετικά είδη οργανισμών. Πιθανή απελευθέρωση της μετά από κυτταρικό θάνατο θα μπορούσε να επάγει ένα σύστημα θετικής παλίνδρομης ρύθμισης στη δράση παραγόντων που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο.

Συνοψίζοντας, με τα δεδομένα της παρούσης διατριβής παρουσιάζονται στοιχεία για τον πιθανό ρόλο των οπιοειδών στην αύξηση των καρκινικών προστατικών κυττάρων καθώς και στοιχεία για μία πιθανή νέα, ίσως πιο φυσιολογική, προσέγγιση στη φαρμακευτική αγωγή του καρκίνου του προστάτου.

## **SUMMARY**



Prostate cancer is second, only to lung cancer, most common cause of death from cancer in men. The incidence of prostate cancer increases rapidly with age. A large number of different factors (genetic and environmental) are involved in initiation and progression of prostate cancer but their role remains uncertain. In addition, the presence of foci of cancer within the prostate gland is much more common than the clinically diagnosed disease. Possibly a number of different factors interact locally within the prostate gland and promote or inhibit tumor growth, including neuropeptides and specifically opioids which can reach prostate either through the general circulation ( $\beta$ -endorphine and food derived peptides) or being locally produced by neuroendocrine cells present in the prostate gland.

The results of the present study provide evidences for a possible involvement of opioids in the prostate cancer. It was found that opioids, alkaloids, peptides and casomorphines, inhibit cell growth of three human prostate cancer cell lines (DU-145, PC3 and LNCaP). Their inhibitory action on DU-145 and PC3 cells can be reversed by the general opioid antagonist, diprenorphine, an action indicating a mediation through specific opioid binding sites. Indeed, opioid receptors were identified in both cell lines: DU-145 cells bear  $\mu$ ,  $\kappa_1$  and  $\kappa_3$  opioid receptors while in PC3 cells  $\mu$  and  $\kappa_1$  sites were identified. On the contrary, LNCaP cells where the action of opioids was not reversed but rather enhanced by the opioid antagonist diprenorphine, no opioids receptors were identified. The inhibitory action of casomorphins tested was lower than the action of alkaloids and peptides studied, while the same participation of opioid receptors was identified. The three different prostate cancer cell lines used in our study were selected in order to have different degree of differentiation and represent different stages of prostate cancer. From our results it seems that opioids receptors are present in more advanced, hormone independent, stages of prostate cancer.

The fact that opioid action in DU-145 and PC3 cells is not completely reversed by diprenorphine, in combination with the absence of opioid receptors in LNCaP cells indicate that their action might not be mediated only through opioid receptors. Therefore, we first tested the possibility for their action to be mediated via other membrane receptor systems, presenting an homology with opioid receptors and secondly by interacting with other systems. A small number of somatostatin receptors were identified only in DU-145 and PC3 cells but opioids did not bind to them. In LNCaP cells,  $\alpha_1$  adrenergic receptors were identified. EKC binds to  $\alpha_1$  adrenergic receptors and part of its inhibitory action is mediated through them.

Moreover, in the hormone dependent LNCaP cells a rapid non genomic action of androgens was observed inducing PSA secretion. This action was mediated via specific membrane binding sites identified in LNCaP cells. The rapid action of testosterone through membrane binding sites results in reorganization of actin cytoskeleton which is responsible for the increase in PSA secretion. Opioids, specifically EKC, inhibit the rapid androgen induced, PSA secretion, probably by interacting with actin cytoskeleton, while long term androgen action is inhibited by opioids probably by reducing the number of androgen membrane binding sites.

Finally, it was found that an alternative way of opioid action could be the system of nitric oxide. Indeed, breast cancer cells produce nitric oxide and opioids inhibit its production by directly interacting with nitric oxide synthase (NOS). Prostate cancer cell lines also produce NO but opioids do not directly affect NOS activity indicating a different mechanism of action.

In parallel, studying the action of different opioids, two new opioid peptides were identified: a)  $\alpha_{s1}$  casomorphine which was derived from the sequence of human  $\alpha_s$  casein and could be released by the action of proteolytic enzymes. It shows a very potent antiproliferative action in prostate and breast cancer cells. Its action is mediated mainly through kappa opioid receptors, binding to them with high affinity and mu opioid receptors. Replacing the carboxylic end of  $\alpha_{s1}$  casomorphine with an amino group resulted in a lower action. b) Receptorphin which also strongly inhibits cell growth via opioid receptors. The significance of this peptide, relies on the fact that its sequence is found on the second transmembrane region of opioid receptors in different species. Possible release of receptorphin after cell death could induce a positive feedback in the action of different factors that cause cell death.

In conclusion, the results of the present study supply evidences for a possible role of opioids in the growth of prostate cancer cells, as well as, a new, more physiologic, approach to the treatment of prostate cancer.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Adams, M. L., E. R. Meyer and T. J. Cicero (1996). "Effects of nitric oxide-related agents on opioid regulation of rat testicular steroidogenesis." Biol Reprod **54**(5): 1128-34.
- Agarwal, S. and A. V. Rao (2000). "Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases." Cmaj **163**(6): 739-44.
- Anderson, N. G., M. T. Powers and S. L. Tollaksen (1982). "Proteins of human milk. I. Identification of major components." Clin Chem **28**: 1045-55.
- Armen, T. A. and C. V. Gay (2000). "Simultaneous detection and functional response of testosterone and estradiol receptors in osteoblast plasma membranes." J Cell Biochem **79**(4): 620-7.
- Aronica, S. M. and B. S. Katzenellenbogen (1993). "Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I." Mol Endocrinol **7**(6): 743-52.
- Aronica, S. M., W. L. Kraus and B. S. Katzenellenbogen (1994). "Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(18): 8517-21.
- Atweh, S. F. and M. J. Kuhar (1977)a. "Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. III. The telencephalon." Brain Res **134**(3): 393-405.
- Atweh, S. F. and M. J. Kuhar (1977)b. "Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. II. The brain stem." Brain Res **129**(1): 1-12.
- Atweh, S. F. and M. J. Kuhar (1977)c. "Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. I. Spinal cord and lower medulla." Brain Res **124**(1): 53-67.
- Atweh, S. F. and M. J. Kuhar (1983). "Distribution and physiological significance of opioid receptors in the brain." Br Med Bull **39**(1): 47-52.
- Aylsworth, C. F., C. A. Hodson and J. Meites (1979). "Opiate antagonists can inhibit mammary tumor growth in rats." Proc Soc Exp Biol Med **161**(1): 18-20.
- Babey, A. M., Y. Kolesnikov, J. Cheng, C. E. Inturrisi, R. R. Trifilletti and G. W. Pasternak (1994). "Nitric oxide and opioid tolerance." Neuropharmacology **33**(11): 1463-70.
- Bagshaw, M. A., R. S. Cox and J. E. Ramback (1990). "Radiation therapy for localized prostate cancer. Justification by long-term follow-up." Urol Clin North Am **17**(4): 787-802.
- Balboni, G., S. Salvadori, R. Guerrini, C. Bianchi, V. Santagada, G. Calliendo, S. D. Bryant and L. H. Lazarus (2000). "Opioid pseudopeptides containing heteroaromatic or heteroaliphatic nuclei." Peptides **21**(11): 1663-71.
- Bare, L. A., E. Mansson and D. Yang (1994). "Expression of two variants of the human mu opioid receptor mRNA in SK-N-SH cells and human brain." FEBS Lett. **354**: 213-216.
- Barjavel, M. J. and H. N. Bhargava (1994). "Effect of opioid receptor agonists on nitric oxide synthase activity in rat cerebral cortex homogenate." Neurosci Lett **181**(1-2): 27-30.
- Barrallo, A., R. Gonzalez-Sarmiento, A. Porteros, M. Garcia-Isidoro and R. E. Rodriguez (1998). "Cloning, molecular characterization, and distribution of a gene homologous to delta opioid receptor from zebrafish (*Danio rerio*)." Biochem. Biophys. Res. Commun. **245**: 544-548.

- Beato, M. and J. Klug (2000). "Steroid hormone receptors: an update." Hum Reprod Update **6**(3): 225-36.
- Becker, J. A., A. Wallace, A. Garzon, P. Ingallinella, E. Bianchi, R. Cortese, F. Simonin, B. L. Kieffer and A. Pessi (1999). "Ligands for kappa-opioid and ORL1 receptors identified from a conformationally constrained peptide combinatorial library." J Biol Chem **274**(39): 27513-22.
- Bentel, J. M., M. A. Pickering, M. Pollard, J. A. Clements and W. D. Tilley (1999). "Androgen receptor expression in primary prostate cancers of Lobund-Wistar rats and in tumor-derived cell lines." In Vitro Cell Dev Biol Anim **35**(10): 655-62.
- Benten, W. P., M. Lieberherr, C. E. Sekeris and F. Wunderlich (1997). "Testosterone induces Ca<sup>2+</sup> influx via non-genomic surface receptors in activated T cells." FEBS Lett **407**(2): 211-4.
- Benten, W. P., M. Lieberherr, O. Stamm, C. Wrehlke, Z. Guo and F. Wunderlich (1999)a. "Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages." Mol Biol Cell **10**(10): 3113-23.
- Benten, W. P., M. Lieberherr, G. Giese, C. Wrehlke, O. Stamm, C. E. Sekeris, H. Mossmann and F. Wunderlich (1999)b. "Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells." Faseb J **13**(1): 123-33.
- Berg, J. M. (1988). "Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(1): 99-102.
- Bergstrom, S., L. Hansson, O. Hernell, B. Lonnerdal, A. K. Nilsson and M. Stromqvist (1992). "Cloning and sequencing of human kappa-casein cDNA." DNA Seq **3**: 245-6.
- Bhat, G. K. Mahesh, V. B., Ping, L., Chorich, L., Wiedmeier, V. T., Brann, D. W. (1998)**  
**"Opioid-glutamate-nitric oxide connection in the regulation of luteinizing hormone secretion in the rat"** Endocrinology **139** (3):955-60.
- Bhargava, H. N., J. T. Bian and S. Kumar (1997)a. "Mechanism of attenuation of morphine antinociception by chronic treatment with L-arginine." J Pharmacol Exp Ther **281**(2): 707-12.
- Bhargava, H. N. and Y. J. Cao (1997)b. "Effect of chronic administration of morphine, U-50, 488H and [D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>]enkephalin on the concentration of cGMP in brain regions and spinal cord of the mouse." Peptides **18**(10): 1629-34.
- Bilfinger, T. V., M. Salzet, C. Fimiani, D. G. Deutsch, G. Tramu and G. B. Stefano (1998). "Pharmacological evidence for anandamide amidase in human cardiac and vascular tissues." Int J Cardiol **64**(Suppl 1): S15-22.
- Bilhartz, D. L., D. J. Tindall and J. E. Oesterling (1991). "Prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase: biomolecular and physiologic characteristics." Urology **38**(2): 95-102.
- Bjork, T., A. Bjartell, P. A. Abrahamsson, S. Hulkko, A. di Sant'Agnese and H. Lilja (1994). "Alpha 1-antichymotrypsin production in PSA-producing cells is common in prostate cancer but rare in benign prostatic hyperplasia." Urology **43**(4): 427-34.
- Boeynaems JM (1984) "Introduction to Mathematical models to hormone receptors and hormone action" In Computers in Endocrinology, edited by Rodbard D, Forti G., Raven Press **14** :101-116.
- Bogdan, C. (2001) "Nitric oxide and the regulation of gene expression" Trends Cell Biol **11** (2) : 66-75.

- Bond, J. S. and P. E. Butler (1987). "Intracellular proteases." Annu Rev Biochem **56**: 333-64.
- Boring, C. C., T. S. Squires and T. Tong (1991). "Cancer statistics, 1991." CA Cancer J Clin **41**(1): 19-36.
- Borski, R. J. (2000). "Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates." Trends Endocrinol Metab **11**(10): 427-36.
- Bostwick, D. G., W. E. Null, D. Holmes, E. Weber, J. D. Barchas and K. G. Bensch (1987). "Expression of opioid peptides in tumors." N Engl J Med **317**(23): 1439-43.
- Bourhim, N., P. Cantau, P. Giraud and E. Castanas (1993). "Comparative thermodynamics of opioid receptor ligand interaction in the bovine adrenal medulla membranes--evidence of opioid site heterogeneity." Comp Biochem Physiol C **105**(3): 435-42.
- Bradford, M. M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" Anal Biochem **72** :248-54.
- Brann, D. W., L. B. Hendry and V. B. Mahesh (1995). "Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones." J Steroid Biochem Mol Biol **52**(2): 113-33.
- Brantl, V., H. Teschemacher, A. Henschen and F. Lottspeich (1979). "Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **360**(9): 1211-6.
- Brantl, V. (1984). "Novel opioid peptides derived from human beta-casein: human beta-casomorphins." Eur J Pharmacol **106**(1): 213-4.
- Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1990). "Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(2): 682-5.
- Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1994). "Nitric oxide: a physiologic messenger molecule" Annu Rev Biochem **63**: 175-95.
- Brennan, P. A. (2000) "The actions and interactions of nitric oxide in solid tumours" Eur J Surg Oncol **26** (5):434-7
- Brignon, G., A. Chtourou and B. Ribadeau-Dumas (1985). "Preparation and amino acid sequence of human kappa-casein." FEBS Lett **188**: 48-54.
- Budziszewska, B., M. Leskiewicz, L. Jaworska-Feil and W. Lason (1999). "The effect of N-nitro-L-arginine methyl ester on morphine-induced changes in the plasma corticosterone and testosterone levels in mice." Exp Clin Endocrinol Diabetes **107**(1): 75-9.
- Bunzow, J. R., C. Saez, M. Mortrud, C. Bouvier, J. T. Williams, M. Low and D. K. Grandy (1994). "Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type." FEBS Lett **347**(2-3): 284-8.
- Bunzow, J. R., G. Zhang, C. Bouvier, C. Saez, O. K. Ronnekleiv, M. J. Kelly and D. K. Grandy (1995). "Characterization and distribution of a cloned rat mu-opioid receptor." J. Neurochem. **64**: 14-24.
- Bylund, D. B. and J. R. Martinez (1980). "alpha 2-Adrenergic receptors appear in rat salivary glands after reserpine treatment." Nature **285**(5762): 229-30.
- Cantiello, H. F., C. Patenaude and K. Zaner (1991)a. "Osmotically induced electrical signals from actin filaments." Biophys J **59**(6): 1284-9.
- Cantiello, H. F., J. L. Stow, A. G. Prat and D. A. Ausiello (1991)b. "Actin filaments regulate epithelial Na<sup>+</sup> channel activity." Am J Physiol **261**(5 Pt 1): C882-8.

- Cantiello, H. F., A. G. Prat, J. V. Bonventre, C. C. Cunningham, J. H. Hartwig and D. A. Ausiello (1993). "Actin-binding protein contributes to cell volume regulatory ion channel activation in melanoma cells." J Biol Chem **268**(7): 4596-9.
- Carter, B. S., H. B. Carter and J. T. Isaacs (1990)a. "Epidemiologic evidence regarding predisposing factors to prostate cancer." Prostate **16**(3): 187-97.
- Carter, H. B. and D. S. Coffey (1990)b. "The prostate: an increasing medical problem." Prostate **16**(1): 39-48.
- Carter, H. B., S. Piantadosi and J. T. Isaacs (1990)c. "Clinical evidence for and implications of the multistep development of prostate cancer." J Urol **143**(4): 742-6.
- Castanas, E., P. Giraud, N. Bourhim, P. Cantau and C. Oliver (1984)a. "Kappa 3: a novel subtype of the kappa opioid site in bovine adrenal medulla, highly selective for Met-enkephalin-Arg6-Phe7." Neuropeptides **5**(1-3): 133-6.
- Castanas, E., P. Giraud, R. Drissi, P. E. Chabrier, B. Conte-Devolx, F. Boudouresque, P. Cantau, F. Cesselin, A. Cupo, L. E. Eiden and et al. (1984)b. "Characterization of enkephalins and related peptides in rat hypophysial portal blood." Brain Res **310**(1): 1-6.
- Castanas, E., N. Bourhim, P. Giraud, F. Boudouresque, P. Cantau and C. Oliver (1985)a. "Interaction of opiates with opioid binding sites in the bovine adrenal medulla: I. Interaction with delta and mu sites." J Neurochem **45**(3): 677-87.
- Castanas, E., N. Bourhim, P. Giraud, F. Boudouresque, P. Cantau and C. Oliver (1985)b. "Interaction of opiates with opioid binding sites in the bovine adrenal medulla: II. Interaction with kappa sites." J Neurochem **45**(3): 688-99.
- Castles, C. G., S. A. Fuqua, D. M. Klotz and S. M. Hill (1993). "Expression of a constitutively active estrogen receptor variant in the estrogen receptor-negative BT-20 human breast cancer cell line." Cancer Res **53**(24): 5934-9.
- Catalona, W. J. (1986). Carcinoma of the prostate. Cambell's Urology. P. C. Walsh. Philadelphia, WB Saunders: 1463-1534.
- Catalona, W. J., A. W. Partin, K. M. Slawin, M. K. Brawer, R. C. Flanigan, A. Patel, J. P. Richie, J. B. deKernion, P. C. Walsh, P. T. Scardino, P. H. Lange, E. N. Subong, R. E. Parson, G. H. Gasiar, K. G. Loveland and P. C. Southwick (1998). "Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial." Jama **279**(19): 1542-7.
- Chamberlain, N. L., E. D. Driver and R. L. Miesfeld (1994). "The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function." Nucleic Acids Res **22**(15): 3181-6.
- Chang, C., J. L. Bowman, A. W. DeJohn, E. S. Lander and E. M. Meyerowitz (1988). "Restriction fragment length polymorphism linkage map for Arabidopsis thaliana." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(18): 6856-60.
- Chang, K. J. and P. Cuatrecasas (1979). "Multiple opiate receptors. Enkephalins and morphine bind to receptors of different specificity." J Biol Chem **254**(8): 2610-8.
- Chang, K. J., A. Lillian, E. Hazum, P. Cuatrecasas and J. K. Chang (1981). "Morphiceptin (NH<sub>4</sub>-tyr-pro-phe-pro-COHN<sub>2</sub>): a potent and specific agonist for morphine (mu) receptors." Science **212**(4490): 75-7.
- Chen, Y., A. Mestek, J. Liu, J. A. Hurley and L. Yu (1993). "Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain." Mol Pharmacol **44**(1): 8-12.

- Chen, Y., Y. Fan, J. Liu, A. Mestek, M. Tian, C. A. Kozak and L. Yu (1994). "Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family." FEBS Lett **347**: 279-283.
- Cheng, J., K. M. Standifer, P. R. Tublin, W. Su and G. W. Pasternak (1995). "Demonstration of kappa 3-opioid receptors in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line." J Neurochem **65**(1): 170-5.
- Childers, S. R. (1991). "Opioid receptor-coupled second messenger systems." Life Sci **48**(21): 1991-2003.
- Ching, K. Z., E. Ramsey, N. Pettigrew, R. D'Cunha, M. Jason and J. G. Dodd (1993). "Expression of mRNA for epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and their receptor in human prostate tissue and cell lines." Mol Cell Biochem **126**(2): 151-8.
- Chobert, J. M., J. C. Mercier, C. Bahy and G. Haze (1976). "[Primary structure of the casein macropeptide of porcine and human kappa caseins." FEBS Lett **72**:173-8.
- Christ, M., K. Haseroth, E. Falkenstein and M. Wehling (1999). "Nongenomic steroid actions: fact or fantasy?" Vitam Horm **57**: 325-73.
- Chtourou, A., G. Brignon and B. Ribadeau-Dumas (1985). "Quantification of beta-casein in human milk." J Dairy Res **52**(2): 239-47.
- Civelli O., J. Douglass, A. Goldstein and E. Herbert (1985). "Sequence and expression of the rat prodynorphin gene." Proc Natl Acad Sci U S A **82**: 4291-5.
- Clements, J. and A. Mukhtar (1994). "Glandular kallikreins and prostate-specific antigen are expressed in the human endometrium." J Clin Endocrinol Metab **78**(6): 1536-9.
- Cohen, P., H. C. Graves, D. M. Peehl, M. Kamarei, L. C. Giudice and R. G. Rosenfeld (1992). "Prostate-specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma." J Clin Endocrinol Metab **75**(4): 1046-53.
- Cohen, P., D. M. Peehl, H. C. Graves and R. G. Rosenfeld (1994). "Biological effects of prostate specific antigen as an insulin-like growth factor binding protein-3 protease." J Endocrinol **142**(3): 407-15.
- Colasanti, M. and H. Suzuki (2000). "The dual personality of NO." Trends Pharmacol Sci **21**(7): 249-52.
- Connolly, J. M. and D. P. Rose (1989). "Secretion of epidermal growth factor and related polypeptides by the DU 145 human prostate cancer cell line." Prostate **15**(2): 177-86.
- Connolly, J. M. and D. P. Rose (1991). "Autocrine regulation of DU145 human prostate cancer cell growth by epidermal growth factor-related polypeptides." Prostate **19**(2): 173-80.
- Cooner, W. H., Mosley, B. R., Rutherford, C. L., Jr., Beard, J. H., Pond, H. S., Terry, W. J., Igel, T. C., Kidd, D. D. (1990) "Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen" J Urol **143** (6): 1146-54.
- Cox, M. E., P. D. Deeble, S. Lakhani and S. J. Parsons (1999). "Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression." Cancer Res **59**(15): 3821-30.
- Culig, Z., A. Hobisch, M. V. Cronauer, C. Radmayr, J. Trapman, A. Hittmair, G. Bartsch and H. Klocker (1994). "Androgen receptor activation in prostatic



- tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor." Cancer Res **54**(20): 5474-8.
- Cunha, G. R., A. A. Donjacour, P. S. Cooke, S. Mee, R. M. Bigsby, S. J. Higgins and Y. Sugimura (1987). "The endocrinology and developmental biology of the prostate." Endocr Rev **8**(3): 338-62.
- Daniel, H., M. Vohwinkel and G. Rehner (1990). "Effect of casein and beta-casomorphins on gastrointestinal motility in rats." J Nutr **120**(3): 252-7.
- Davis, P. J. and F. B. Davis (1996). "Nongenomic actions of thyroid hormone." Thyroid **6**(5): 497-504.
- de Jong, F. H., K. Oishi, R. B. Hayes, J. F. Bogdanowicz, J. W. Raatgever, P. J. van der Maas, O. Yoshida and F. H. Schroeder (1991). "Peripheral hormone levels in controls and patients with prostatic cancer or benign prostatic hyperplasia: results from the Dutch-Japanese case-control study." Cancer Res **51**(13): 3445-50.
- Delaet, N. G., P. M. Verheyden, D. Tourwe, G. Van Binst, P. Davis and T. F. Burks (1992). "Morphiceptin and beta-casomorphin-5 analogues containing a reduced peptide bond: selective mu-receptor agonists and a novel mu antagonist, H-Tyr-Pro psi (CH<sub>2</sub>-NH)Phe-Pro-Gly-OH." Biopolymers **32**(8): 957-69.
- Denizot, F. and Lang, R. "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability" (1986) J Immunol Methods **89** (2):271-217.
- Denner, L. A., N. L. Weigel, B. L. Maxwell, W. T. Schrader and B. W. O'Malley (1990). "Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation." Science **250**(4988): 1740-3.
- Dermitzaki, E., A. Gravanis, M. Venihaki, C. Stournaras and A. N. Margioris (2001). "Opioids suppress basal and nicotine-induced catecholamine secretion via a stabilizing effect on actin filaments." Endocrinology **142**(5): 2022-31.
- Di Domenico, M., G. Castoria, A. Bilancio, A. Migliaccio and F. Auricchio (1996). "Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth." Cancer Res **56**(19): 4516-21.
- Diamandis, E. P. and H. Yu (1995). "Prostate-specific antigen and lack of specificity for prostate cells." Lancet **345**(8958): 1186.
- Diez, A., M. J. Sancho, M. Egana, M. Trueba, A. Marino and J. M. Macarulla (1984). "An interaction of testosterone with cell membranes." Horm Metab Res **16**(9): 475-7.
- Ding, V. D., D. E. Moller, W. P. Feeney, V. Didolkar, A. M. Nakhla, L. Rhodes, W. Rosner and R. G. Smith (1998)a. "Sex hormone-binding globulin mediates prostate androgen receptor action via a novel signaling pathway." Endocrinology **139**(1): 213-8.
- Ding, Y. Q., J. L. Li, B. Z. Lu, D. Wang, M. L. Zhang and J. S. Li (1998)d. "Co-localization of mu-opioid receptor-like immunoreactivity with substance P-LI, calcitonin gene-related peptide-LI and nitric oxide synthase-LI in vagal and glossopharyngeal afferent neurons of the rat." Brain Res **792**(1): 149-53.
- Drouin, J., M. Chamberland, J. Charron, L. Jeannotte and M. Nemer (1985). "Structure of the rat pro-opiomelanocortin (POMC) gene." FEBS Lett **193**(1): 54-8.
- Edwards, A., H. A. Hammond, L. Jin, C. T. Caskey and R. Chakraborty (1992). "Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups." Genomics **12**: 241-53.

- Eipper, B. A. and R. E. Mains (1980). "Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphin and related peptides." Endocr Rev **1**(1): 1-27.
- Eppler, C. M., J. D. Hulmes, J. B. Wang, B. Johnson, M. Corbett, D. R. Luthin, G. R. Uhl and J. Linden (1993). "Purification and partial amino acid sequence of a mu opioid receptor from rat brain." J. Biol. Chem. **268**: 26447-26451.
- Ermisch, A. (1992). "Peptide receptors of the blood-brain barrier and substrate transport into the brain." Prog Brain Res **91**: 155-61.
- Evans, R. M. (1988). "The steroid and thyroid hormone receptor superfamily." Science **240**(4854): 889-95.
- Falkenstein, E., H. C. Tillmann, M. Christ, M. Feuring and M. Wehling (2000). "Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects." Pharmacol Rev **52**(4): 513-56.
- Faulstich, H., H. Trischmann and D. Mayer (1983). "Preparation of tetramethylrhodaminyl-phalloidin and uptake of the toxin into short-term cultured hepatocytes by endocytosis." Exp Cell Res **144**(1): 73-82.
- Faure, C., C. Pimoule, G. Vallancien, S. Z. Langer and D. Graham (1994). "Identification of alpha 1-adrenoceptor subtypes present in the human prostate." Life Sci **54**(21): 1595-605.
- Felden, F., B. Leheup, S. Fremont, R. Bouguerne, M. Egloff, J. P. Nicolas, G. Grignon and J. L. Gueant (1992). "The plasma membrane of epididymal epithelial cells has a specific receptor which binds to androgen-binding protein and sex steroid-binding protein." J Steroid Biochem Mol Biol **42**(3-4): 279-85.
- Fleminger, G., E. Ezra, D. L. Kilpatrick and S. Udenfriend (1983). "Processing of enkephalin-containing peptides in isolated bovine adrenal chromaffin granules." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(20): 6418-21.
- Fleshner, N. E. and Klotz, L. H. "Diet, androgens, oxidative stress and prostate cancer susceptibility"(1998) Cancer Metastasis Rev **17** (4) 325-330.
- Fleshner, N. E. O'Sullivan, M. Premdass, C. Fair, W. Rb "Clinical significance of small (less than 0.2 cm<sup>3</sup>) hypoechoic lesions in men with normal digital rectal examinations and prostate-specific antigen levels less than 10 ng/mL" Urology **53** (2) :356-58
- Fleshner, N. E. and O. Kucuk (2001). "Antioxidant dietary supplements: Rationale and current status as chemopreventive agents for prostate cancer." Urology **57**(4 Suppl 1): 90-4.
- Fukuda, K., S. Kato, K. Mori, M. Nishi and H. Takeshima (1993). "Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor delta- and mu-subtypes." FEBS Lett. **327**: 311-314.
- Fukuda, K., S. Kato, K. Mori, M. Nishi, H. Takeshima, N. Iwabe, T. Miyata, T. Houtani and T. Sugimoto (1994). "cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family." FEBS Lett. **343**: 42-46.
- Fuller, C. M., R. J. Bridges and D. J. Benos (1994). "Forskolin- but not ionomycin-evoked Cl<sup>-</sup> secretion in colonic epithelia depends on intact microtubules." Am J Physiol **266**(3 Pt 1): C661-8.
- Fuqua, S. A., S. M. Hill, G. C. Chamness, M. G. Benedix, G. L. Greene, B. W. O'Malley and W. L. McGuire (1991). "Progesterone receptor gene restriction fragment length polymorphisms in human breast tumors." J Natl Cancer Inst **83**(16): 1157-60.
- Garnick, M. B. (1986). "Leuprolide versus diethylstilbestrol for previously untreated stage D2 prostate cancer. Results of a prospectively randomized trial." Urology **27**(1 Suppl): 21-8.

- Gaudriault, G., D. Nouel, C. Dal Farra, A. Beudet and J. P. Vincent (1997). "Receptor-induced internalization of selective peptidic mu and delta opioid ligands." J Biol Chem **272**(5): 2880-8.
- Geller, J., J. Albert and A. Vik (1988). "Advantages of total androgen blockade in the treatment of advanced prostate cancer." Semin Oncol **15**(2 Suppl 1): 53-61.
- Giovannucci, E., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Ascherio, A. Chute, C. C., Willett, W. C. (1993) " A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer" J Natl Cancer Inst **85** (19): 1571-9.
- Giovannucci, E. (1999) "Nutritional factors in human cancers" Adv Exp Med Biol **472** :29-42.
- Gkonos, P. J., A. Krongrad and B. A. Roos (1995). "Neuroendocrine peptides in the prostate." Urol Res **23**(2): 81-7.
- Goldstein, A. and A. Naidu (1989). "Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding site signatures." Mol Pharmacol **36**(2): 265-72.
- Gorczyńska, E. and D. J. Handelsman (1995). "Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells." Endocrinology **136**(5): 2052-9.
- Gorodeski, G. I. (1998)a. "Estrogen increases the permeability of the cultured human cervical epithelium by modulating cell deformability." Am J Physiol **275**(3 Pt 1): C888-99.
- Gravanis, A., C. Stournaras and A. N. Margioris (1999). "Paracrinology of endometrial neuropeptides: corticotropin-releasing hormone and opioids." Semin Reprod Endocrinol **17**(1): 29-38.
- Grazzini, E., G. Guillon, B. Mouillac and H. H. Zingg (1998). "Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone." Nature **392**(6675): 509-12.
- Greenberg, R., M. L. Groves and H. J. Dower (1984). "Human beta-casein. Amino acid sequence and identification of phosphorylation sites." J Biol Chem **259**(8): 5132-8.
- Gu, J., J. M. Polak, L. Probert, K. N. Islam, P. J. Marangos, S. Mina, T. E. Adrian, G. P. McGregor, D. J. O'Shaughnessy and S. R. Bloom (1983). "Peptidergic innervation of the human male genital tract." J Urol **130**(2): 386-91.
- Halford, W. P., B. M. Gebhardt and D. J. Carr (1995). "Functional role and sequence analysis of a lymphocyte orphan opioid receptor." J Neuroimmunol **59**(1-2): 91-101.
- Hamm, H. E. (1998). "The many faces of G protein signaling." J Biol Chem **273**(2): 669-72.
- Hansson, L., A. Edlund, T. Johansson, O. Hernell, M. Stromqvist, S. Lindquist, B. Lonnerdal and S. Bergstrom (1994). "Structure of the human beta-casein encoding gene." Gene **139**:193-9.
- Harper, M. E., A. Pike, W. B. Peeling and K. Griffiths (1974). "Steroids of adrenal origin metabolized by human prostatic tissue both in vivo and in vitro." J Endocrinol **60**(1): 117-25.
- Hatzoglou, A., S. Romain, H. Dalapascha and E. Castanas (1994). "Acidification reveals a greater number of epidermal growth factor receptors in human placental and breast cancer membranes." Clin Chim Acta **227**(1-2): 97-109.
- Hatzoglou, A., L. Ouafik, E. Bakogeorgou, K. Thermos and E. Castanas (1995)a. "Morphine cross-reacts with somatostatin receptor SSTR2 in the T47D human breast cancer cell line and decreases cell growth." Cancer Res **55**(23): 5632-6.

- Hatzoglou, A., A. Gravanis, A. N. Margioris, E. Zoumakis and E. Castanas (1995)b. "Identification and characterization of opioid-binding sites present in the Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cell line." J Clin Endocrinol Metab **80**(2): 418-23.
- Hatzoglou, A., E. Bakogeorgou, C. Hatzoglou, P. M. Martin and E. Castanas (1996)a. "Antiproliferative and receptor binding properties of alpha- and beta-casomorphins in the T47D human breast cancer cell line." Eur J Pharmacol **310**(2-3): 217-23.
- Hatzoglou, A., E. Bakogeorgou, E. Papakonstanti, C. Stournaras, D. S. Emmanouel and E. Castanas (1996)b. "Identification and characterization of opioid and somatostatin binding sites in the opossum kidney (OK) cell line and their effect on growth." J Cell Biochem **63**(4): 410-21.
- Hatzoglou, A., E. Bakogeorgou and E. Castanas (1996)c. "The antiproliferative effect of opioid receptor agonists on the T47D human breast cancer cell line, is partially mediated through opioid receptors." Eur J Pharmacol **296**(2): 199-207.
- Hayes, H., E. Petit, C. Bouniol and P. Popescu (1993). "Localization of the alpha-S2-casein gene (CASAS2) to the homoeologous cattle, sheep, and goat chromosomes 4 by in situ hybridization." Cytogenet Cell Genet **64**: 281-5.
- Hemmick, L. M. and J. M. Bidlack (1990). "Beta-endorphin stimulates rat T lymphocyte proliferation." J Neuroimmunol **29**(1-3): 239-48.
- Henttu, P., O. Lukkarinen and P. Vihko (1990). "Expression of the gene coding for human prostate-specific antigen and related hGK-1 in benign and malignant tumors of the human prostate." Int J Cancer **45**(4): 654-60.
- Hesketh, J. E. and I. F. Pryme (1991). "Interaction between mRNA, ribosomes and the cytoskeleton." Biochem J **277**(Pt 1): 1-10.
- Hofer, D. R., E. R. Sherwood, W. D. Bromberg, J. Mendelsohn, C. Lee and J. M. Kozlowski (1991). "Autonomous growth of androgen-independent human prostatic carcinoma cells: role of transforming growth factor alpha." Cancer Res **51**(11): 2780-5.
- Hollt, V. (1983). Receptor selectivities of the three opioid peptide families. Biochemical and Clinical Aspects of neuropeptide synthesis, Processing and Gene structure. G. Koch. New York, Academic: 250.
- Horoszewicz, J. S., S. S. Leong, E. Kawinski, J. P. Karr, H. Rosenthal, T. M. Chu, E. A. Mirand and G. P. Murphy (1983). "LNCaP model of human prostatic carcinoma." Cancer Res **43**(4): 1809-18.
- Hughes, J. and H. W. Kosterlitz (1983). "Opioid Peptides: introduction." Br Med Bull **39**(1): 1-3.
- Ilyinsky, O. B., M. V. Kozlova, E. S. Kondrikova, V. U. Kalentchuk, M. I. Titov and Z. D. Bepalova (1987). "Effects of opioid peptides and naloxone on nervous tissue in culture." Neuroscience **22**(2): 719-35.
- Ip, M. M., R. J. Milholland and F. Rosen (1980). "Functionality of estrogen receptor and tamoxifen treatment of R3327 Dunning rat prostate adenocarcinoma." Cancer Res **40**(7): 2188-93.
- Isayama, T. and I. S. Zagon (1991). "Localization of preproenkephalin A mRNA in the neonatal rat retina." Brain Res Bull **27**(6): 805-8.
- Iwamura, M., P. M. Sluss, J. B. Casamento and A. T. Cockett (1993). "Insulin-like growth factor I: action and receptor characterization in human prostate cancer cell lines." Prostate **22**(3): 243-52.

- Jen, P. Y. and J. S. Dixon (1995). "Development of peptide-containing nerves in the human fetal prostate gland." J Anat **187**(Pt 1): 169-79.
- Jenster, G., H. A. van der Korput, C. van Vroonhoven, T. H. van der Kwast, J. Trapman and A. O. Brinkmann (1991). "Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization." Mol Endocrinol **5**(10): 1396-404.
- Jessen, F. and E. K. Hoffmann (1992). "Activation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransport system by reorganization of the actin filaments in Ehrlich ascites tumor cells." Biochim Biophys Acta **1110**(2): 199-201.
- Johnsen, L. B., L. K. Rasmussen, T. E. Petersen and L. Berglund (1995). "Characterization of three types of human alpha s1-casein mRNA transcripts." Biochem J **309**: 237-42.
- Johnson, N., R. Houghten and G. W. Pasternak (1982). "Binding of 3H-beta-endorphin in rat brain." Life Sci **31**(12-13): 1381-4.
- Jordan, B. A., S. Cvejic and L. A. Devi (2000). "Kappa opioid receptor endocytosis by dynorphin peptides." DNA Cell Biol **19**(1): 19-27.
- Juarranz, M. G., G. Bodega, J. C. Prieto and L. G. Guijarro (2001). "Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates rat prostatic epithelial cell proliferation." Prostate **47**(4): 285-92.
- Kaighn, M. E., K. S. Narayan, Y. Ohnuki, J. F. Lechner and L. W. Jones (1979). "Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)." Invest Urol **17**(1): 16-23.
- Kallioniemi, O. P., Visakorpi, T. (1996) "Genetic basis and clonal evolution of human prostate cancer" Adv Cancer Res **68**:225-255.
- Kampa, M., A. Hatzoglou, G. Notas, A. Damianaki, E. Bakogeorgou, C. Gemetzi, E. Kouroumalis, P. M. Martin and E. Castanas (2000). "Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines." Nutr Cancer **37**(2): 223-33.
- Kapusta, D. R., S. Y. Jones and G. F. DiBona (1989). "Opioids in the systemic hemodynamic and renal responses to stress in spontaneously hypertensive rats." Hypertension **13**(6 Pt 2): 808-16.
- Kapusta, D. R. and J. C. Obih (1993). "Central kappa opioid receptor-evoked changes in renal function in conscious rats: participation of renal nerves." J Pharmacol Exp Ther **267**(1): 197-204.
- Kapusta, D. R. (1995). "Opioid mechanisms controlling renal function." Clin Exp Pharmacol Physiol **22**(12): 891-902.
- Kazemi-Esfarjani, P., M. A. Trifiro and L. Pinsky (1995). "Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG)<sub>n</sub>-expanded neuronopathies." Hum Mol Genet **4**(4): 523-7.
- Kazmi, S. M. and R. K. Mishra (1987). "Comparative pharmacological properties and functional coupling of mu and delta opioid receptor sites in human neuroblastoma SH-SY5Y cells." Mol Pharmacol **32**(1): 109-18.
- Kieffer, B. L., K. Befort, C. Gaveriaux-Ruff and C. G. Hirth (1992). "The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 12048-52.
- Kikuchi, Y., T. Kita, M. Miyauchi, I. Kizawa, K. Oomori and K. Kato (1987)a. "Effects of naloxone on human ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo." Jpn J Cancer Res **78**(5): 519-25.

- Kikuchi, Y., K. Oomori, I. Kizawa, J. Hirata, T. Kita, M. Miyauchi and K. Kato (1987)b. "Enhancement of antineoplastic effects of cisplatin by calmodulin antagonists in nude mice bearing human ovarian carcinoma." Cancer Res **47**(24 Pt 1): 6459-61.
- Kikuchi, Y., T. Kita, M. Miyauchi, I. Iwano and K. Kato (1989). "Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation in vitro by neuroendocrine hormones." Gynecol Oncol **32**(1): 60-4.
- Kiley, S. C., P. J. Parker, D. Fabbro and S. Jaken (1992). "Hormone- and phorbol ester-activated protein kinase C isozymes mediate a reorganization of the actin cytoskeleton associated with prolactin secretion in GH4C1 cells." Mol Endocrinol **6**(1): 120-31.
- Killian, C. S., D. A. Corral, E. Kawinski and R. I. Constantine (1993). "Mitogenic response of osteoblast cells to prostate-specific antigen suggests an activation of latent TGF-beta and a proteolytic modulation of cell adhesion receptors." Biochem Biophys Res Commun **192**(2): 940-7.
- Kirkeeide, E. K., I. F. Pryme and A. Vedeler (1993). "Microfilaments and protein synthesis; effects of insulin." Int J Biochem **25**(6): 853-64.
- Knapp, R. J., E. Malatynska, L. Fang, X. Li, E. Babin, M. Nguyen, G. Santoro, E. V. Varga, V. J. Hruby, W. R. Roeske and e. al. (1994). "Identification of a human delta opioid receptor: cloning and expression." Life Sci **54**: PL463-PL469.
- Ko, J. L., U. Arvidsson, F. G. Williams, P. Y. Law, R. Elde and H. H. Loh (1999). "Visualization of time-dependent redistribution of delta-opioid receptors in neuronal cells during prolonged agonist exposure." Brain Res Mol Brain Res **69**(2): 171-85.
- Kobayashi, S., R. Tang, E. Shapiro and H. Lepor (1993). "Characterization and localization of prostatic alpha 1 adrenoceptors using radioligand receptor binding on slide-mounted tissue section." J Urol **150**(6): 2002-6.
- Koch, G., K. Wiedemann, E. Drebes, W. Zimmermann, G. Link and H. Teschemacher (1988). "Human beta-casomorphin-8 immunoreactive material in the plasma of women during pregnancy and after delivery." Regul Pept **20**(2): 107-17.
- Kojima, H., N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata and T. Nagano (1998). "Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins." Anal Chem **70**(13): 2446-53.
- Kokontis, J., K. Ito, R. A. Hiipakka and S. Liao (1991). "Expression and function of normal and LNCaP androgen receptors in androgen-insensitive human prostatic cancer cells. Altered hormone and antihormone specificity in gene transactivation." Receptor **1**(4): 271-9.
- Kong, H., K. Raynor, K. Yasuda, S. T. Moe, P. S. Portoghese, G. I. Bell and T. Reisine (1993). "A single residue, aspartic acid 95, in the delta opioid receptor specifies selective high affinity agonist binding." J Biol Chem **268**(31): 23055-8.
- Konoplya, E. F. and E. H. Popoff (1992). "Identification of the classical androgen receptor in male rat liver and prostate cell plasma membranes." Int J Biochem **24**(12): 1979-83.
- Kopec, K. K. and R. T. Carroll (2000). "Phagocytosis is regulated by nitric oxide in murine microglia." Nitric Oxide **4**(2): 103-11.
- Kotake-Nara, E., M. Kushiro, H. Zhang, T. Sugawara, K. Miyashita and A. Nagao (2001). "Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells." J Nutr **131**(12): 3303-6.

- Koukouritaki, S. B., P. A. Theodoropoulos, A. N. Margioris, A. Gravanis and C. Stournaras (1996). "Dexamethasone alters rapidly actin polymerization dynamics in human endometrial cells: evidence for nongenomic actions involving cAMP turnover." J Cell Biochem **62**(2): 251-61.
- Koukouritaki, S. B., A. N. Margioris, A. Gravanis, R. Hartig and C. Stournaras (1997). "Dexamethasone induces rapid actin assembly in human endometrial cells without affecting its synthesis." J Cell Biochem **65**(4): 492-500.
- Krieger D.T. (1984). Pro-opiomelanocortin -derived peptides in the rodent male reproductive tract. Opioid modulation of Endocrine function. NewYork, Raven.
- Kumar, M. V. and D. J. Tindall (1998). "Transcriptional regulation of the steroid receptor genes." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **59**: 289-306.
- Kunz, C. and B. Lonnerdal (1990). "Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods." Am J Clin Nutr **51**(1): 37-46.
- Kyprianou, N. and C. M. Benning (2000). "Suppression of human prostate cancer cell growth by alpha1-adrenoceptor antagonists doxazosin and terazosin via induction of apoptosis." Cancer Res **60**(16): 4550-5.
- La Spada, A. R., E. M. Wilson, D. B. Lubahn, A. E. Harding and K. H. Fischbeck (1991). "Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy." Nature **352**: 77-9.
- Labrie, F., I. Luthy, R. Veilleux, J. Simard, A. Belanger and A. Dupont (1987). "New concepts on the androgen sensitivity of prostate cancer." Prog Clin Biol Res **243A**: 145-72.
- Labrie, F. (1991). "Endocrine therapy for prostate cancer." Endocrinol Metab Clin North Am **20**(4): 845-72.
- Lachowicz, J. E., Y. Shen, F. J. J. Monsma and D. R. Sibley (1995). "Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family." J. Neurochem. **64**: 34-40.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.
- Law, P. Y., H. H. Loh and C. H. Li (1979). "Properties and localization of beta-endorphin receptor in rat brain." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(11): 5455-9.
- Law, P. Y., D. S. Hom and H. H. Loh (1983). "Opiate regulation of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate level in neuroblastoma X glioma NG108-15 hybrid cells. Relationship between receptor occupancy and effect." Mol Pharmacol **23**(1): 26-35.
- Law, P. Y., D. S. Hom and H. H. Loh (1984). "Down-regulation of opiate receptor in neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells. Chloroquine promotes accumulation of tritiated enkephalin in the lysosomes." J Biol Chem **259**(7): 4096-104.
- Lawrence, D. M. and J. M. Bidlack (1993). "The kappa opioid receptor expressed on the mouse R1.1 thymoma cell line is coupled to adenylyl cyclase through a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein." J Pharmacol Exp Ther **266**(3): 1678-83.
- Lee, S., C. R. Rosenberg and J. M. Musacchio (1988). "Cross-dependence to opioid and alpha 2-adrenergic receptor agonists in NG108-15 cells." Faseb J **2**(1): 52-5.
- Leonard, J. L. and A. P. Farwell (1997). "Thyroid hormone-regulated actin polymerization in brain." Thyroid **7**(1): 147-51.

- Lepor, H., M. Baumann and E. Shapiro (1990). "Binding and functional properties of doxazosin in the human prostate adenoma and canine brain." Prostate **16**(1): 29-38.
- Leung, G. P., S. B. Cheng-Chew and P. Y. Wong (2001). "Nongenomic effect of testosterone on chloride secretion in cultured rat efferent duct epithelia." Am J Physiol Cell Physiol **280**(5): C1160-7.
- Lewis, J. W., Y. Shavit, G. W. Terman, L. R. Nelson, R. P. Gale and J. C. Liebeskind (1983). "Apparent involvement of opioid peptides in stress-induced enhancement of tumor growth." Peptides **4**(5): 635-8.
- Li, J. G., L. Y. Luo, J. G. Krupnick, J. L. Benovic and L. Y. Liu-Chen (1999). "U50,488H-induced internalization of the human kappa opioid receptor involves a beta-arrestin- and dynamin-dependent mechanism. Kappa receptor internalization is not required for mitogen-activated protein kinase activation." J Biol Chem **274**(17): 12087-94.
- Lieberherr, M. and B. Grosse (1994). "Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein." J Biol Chem **269**(10): 7217-23.
- Lilja, H., A. Christensson, U. Dahlen, M. T. Matikainen, O. Nilsson, K. Pettersson and T. Lovgren (1991). "Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin." Clin Chem **37**(9): 1618-25.
- Lilja, H. (1993). "Structure, function, and regulation of the enzyme activity of prostate-specific antigen." World J Urol **11**(4): 188-91.
- Limbird (1996). Cell Surface Receptors: a short course on theory and methods, Kluwer Academic.
- Loh, Y. P., M. J. Brownstein and H. Gainer (1984). "Proteolysis in neuropeptide processing and other neural functions." Annu Rev Neurosci **7**: 189-222.
- Lonnerdal, B. (1985). "Biochemistry and physiological function of human milk proteins." Am J Clin Nutr **42**: 1299-317.
- Lord, J. A., A. A. Waterfield, J. Hughes and H. W. Kosterlitz (1977). "Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors." Nature **267**(5611): 495-9.
- Lottspeich, F., A. Henschen, V. Brantl and H. Teschemacher (1980). "Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). III. Synthetic peptides corresponding to components from bovine casein peptone." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **361**(12): 1835-9.
- Loukas, S., D. Varoucha, C. Zioudrou, R. A. Streaty and W. A. Klee (1983). "Opioid activities and structures of alpha-casein-derived exorphins." Biochemistry **22**(19): 4567-73.
- Lubahn, D. B., D. R. Joseph, P. M. Sullivan, H. F. Willard, F. S. French and E. M. Wilson (1988). "Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome." Science **240**: 327-30.
- Lue, W. M., M. T. Su, W. B. Lin and P. L. Tao (1999). "The role of nitric oxide in the development of morphine tolerance in rat hippocampal slices." Eur J Pharmacol **383**(2): 129-35.
- Luke, M. C. and D. S. Coffey (1994). "Human androgen receptor binding to the androgen response element of prostate specific antigen." J Androl **15**(1): 41-51.
- Lundwall, A. and H. Lilja (1987). "Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA." FEBS Lett **214**(2): 317-22.



- MacLean-Fletcher, S. and T. D. Pollard (1980). "Mechanism of action of cytochalasin B on actin." Cell **20**(2): 329-41.
- Mahe, S., D. Tome, A. M. Dumontier and J. F. Desjeux (1989). "Absorption of intact beta-casomorphins (beta-CM) in rabbit ileum in vitro." Reprod Nutr Dev **29**(6): 725-33.
- Majeed, N. H., B. Przewlocka, H. Machelska and R. Przewlocki (1994). "Inhibition of nitric oxide synthase attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice." Neuropharmacology **33**(2): 189-92.
- Makman, M. H. (1994). "Morphine receptors in immunocytes and neurons." Adv Neuroimmunol **4**(2): 69-82.
- Maneckjee, R., R. Biswas and B. K. Vonderhaar (1990)a. "Binding of opioids to human MCF-7 breast cancer cells and their effects on growth." Cancer Res **50**(8): 2234-8.
- Maneckjee, R. and J. D. Minna (1990)b. "Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(9): 3294-8.
- Maneckjee, R. and J. D. Minna (1992). "Nonconventional opioid binding sites mediate growth inhibitory effects of methadone on human lung cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(4): 1169-73.
- Mansour, A., S. J. Watson and H. Akil (1995). "Opioid receptors: past, present and future." Trends Neurosci **18**(2): 69-70.
- Mansson, E., L. Bare and D. Yang (1994). "Isolation of a human kappa opioid receptor cDNA from placenta." Biochem. Biophys. Res. Commun. **202**: 1431-1437.
- Marchetti, B. and F. Labrie (1988). "Characteristics of flutamide action on prostatic and testicular functions in the rat." J Steroid Biochem **29**(6): 691-8.
- Martin, W. R., C. G. Eades, J. A. Thompson, R. E. Huppler and P. E. Gilbert (1976). "The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog." J Pharmacol Exp Ther **197**(3): 517-32.
- Matthes, H., E. P. Seward, B. Kieffer and R. A. North (1996). "Functional selectivity of orphanin FQ for its receptor coexpressed with potassium channel subunits in *Xenopus laevis* oocytes." Mol. Pharmacol. **50**: 447-450.
- McEwen, B. S. (1991). "Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity." Trends Pharmacol Sci **12**(4): 141-7.
- McNeal, J. E., Bostwick, D. G., Kindrachuk, R. A., Redwine, E. A., Freiha, F. S., Stamey, T. A.(1986) "Patterns of progression in prostate cancer" Lancet **1**(8472):60-3.
- Mebane, C., Gibbs, T., Horm, J. (1990) "Current status of prostate cancer in North American black males" J Natl Med Assoc **82**(11): 782-8.
- Meisel, H. (1986). "Chemical characterization and opioid activity of an exorphin isolated from in vivo digests of casein." FEBS Lett **196**(2): 223-7.
- Meisel, H., A. Reip, B. Faltus, M. Lu, H. Porst, M. Wiese, M. Roggendorf and D. H. Kruger (1995). "Transmission of hepatitis C virus to children and husbands by women infected with contaminated anti-D immunoglobulin." Lancet **345**(8959): 1209-11.
- Meisel, H. and W. Bockelmann (1999). "Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties." Antonie Van Leeuwenhoek **76**(1-4): 207-15.

- Mendoza, C., A. Soler and J. Tesarik (1995). "Nongenomic steroid action: independent targeting of a plasma membrane calcium channel and a tyrosine kinase." *Biochem Biophys Res Commun* **210**(2): 518-23.
- Meng, F., G.-X. Xie, R. C. Thompson, A. Mansour, A. Goldstein, S. J. Watson and H. Akil (1993). "Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 9954-9958.
- Mestek, A., J. H. Hurley, L. S. Bye, A. D. Campbell, Y. Chen, M. Tian, J. Liu, H. Schulman and L. Yu (1995). "The human mu opioid receptor: modulation of functional desensitization by calcium/calmodulin-dependent protein kinase and protein kinase C." *J. Neurosci.* **15**: 2396-2406.
- Meunier, J. C., C. Mollereau, L. Toll, C. Suaudeau, C. Moisand, P. Alvinerie, J. L. Butour, J. C. Guillemot, P. Ferrara, B. Monsarrat and et al. (1995). "Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor." *Nature* **377**(6549): 532-5.
- Meunier, J. C. (1997). "Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor." *Eur J Pharmacol* **340**(1): 1-15.
- Mhatre, A. N., M. A. Trifiro, M. Kaufman, P. Kazemi-Esfarjani, D. Figlewicz, G. Rouleau and L. Pinsky (1993). "Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy." *Nat Genet* **5**(2): 184-8.
- Middleton, R. G. and R. H. Larsen (1990). "Selection of patients with stage B prostate cancer for radical prostatectomy." *Urol Clin North Am* **17**(4): 779-85.
- Migliaccio, A., M. Di Domenico, G. Castoria, A. de Falco, P. Bontempo, E. Nola and F. Auricchio (1996). "Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells." *Embo J* **15**(6): 1292-300.
- Miller, J., A. D. McLachlan and A. Klug (1985). "Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes." *Embo J* **4**(6): 1609-14.
- Mollereau, C., M. Parmentier, P. Mailleux, J. L. Butour, C. Moisand, P. Chalon, D. Caput, G. Vassart and J. C. Meunier (1994). "ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization." *FEBS Lett.* **341**: 33-38.
- Montironi R, Parkinson C, Mariuzzi GM (2001) "Tumors of prostate and Seminal vesicles" In *Comprehensive Tumour Terminology Handbook* Edited by McKee PH, Chinyama CN, Whimster WF, Bogomoletz WV, Delides GS Publisher Wiley & Sons pp 195-202.
- Morey, A. K., A. Pedram, M. Razandi, B. A. Prins, R. M. Hu, E. Biesiada and E. R. Levin (1997). "Estrogen and progesterone inhibit vascular smooth muscle proliferation." *Endocrinology* **138**(8): 3330-9.
- Morita, T. (1991). "[Quantitative analyses of human prostatic alpha-adrenoceptors and effects of terazosin on the alpha-adrenoceptor activity]." *J Smooth Muscle Res* **27**(3): 149-54.
- Morita, T. and S. Kondo (1992). "[Quantitative analyses of alpha-adrenoceptors in human prostatic capsule, adenoma and urethra--a comparison between normal prostate and hypertrophied prostate]." *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* **83**(3): 328-33.
- Moriyama, N., T. Yamaguchi, T. Takeuchi, E. Sakamoto, T. Ueki, G. Tsujimoto and K. Kawabe (1999). "Semiquantitative evaluation of alpha1A-adrenoceptor subtype mRNA in human hypertrophied and non-hypertrophied prostates: regional comparison." *Life Sci* **64**(3): 201-10.

- Muir, C. S., Nectoux, J., Staszewski, J. 1991 " The epidemiology of prostatic cancer. Geographical distribution and time-trends" Acta Oncol 30 (2):133-40.
- Munson PJ, Rodbard D (1984) "Computerised analysis of ligand binding data: Basic Principles and recent development" In Computers in Endocrinology, edited by Rodbard D, Forti G., Raven Press 14 :117-146.
- Nadal, A., J. M. Rovira, O. Laribi, T. Leon-quinto, E. Andreu, C. Ripoll and B. Soria (1998). "Rapid insulinotropic effect of 17beta-estradiol via a plasma membrane receptor." Faseb J 12(13): 1341-8.
- Nakamoto, T., C. S. Chang, A. K. Li and G. W. Chodak (1992). "Basic fibroblast growth factor in human prostate cancer cells." Cancer Res 52(3): 571-7.
- Nakhla, A. M., M. S. Khan and W. Rosner (1990). "Biologically active steroids activate receptor-bound human sex hormone-binding globulin to cause LNCaP cells to accumulate adenosine 3',5'-monophosphate." J Clin Endocrinol Metab 71(2): 398-404.
- Nakhla, A. M. and W. Rosner (1996). "Stimulation of prostate cancer growth by androgens and estrogens through the intermediacy of sex hormone-binding globulin." Endocrinology 137(10): 4126-9.
- Nedvidkova, J., E. Kasafirek, A. Dlabac and V. Felt (1985). "Effect of beta-casomorphin and its analogue on serum prolactin in the rat." Exp Clin Endocrinol 85(2): 249-52.
- Nemere, I. and M. C. Farach-Carson (1998). "Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens." Biochem Biophys Res Commun 248(3): 443-9.
- Newmark, J. R., D. O. Hardy, D. C. Tonb, B. S. Carter, J. I. Epstein, W. B. Isaacs, T. R. Brown and E. R. Barrack (1992). "Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer." Proc Natl Acad Sci U S A 89(14): 6319-23.
- Nigg, E. A. (1995). "Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle." Bioessays 17(6): 471-80.
- Nishi, M., H. Takeshima, M. Mori, K. Nakagawara and T. Takeuchi (1994). "Structure and chromosomal mapping of genes for the mouse kappa-opioid receptor and an opioid receptor homologue (MOR-C)." Biochem Biophys Res Commun 205(2): 1353-7.
- Noordzij, M. A., G. J. van Steenbrugge, T. H. van der Kwast and F. H. Schroder (1995). "Neuroendocrine cells in the normal, hyperplastic and neoplastic prostate." Urol Res 22(6): 333-41.
- North, R. A. (1993). Opioid actions on membrane ion channels. Opioids I. A. Herz. New York, Springer- Velrag: 773-96.
- Numa (1984). Opioid peptide precursors and their genes. Peptides. G. E. J. New York, Academic: 410.
- Nyberg, F., H. Lieberman, L. H. Lindstrom, S. Lyrenas, G. Koch and L. Terenius (1989). "Immunoreactive beta-casomorphin-8 in cerebrospinal fluid from pregnant and lactating women: correlation with plasma levels." J Clin Endocrinol Metab 68(2): 283-9.
- Oesterling, J. E. (1991) "Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate" J Urol 145 (5):907-23.
- Olson, G. A., R. D. Olson and A. J. Kastin (1985). "Endogenous opiates: 1984." Peptides 6(4): 769-91.
- Onoprishvili, I., M. L. Andria, F. S. Vilim, J. M. Hiller and E. J. Simon (1999). "The bovine mu-opioid receptor: cloning of cDNA and pharmacological

- characterization of the receptor expressed in mammalian cells.” Brain Res. Mol. Brain Res. **73**: 129-137.
- Pan, Y. X., J. Cheng, J. Xu, G. Rossi, E. Jacobson, J. Ryan-Moro, A. I. Brooks, G. E. Dean, K. M. Standifer and G. W. Pasternak (1995). “Cloning and functional characterization through antisense mapping of a kappa 3-related opioid receptor.” Mol. Pharmacol. **47**: 1180-1188.
- Panagiotou, S., E. Bakogeorgou, E. Papakonstanti, A. Hatzoglou, F. Wallet, C. Dussert, C. Stournaras, P. M. Martin and E. Castanas (1999). “Opioid agonists modify breast cancer cell proliferation by blocking cells to the G2/M phase of the cycle: involvement of cytoskeletal elements.” J Cell Biochem **73**(2): 204-11.
- Papakonstanti, E. A., D. S. Emmanouel, A. Gravanis and C. Stournaras (1996). “Na<sup>+</sup>/Pi co-transport alters rapidly cytoskeletal protein polymerization dynamics in opossum kidney cells.” Biochem J **315**(Pt 1): 241-7.
- Papakonstanti, E. A., E. Bakogeorgou, E. Castanas, D. S. Emmanouel, R. Hartig and C. Stournaras (1998). “Early alterations of actin cytoskeleton in OK cells by opioids.” J Cell Biochem **70**(1): 60-9.
- Papakonstanti, E. A., D. S. Emmanouel, A. Gravanis and C. Stournaras (2000). “PLC-gamma1 signaling pathway and villin activation are involved in actin cytoskeleton reorganization induced by Na<sup>+</sup>/Pi cotransport up-regulation.” Mol Med **6**(4): 303-18.
- Pasi, A., H. Mahler, N. Lansel, C. Bernasconi and F. S. Messiha (1993). “beta-Casomorphin-immunoreactivity in the brain stem of the human infant.” Res Commun Chem Pathol Pharmacol **80**(3): 305-22.
- Pasternak, G. W., S. R. Childers and S. H. Snyder (1980)a. “Opiate analgesia: evidence for mediation by a subpopulation of opiate receptors.” Science **208**(4443): 514-6.
- Pasternak, G. W., S. R. Childers and S. H. Snyder (1980)b. “Naloxazone, a long-acting opiate antagonist: effects on analgesia in intact animals and on opiate receptor binding in vitro.” J Pharmacol Exp Ther **214**(3): 455-62.
- Pasternak, G. W. (2001). “Insights into mu opioid pharmacology the role of mu opioid receptor subtypes.” Life Sci **68**(19-20): 2213-9.
- Petrilli, P., D. Picone, C. Caporale, F. Addeo, S. Auricchio and G. Marino (1984). “Does casomorphin have a functional role?” FEBS Lett **169**(1): 53-6.
- Power, R. F., S. K. Mani, J. Codina, O. M. Conneely and B. W. O'Malley (1991). “Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors.” Science **254**(5038): 1636-9.
- Quigley, C. A., A. De Bellis, K. B. Marschke, M. K. el-Awady, E. M. Wilson and F. S. French (1995). “Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives.” Endocr Rev **16**(3): 271-321.
- Ramabadran, K. and B. E. Moore (1988). “Sudden infant death syndrome and opioid peptides from milk.” Am J Dis Child **142**(1): 12-3.
- Raynor, K., H. Kong, S. Law, J. Heerding, M. Tallent, F. Livingston, J. Hines and T. Reisine (1996). “Molecular biology of opioid receptors.” NIDA Res Monogr **161**: 83-103.
- Reinscheid, R. K., H. P. Nothacker, A. Bourson, A. Ardati, R. A. Henningsen, J. R. Bunzow, D. K. Grandy, H. Langen, F. J. Monsma, Jr. and O. Civelli (1995). “Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor.” Science **270**(5237): 792-4.

- Reisine, T. and G. I. Bell (1993). "Molecular biology of opioid receptors." Trends Neurosci **16**(12): 506-10.
- Reisine, T. (1995)a. "Somatostatin." Cell Mol Neurobiol **15**(6): 597-614.
- Reisine, T. and G. I. Bell (1995)b. "Molecular properties of somatostatin receptors." Neuroscience **67**(4): 777-90.
- Rens-Domiano, S. and H. E. Hamm (1995). "Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins." Faseb J **9**(11): 1059-66.
- Reubi, J. C. (1985). "Central nervous system-mediated growth inhibition of a rat prostate carcinoma by an opioid." J Endocrinol **107**(2): 247-50.
- Reubi, J. C., B. Waser, J. C. Schaer and R. Markwalder (1995). "Somatostatin receptors in human prostate and prostate cancer." J Clin Endocrinol Metab **80**(9): 2806-14.
- Reubi, J. C., J. C. Schaer, J. A. Laissue and B. Waser (1996). "Somatostatin receptors and their subtypes in human tumors and in peritumoral vessels." Metabolism **45**(8 Suppl 1): 39-41.
- Reubi, J. C., J. C. Schaer, R. Markwalder, B. Waser, U. Horisberger and J. Laissue (1997). "Distribution of somatostatin receptors in normal and neoplastic human tissues: recent advances and potential relevance." Yale J Biol Med **70**(5-6): 471-9.
- Ribadeau-Dumas, B. (1993). Progres en Pediatrie **10**. Allergies Alimentaire, Paris.
- Riegman, P. H., R. J. Vlietstra, P. Klaassen, J. A. van der Korput, A. Geurts van Kessel, J. C. Romijn and J. Trapman (1989). "The prostate-specific antigen gene and the human glandular kallikrein-1 gene are tandemly located on chromosome 19." FEBS Lett **247**(1): 123-6.
- Rohrer, L., F. Raulf, C. Bruns, R. Buettner, F. Hofstaedter and R. Schule (1993). "Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(9): 4196-200.
- Ross, F. M. and J. M. Gibson (1992). "Dynamic observations of interface propagation during silicon oxidation." Physical Review Letters **68**(11): 1782-1785.
- Rossi, G. C., L. Leventhal, E. Bolan and G. W. Pasternak (1997). "Pharmacological characterization of orphanin FQ/nociceptin and its fragments." J Pharmacol Exp Ther **282**(2): 858-65.
- Ruizeveld de Winter, J. A., P. J. Janssen, H. M. Sleddens, M. C. Verleun-Mooijman, J. Trapman, A. O. Brinkmann, A. B. Santerse, F. H. Schroder and T. H. van der Kwast (1994). "Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer." Am J Pathol **144**(4): 735-46.
- Rundlett, S. E., X. P. Wuand and R. L. Miesfeld (1990). "Functional characterizations of the androgen receptor confirm that the molecular basis of androgen action is transcriptional regulation." Mol Endocrinol **4**:708-14.
- Sako, Y. and A. Kusumi (1994). "Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis." J Cell Biol **125**(6): 1251-64.
- Scardino, P. T., Weaver, R., Hudson, M. A. (1992) " Early detection of prostate cancer" Hum Pathol **23**(3):211-22.
- Shimizu, H., Ross, R. K., Bernstein, L., Yatani, R., Henderson, B. E., Mack, T. M. (1991) Br J Cancer **63** (6) 963-6.
- Schlimme, E. and H. Meisel (1995). "Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects." Nahrung **39**(1): 1-20.

- Scholar, E. M., L. Violi and T. D. Hexum (1987). "The antimetastatic activity of enkephalin-like peptides." Cancer Lett **35**(2): 133-8.
- Schweigerer, L., W. Schmidt, H. Teschemacher and C. Gramsch (1985). "beta-Endorphin: surface binding and internalization in thymoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(17): 5751-5.
- Scott, W. W., M. Menon and P. C. Walsh (1980). "Hormonal therapy of prostatic cancer." Cancer **45**(7 Suppl): 1929-36.
- Sedqi, M., S. Roy, S. Ramakrishnan, R. Elde and H. H. Loh (1995). "Complementary DNA cloning of a mu-opioid receptor from rat peritoneal macrophages." Biochem. Biophys. Res. Commun. **209**: 563-574.
- Seizinger, B. R., V. Holtt and A. Herz (1984). "Proenkephalin B (prodynorphin)-derived opioid peptides: evidence for a differential processing in lobes of the pituitary." Endocrinology **115**: 662-71.
- Shavit, Y., A. Depaulis, F. C. Martin, G. W. Terman, R. N. Pechnick, C. J. Zane, R. P. Gale and J. C. Liebeskind (1986). "Involvement of brain opiate receptors in the immune-suppressive effect of morphine." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(18): 7114-7.
- Siegall, C. B., G. Schwab, R. P. Nordan, D. J. FitzGerald and I. Pastan (1990). "Expression of the interleukin 6 receptor and interleukin 6 in prostate carcinoma cells." Cancer Res **50**(24): 7786-8.
- Simantov, R., H. Nadler and R. Levy (1982). "A genetic approach to reveal the action of the opiate receptor in selected neuroblastoma-glioma cells. Interaction with alpha-adrenoceptors, calmodulin and Ca<sup>2+</sup>-ATPase." Eur J Biochem **128**(2-3): 461-6.
- Simental, J. A., M. Sar, M. V. Lane, F. S. French and E. M. Wilson (1991). "Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor." J Biol Chem **266**(1): 510-8.
- Singh, M., C. L. Rosen, K. J. Chang and G. G. Haddad (1989). "Plasma beta-casomorphin-7 immunoreactive peptide increases after milk intake in newborn but not in adult dogs." Pediatr Res **26**(1): 34-8.
- Sinisi, A. A., A. Bellastella and D. Pasquali (2001). "Somatostatin and somatostatin receptors in the prostate." Minerva Endocrinol **26**(3): 159-63.
- Sitaras, N. M., E. Sariban, M. Bravo, P. Pantazis and H. N. Antoniadis (1988). "Constitutive production of platelet-derived growth factor-like proteins by human prostate carcinoma cell lines." Cancer Res **48**(7): 1930-5.
- Smith, J. A., Jr. (1986). "Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) analogs in treatment of prostatic cancer. Clinical perspective." Urology **27**(1 Suppl): 9-15.
- Smith, J. A., Jr. (1987). Endocrine treatment. Clinical management of prostate cancer. R. G. Middleton. Chicago, Year book medical Publishers: 134-153.
- Smith, J. R. and E. J. Simon (1980). "Selective protection of stereospecific enkephalin and opiate binding against inactivation by N-ethylmaleimide: evidence for two classes of opiate receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(1): 281-4.
- Sontag, J. M., D. Aunis and M. F. Bader (1988). "Peripheral actin filaments control calcium-mediated catecholamine release from streptolysin-O-permeabilized chromaffin cells." Eur J Cell Biol **46**(2): 316-26.
- Spitz, M. R., Currier, R. D., Fueger, J. J., Babaian, R. J., Newell, G. R. (1991) "Familial patterns of prostate cancer: a case-control analysis" J Urol **146** (5)1305-7.

- Stamey, T. A., J. N. Kabalin, J. E. McNeal, I. M. Johnstone, F. Freiha, E. A. Redwine and N. Yang (1989). "Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. II. Radical prostatectomy treated patients." J Urol **141**(5): 1076-83.
- Steers, W. D. (2001). "5alpha-reductase activity in the prostate." Urology **58**(6 Suppl 1): 17-24; discussion 24.
- Stefano, G. B., A. Hartman, T. V. Bilfinger, H. I. Magazine, Y. Liu, F. Casares and M. S. Goligorsky (1995). "Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation." J Biol Chem **270**(51): 30290-3.
- Stefano, G. B., Y. Goumon, T. V. Bilfinger, I. D. Welters and P. Cadet (2000). "Basal nitric oxide limits immune, nervous and cardiovascular excitation: human endothelia express a mu opiate receptor." Prog Neurobiol **60**(6): 513-30.
- Stenman, U. H., J. Leinonen, H. Alftan, S. Rannikko, K. Tuhkanen and O. Alftan (1991). "A complex between prostate-specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer." Cancer Res **51**(1): 222-6.
- Stiene-Martin, A. and K. F. Hauser (1990). "Opioid-dependent growth of glial cultures: suppression of astrocyte DNA synthesis by met-enkephalin." Life Sci **46**(2): 91-8.
- Stiene-Martin, A., J. A. Gurwell and K. F. Hauser (1991). "Morphine alters astrocyte growth in primary cultures of mouse glial cells: evidence for a direct effect of opiates on neural maturation." Brain Res Dev Brain Res **60**(1): 1-7.
- Stone, K. R., D. D. Mickey, H. Wunderli, G. H. Mickey and D. F. Paulson (1978). "Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145)." Int J Cancer **21**(3): 274-81.
- Strosberg, A. D. (1991). "Structure/function relationship of proteins belonging to the family of receptors coupled to GTP-binding proteins." Eur J Biochem **196**(1): 1-10.
- Suzuki, H., N. Sato, Y. Watabe, M. Masai, S. Seino and J. Shimazaki (1993). "Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer." J Steroid Biochem Mol Biol **46**: 759-65.
- Svedberg, J., J. de Haas, G. Leimenstoll, F. Paul and H. Teschemacher (1985). "Demonstration of beta-casomorphin immunoreactive materials in in vitro digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans." Peptides **6**(5): 825-30.
- Swanson, L. J., J. H. Seely and M. B. Garnick (1988). "Gonadotropin-releasing hormone analogs and prostatic cancer." Crit Rev Oncol Hematol **8**(1): 1-26.
- Tainio, H. (1995). "Peptidergic innervation of the human prostate, seminal vesicle and vas deferens." Acta Histochem **97**(1): 113-9.
- Tang, W. J. and A. G. Gilman (1992). "Adenylyl cyclases." Cell **70**(6): 869-72.
- Taplin, S. H., W. Barlow, N. Urban, M. T. Mandelson, D. J. Timlin, L. Ichikawa and P. Nefcy (1995). "Stage, age, comorbidity, and direct costs of colon, prostate, and breast cancer care." J Natl Cancer Inst **87**:417-26.
- Tatoud, R., A. Degeorges, G. Prevost, J. L. Hoepffner, C. Gauville, G. Millot, F. Thomas and F. Calvo (1995). "Somatostatin receptors in prostate tissues and derived cell cultures, and the in vitro growth inhibitory effect of BIM-23014 analog." Mol Cell Endocrinol **113**(2): 195-204.

- Teschemacher, H. and G. Koch (1991). "Opioids in the milk." Endocr Regul **25**: 147-50.
- Teschemacher, H., G. Koch and V. Brantl (1997). "Milk protein-derived opioid receptor ligands." Biopolymers **43**(2): 99-117.
- Theodoropoulos, P. A., A. Gravanis, I. Saridakis and C. Stournaras (1992). "Normal and Ha-ras-1 oncogene transformed Buffalo rat liver (BRL) cells show differential resistance to cytoskeletal protein inhibitors." Cell Biochem Funct **10**(4): 281-8.
- Thompson, R. C., A. Mansour, H. Akil and S. J. Watson (1993). "Cloning and pharmacological characterization of a rat mu opioid receptor." Neuron **11**: 903-913.
- Tilley, W. D., C. M. Wilson, M. Marcelli and M. J. McPhaul (1990). "Androgen receptor gene expression in human prostate carcinoma cell lines." Cancer Res **50**(17): 5382-6.
- Tome, D., A. M. Dumontier, M. Hautefeuille and J. F. Desjeux (1987). "Opiate activity and transepithelial passage of intact beta-casomorphins in rabbit ileum." Am J Physiol **253**(6 Pt 1): G737-44.
- Tora, L., H. Gronemeyer, B. Turcotte, M. P. Gaub and P. Chambon (1988). "The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation." Nature **333**(6169): 185-8.
- Tseng-Crank, J., T. Kost, A. Goetz, S. Hazum, K. M. Roberson, J. Haizlip, N. Godinot, C. N. Robertson and D. Saussy (1995). "The alpha 1C-adrenoceptor in human prostate: cloning, functional expression, and localization to specific prostatic cell types." Br J Pharmacol **115**(8): 1475-85.
- Umbach, M., H. Teschemacher, K. Praetorius, R. Hirschhauser and H. Bostedt (1985). "Demonstration of a beta-casomorphin immunoreactive material in the plasma of newborn calves after milk intake." Regul Pept **12**(3): 223-30.
- van der Kwast, T. H., J. Schalken, J. A. Ruizeveld de Winter, C. C. van Vroonhoven, E. Mulder, W. Boersma and J. Trapman (1991). "Androgen receptors in endocrine-therapy-resistant human prostate cancer." Int J Cancer **48**(2): 189-93.
- Vedeler, A., I. F. Pryme and J. E. Hesketh (1991). "Insulin induces changes in the subcellular distribution of actin and 5'-nucleotidase." Mol Cell Biochem **108**(1): 67-74.
- Veldscholte, J., C. Ris-Stalpers, G. G. Kuiper, G. Jenster, C. Berrevoets, E. Claassen, H. C. van Rooij, J. Trapman, A. O. Brinkmann and E. Mulder (1990). "A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens." Biochem Biophys Res Commun **173**(2): 534-40.
- Veldscholte, J., C. A. Berrevoets, C. Ris-Stalpers, G. G. Kuiper, G. Jenster, J. Trapman, A. O. Brinkmann and E. Mulder (1992)a. "The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens." J Steroid Biochem Mol Biol **41**(3-8): 665-9.
- Veldscholte, J., C. A. Berrevoets, A. O. Brinkmann, J. A. Grootegoed and E. Mulder (1992)b. "Anti-androgens and the mutated androgen receptor of LNCaP cells: differential effects on binding affinity, heat-shock protein interaction, and transcription activation." Biochemistry **31**(8): 2393-9.



- Venihaki, M., A. Gravanis and A. N. Margioris (1996). "Kappa opioids exert a strong antiproliferative effect on PC12 rat pheochromocytoma cells." Peptides **17**(3): 413-9.
- Wang, M. C., L. A. Valenzuela, G. P. Murphy and T. M. Chu (1979). "Purification of a human prostate specific antigen." Invest Urol **17**(2): 159-63.
- Wang, J. B., Y. Imai, C. M. Eppler, P. Gregor, C. E. Spivak and G. R. Uhl (1993). "mu opiate receptor: cDNA cloning and expression." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **90**: 10230-10234.
- Wang, J. B., P. S. Johnson, A. M. Persico, A. L. Hawkins, C. A. Griffin and G. R. Uhl (1994)a. "Human mu opiate receptor. cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment." FEBS Lett. **338**: 217-222.
- Wang, J. B., P. S. Johnson, Y. Imai, A. M. Persico, B. A. Ozenberger, C. M. Eppler and G. R. Uhl (1994)b. "cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant." FEBS Lett. **348**: 75-79.
- Watson, C. S. and B. Gametchu (1999)a. "Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them." Proc Soc Exp Biol Med **220**(1): 9-19.
- Watson, C. S., C. H. Campbell and B. Gametchu (1999)b. "Membrane oestrogen receptors on rat pituitary tumour cells: immuno-identification and responses to oestradiol and xenoestrogens." Exp Physiol **84**(6): 1013-22.
- Waugh, D. F. and B. Talbot (1971). "Equilibrium casein micelle systems." Biochemistry **10**:4153-62.
- Wehling, M. (1997). "Specific, nongenomic actions of steroid hormones." Annu Rev Physiol **59**: 365-93.
- Whittemore, A. S. (1994). "Prostate cancer" Cancer Surv **19-20**: 309-22.
- Wick, M. J., S. R. Minnerath, X. Lin, R. Elde, P. Y. Law and H. H. Loh (1994). "Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa opioid receptors." Brain Res. Mol. Brain Res. **27**: 37-44.
- Wick, M. J., S. R. Minnerath, S. Roy, S. Ramakrishnan and H. H. Loh (1995). "Expression of alternate forms of brain opioid 'orphan' receptor mRNA in activated human peripheral blood lymphocytes and lymphocytic cell lines." Brain Res. Mol. Brain Res. **32**: 342-347.
- Wilding, G. (1992). "The importance of steroid hormones in prostate cancer." Cancer Surv **14**: 113-30.
- Wilson, S. P. (1991)a. "Processing of proenkephalin in adrenal chromaffin cells." J Neurochem **57**(3): 876-81.
- Wink, D. A., Y. Vodovotz, J. Laval, F. Laval, M. W. Dewhirst and J. B. Mitchell (1998). "The multifaceted roles of nitric oxide in cancer." Carcinogenesis **19**(5): 711-21.
- Wollemann, M., S. Benyhe and J. Simon (1993). "The kappa-opioid receptor: evidence for the different subtypes." Life Sci **52**: 599-611.
- Xie, G. X., F. Meng, A. Mansour, R. C. Thompson, M. T. Hoversten, A. Goldstein, S. J. Watson and H. Akil (1994). "Primary structure and functional expression of a guinea pig kappa opioid (dynorphin) receptor." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**: 3779-3783.
- Xue, Y., J. van der Laak, F. Smedts, C. Schoots, A. Verhofstad, J. de la Rosette and J. Schalken (2000). "Neuroendocrine cells during human prostate development: does neuroendocrine cell density remain constant during fetal as well as postnatal life?" Prostate **42**(2): 116-23.

- Yamada, Y., S. R. Post, K. Wang, H. S. Tager, G. I. Bell and S. Seino (1992)a. "Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(1): 251-5.
- Yamada, Y., T. Reisine, S. F. Law, Y. Ihara, A. Kubota, S. Kagimoto, M. Seino, Y. Seino, G. I. Bell and S. Seino (1992)b. "Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase." Mol Endocrinol **6**(12): 2136-42.
- Yamada, Y., M. Stoffel, R. Espinosa, 3rd, K. S. Xiang, M. Seino, S. Seino, M. M. Le Beau and G. I. Bell (1993)a. "Human somatostatin receptor genes: localization to human chromosomes 14, 17, and 22 and identification of simple tandem repeat polymorphisms." Genomics **15**(2): 449-52.
- Yamada, Y., S. Kagimoto, A. Kubota, K. Yasuda, K. Masuda, Y. Someya, Y. Ihara, Q. Li, H. Imura, S. Seino and et al. (1993)b. "Cloning, functional expression and pharmacological characterization of a fourth (hSSSTR4) and a fifth (hSSSTR5) human somatostatin receptor subtype." Biochem Biophys Res Commun **195**(2): 844-52.
- Yasuda, K., K. Raynor, H. Kong, C. D. Breder, J. Takeda, T. Reisine and G. I. Bell (1993). "Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6736-40.
- Yuan, S., J. Trachtenberg, G. B. Mills, T. J. Brown, F. Xu and A. Keating (1993). "Androgen-induced inhibition of cell proliferation in an androgen-insensitive prostate cancer cell line (PC-3) transfected with a human androgen receptor complementary DNA." Cancer Res **53**(6): 1304-11.
- Zagon, I. S. and P. J. McLaughlin (1981). "Naloxone prolongs the survival time of mice treated with neuroblastoma." Life Sci **28**(10): 1095-102.
- Zagon, I. S. and P. J. McLaughlin (1983). "Naltrexone modulates tumor response in mice with neuroblastoma." Science **221**(4611): 671-3.
- Zagon, I. S., P. J. McLaughlin, S. R. Goodman and R. E. Rhodes (1987). "Opioid receptors and endogenous opioids in diverse human and animal cancers." J Natl Cancer Inst **79**(5): 1059-65.
- Zagon, I. S. and P. J. McLaughlin (1989)a. "Endogenous opioid systems regulate growth of neural tumor cells in culture." Brain Res **490**(1): 14-25.
- Zagon, I. S. and P. J. McLaughlin (1989)b. "Opioid antagonist modulation of murine neuroblastoma: a profile of cell proliferation and opioid peptides and receptors." Brain Res **480**(1-2): 16-28.
- Zagon, I. S. and P. J. McLaughlin (1991). "Identification of opioid peptides regulating proliferation of neurons and glia in the developing nervous system." Brain Res **542**(2): 318-23.
- Zastawny, R. L., S. R. George, T. Nguyen, R. Cheng, J. Tsatsos, R. Briones-Urbina and B. F. O'Dowd (1994). "Cloning, characterization, and distribution of a mu-opioid receptor in rat brain." J. Neurochem. **62**: 2099-2105.
- Zhao, X. Y. and D. Feldman (2001). "The role of vitamin D in prostate cancer." Steroids **66**(3-5): 293-300.
- Zhorov, B. S. and V. S. Ananthanarayanan (2000). "Homology models of mu-opioid receptor with organic and inorganic cations at conserved aspartates in the second and third transmembrane domains." Arch Biochem Biophys **375**(1): 31-49.
- Zhou, Z. X., C. I. Wong, M. Sar and E. M. Wilson (1994). "The androgen receptor: an overview." Recent Prog Horm Res **49**: 249-74.

- Zhu, J., C. Chen and J. Xue (1995). "Cloning of a human .kappa. opioid receptor from the brain." Life Sci. **56**: 201-207.
- Zioudrou, C., R. A. Streaty and W. A. Klee (1979). "Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins." J Biol Chem **254**(7): 2446-9.