



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜ.Ν ΥΓΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΑΣ**



**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ  
ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΝΟΤΑΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004**

“και ίσως η μεγαλύτερη περιπέτεια να μας περίμενε σε μια πάροδο  
που δεν της δώσαμε σημασία»

Τάσος Λειβαδίτης

**Στον Πατέρα μου κι τη Μητέρα μου  
Κωνσταντίνο Νότα και Ιωάννα Νότα  
Στον αδελφό μου Τάσο Νότα**

**Για την αμέριστη ηθική και οικονομική βοήθεια  
που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια**

**Στη Σοφία Βαμβακίδου**  
**για την κατανόηση και υπομονή της**

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 Γαστρεντερολογίας κ. Ηλία Κουρούμαλη γιατί αναγνώρισε τον ενθουσιασμό μου και τη δίψα μου για έρευνα και μου έδωσε από πολύ νωρίς την ευκαιρία να συμμετέχω στο ερευνητικό έργο του εργαστηρίου του. Τον ευχαριστώ για την καθοδήγηση, την υποστήριξη και την αγάπη του. Πέρα από σπουδαίος δάσκαλος και ιατρός, θα αποτελεί πάντα για μένα πρότυπο ηθικής, ευγένειας και ταπεινοφροσύνης.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το μέλος της τριμελούς επιτροπής Καθηγητή Εργαστηριακής Ενδοκρινολογίας κ. Ηλία Καστανά. Πέρα από τις ατελείωτες ώρες επιστημονικής κουβέντας που μου χάρισε από το χρόνο του, μου δίδαξε σημαντικές δεξιότητες, τρόπο σκέψης, σύστημα αλλά κυρίως το ότι ένας επιστήμονας δεν πρέπει να είναι μονοδιάστατη προσωπικότητα αλλά να αναζητά το «ουσιώδες» και το «ενδιαφέρον» σε όλες τις πτυχές της ζωής του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά και το τρίτο μέλος της επιτροπής την Αναπλ. Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κ. Κυριακή Θερμού, η οποία με την βαθιά γνώση του συστήματος της σωματοστατίνης και των υποδοχέων της βοήθησε σημαντικά στην ποιότητα του παρόντος πονήματος.

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

κον Αχιλλέα Γραβάνη Καθηγητή Φαρμακολογίας  
κον Γεώργιο Σαμώνη Καθηγητή Παθολογίας  
κα Ελένη Δημητρίου Επικ. Καθηγήτρια Παιδοαιματολογίας  
κον Γεώργιο Κολιό Επικ. Καθηγητή Γαστρεντερολογίας  
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:

Τη Μαριλένα Καμπά που οι τεχνικές και επιστημονικές της γνώσεις η φιλία της και η πάντα καλή της διάθεση ακόμα και τις πιο κουραστικές στιγμές αποτέλεσαν ακρογωνιαίο λίθο αυτού του πονήματος. Τον φίλο και συμπαραστάτη Κώστα Ξυδάκη, γιατί ήταν εκεί. Τον Βασίλη Βαλάτα για τη φιλία και τη στήριξή του. Την Άννα Βασιλάκη που ίσως είπε την πιο σημαντική λέξη την πιο παράξενη στιγμή. Την Νίκη Μαστροδήμου που βοήθησε σημαντικά με τον ενθουσιασμό της και την τεχνική της κατάρτιση αλλά και τη Δέσποινα Παπασάββα για το χρόνο και τον κόπο της. Τέλος την Ισμήνη, τη Φοίβη, τη Δέσποινα, το Δημήτρη, τη Βαγγελιώ, τη Σόνια, την Αθανασία, την Κλαδιά, την Αθηνά, το Γιώργο, το Νίκο και όλα τα παιδιά που βοήθησαν με τον τρόπο τους ακόμα και αν δεν το κατάλαβαν ποτέ.

Γεώργιος Νότας

Ηράκλειο 2004

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

<b>Όνομα</b>	Γεώργιος
<b>Επίθετο</b>	Νότας
<b>Ημερομηνία και τόπος Γέννησης</b>	5 Απριλίου 1973, Πτολεμαΐδα
<b>Οικογενειακή κατάσταση</b>	Άγαμος
<b>Μόνιμη διεύθυνση</b>	Αδαμάκη 3, Τ.Κ. 71305, Ηράκλειο Κρήτης
<b>Τηλέφωνο</b>	+30945583347 +302810230201
<b>e-mail</b>	<a href="mailto:gnotas@med.uoc.gr">gnotas@med.uoc.gr</a>

### 1. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1991 – 1993	Φοιτητής Τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων Τ.Ε.Ι. Θεσσαλονίκης.
1993 – 1999	Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας Πανεπιστημίου Κρήτης

### 2. ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

3/2000 – 6/2000	Μετεκπαιδευτικό πρόγραμμα του Κέντρου Επαγγελματικής Κατάρτισης του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου στο αντικείμενο της προνοσοκομειακής και νοσοκομειακής επείγουσας ιατρικής διάρκειας 300 ωρών (148 ώρες θεωρία και 152 ώρες πρακτική άσκηση σε τμήμα επειγόντων, ΜΕΘ, αναισθησιολογία, μονάδα νεογνών, ασθενοφόρα ΕΚΑΒ, μαιευτήριο)
1999 – σήμερα	Υποψήφιος διδάκτωρ Ιατρικού τμήματος Πανεπιστημίου Κρήτης.

### 3. ΠΤΥΧΙΑ

1999	Πτυχίο Ιατρικού Τμήματος της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Κρήτης με βαθμό “Άριστα”
------	---

### 4. ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΑΠΑΣΧΟΛΗΣΗ

9/1999 – 12/1999	Έμμισθη τρίμηνη υποχρεωτική εκπαίδευση στο Βενιζέλειο – Πανάειο Νοσοκομείο στις ειδικότητες Παθολογίας, Χειρουργικής, Καρδιολογίας.
12/1999 – 12/2000	Αγροτικός Ιατρός στο Π.Ι. Σίβας του Κ.Υ. Μοιρών.
3/2001 -- 7/2002	Στρατιωτική Θητεία (ΚΕΥΓ Άρτας, 747ΤΜΕ Χαλκηδόνα Θεσ/νίκης, 646Μ/Κ ΤΠ Κομοτηνή)
12/2002 - 2/2003	Συμβασιούχος ερευνητής της Γαστρεντερολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, στα πλαίσια του προγράμματος του Κέντρου Ειδικών Λοιμώξεων (Κ.Ε.Ε.Λ.) «Καταγραφή της Ηπατίτιδας Β και C στην Περιφέρεια Κρήτης»
11/2003 - ...	Ειδικεύμενος Παθολογίας στην Α' Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου

## 5. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ / ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Πλήρεις ξενόγλωσσες δημοσιεύσεις	17
Ξενόγλωσσα Άρθρα υπό δημοσίευση	2
Υποβληθείσες ξενόγλωσσες δημοσιεύσεις	6
Ξενόγλωσσα abstracts δημοσιευμένα σε περιοδικά	19
Πλήρεις δημοσιεύσεις στα Ελληνικά	1
Εργασίες σε διεθνή συνέδρια	22
Εργασίες σε Ελληνικά συνέδρια	19

### A) Ξενόγλωσσες Δημοσιεύσεις

- Kampa M., Hatzoglou A., **Notas G.**, Damianaki A., Bakogeorgou E., Gemetzi C., Kouroumalis E., Martin P., Castanas E. : Wine polyphenols inhibit prostate cancer cell lines. *J Cell Biochem* 2000 Jun 6;78(3):429-41.
- Damianaki A., Bakogeorgou E., Kampa M., **Notas G.**, Hatzoglou A., Panagiotou S., Gemetzi C., Kouroumalis E., Martin P., Castanas E. : Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *Nutrition and Cancer* 2000 37(2), 105-115)
- Notas G.**, Xidakis C., Valatas V., Kouroumalis A., Kouroumalis E. : Levels of circulating Endothelin-1 and Nitrates/Nitrites in patients with virus-related Hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat.* 2001 Jan;8(1):63-9.
- Matrella E, Valatas V, **Notas G**, Roumpaki H., Xidakis C., Hadzidakis A., Mouzas I., Kouroumalis E. Bolus somatostatin but not octreotide reduces hepatic sinusoidal pressure by a NO-independent mechanism in chronic liver disease *Aliment Pharmacol Ther* 2001 Jun; 15(6): 857-64.
- Kampa M, Hatzoglou A, **Notas G**, Niniraki, Kouroumalis E, Castanas E : Opioids are non-competitive inhibitors of Nitric Oxide Synthase in T47D human breast cancer cells. *Cell Death Differ.* 2001 Sep;8(9):943-52
- Papakyriakou P, Tzardi M, Valatas V, Kanavaros P, Karydi E, **Notas G**, Xidakis C, Kouroumalis E. Apoptosis and apoptosis related proteins in chronic viral liver disease. *Apoptosis.* 2002 Apr;7(2):133-41.
- Kampa M, Nistikaki A, Tsaousis V, Maliaraki N, **Notas G**, Castanas E. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. *BMC Clin Pathol.* 2002 Aug 28;2(1):3.
- Chatzicostas C, Roussomoustakaki M, Vlachonikolis IG, **Notas G**, Mouzas I, Samonakis D, Kouroumalis EA Comparison of Ranson, APACHE II and APACHE III scoring systems in acute pancreatitis. *Pancreas* 2002 Nov;25(4):331-5
- Chatzicostas C, Roussomoustakaki M, **Notas G**, Vlachonikolis IG, Samonakis D, Romanos J, Vardas E, Kouroumalis EA. A comparison of Child-Pugh, APACHE II and APACHE III scoring systems in predicting hospital mortality of patients with liver cirrhosis *BMC GASTROENTEROLOGY* 3: art. no. 7 MAY 8 2003
- Valatas V., Kolios G., **Notas G.**, Xidakis C., Diamantis I., Kouroumalis E. Octreotide regulates CC but not CXC LPS-induced chemokine secretion in rat Kupffer cells. (*Br J Pharmacol.* 2004 Feb;141(3):477-87)
- Kampa M., Alexaki I., **Notas G.**, Nifli AP., Nistikaki A., Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Kouimtoglou E., Blekas G., Boskou D., Gravanis A., Castanas E. Phenolic Acids bind to Ah receptor, decrease growth and induce apoptosis of T47D human breast cancer cells (*Breast Cancer Res* 2004, **6**:R63-R74)

12. E Oekonomaki, **G. Notas**, V.Valatas, C. Xidakis, E.A. Kouroumalis Binge Drinking And Nitric Oxide In Chronic Viral Liver Disease E. (Alcohol Alcoholism. 2004 Mar-Apr;39(2):106-9)
13. **G. Notas**, G. Kolios, N. Mastrodimou, M. Kampa, A. Vasilaki, C. Xidakis, E. Castanas, K. Thermos, E. Kouroumalis. Cortistatin production by HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line and distribution of Somatostatin receptors (J Hepatol. 2004 May;40(5):792-8)
14. Xidakis C., Kolios G. Valatas V., **Notas G.**, Mouzas I., Kouroumalis E. Effect of octreotide on apoptosis related proteins in rat Kupffer cells: A possible anti-tumour mechanism. (Anticancer Res. 2004 Mar-Apr;24(2B):833-41)
15. Koulentaki M, **Notas G**, Petinaki E, Valatas V, Mouzas I, Castanas E, Kouroumalis EA. Nitric Oxide and pro-inflammatory cytokines in Acute Hepatitis B (Eur J Intern Med. 2004 Feb;15(1):35-38)
16. A. Vasilaki, T. Papadaki, **G. Notas**, Kolios G., D. Hoyer, M. Tsilimbaris, E. Kouroumalis, I. Pallikaris, K. Thermos Somatostatin regulates nitric oxide production in human retinal pigment epithelium (RPE) cell cultures (Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004 May;45(5):1499-506)
17. Valatas V, Kolios G, Manousou P, Notas G, Xidakis C, and Kouroumalis E. Nitric Oxide and MCP-1 regulation in LPS activated rat Kupffer cells (Regul Pept. 2004 Aug 15;120(1-3):215-25)

#### B) Ξενόγλωσσα Άρθρα υπό δημοσίευση

1. Koutroubakis IE., Theodoropoulou A., Xidakis C., Sfiridaki A., **Notas G.**, Kolios G., Kouroumalis EA Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in inflammatory bowel disease. (Eur. J. Gastroenterol)
2. Papageorgiou M., Stiakaki E., Malliaraki N., Dimitriou H., **Notas G.**, Castanas E., Kalmanti M. Decreased plasma total antioxidant capacity (TAC) in children receiving cancer chemotherapy (Leukemia Research).

#### Γ) Υποβληθείσες ξενόγλωσσες δημοσιεύσεις

1. **G Notas**, M Kampa, AP Nifli<sup>2</sup>, A Hatzoglou, J Vercauteren, E Kouroumalis, E Castanas. The system NO/NOS mediates the antiproliferative effect of wine polyphenols in HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line (Hepatology)
2. **G. Notas**, M. Miliaraki, M. Kampa, F. Dimoulios, E. Matrella, E. Castanas, E. Kouroumalis. Patients with Primary Biliary Cirrhosis have increased serum total antioxidant capacity. (World J Gastroenterology)
3. Xidakis C., Kolios G., **Notas G.**, Valatas V., Manousou P., Kouroumalis E. Lipopolysaccharide-induced production of pro- and anti-fibrotic agents by isolated rat Kupffer cells; the regulatory effect of Octreotide. (Liver International)
4. Dimitriou H., Kampa M., **Notas G.**, Kouroumalis E., Kalmanti M., Castanas E. Opioids induce a reversible inhibition of hemopoietic progenitor cell growth. (Leukemia)
5. Dimoulios P., Kolios G., **Notas G.**, Xidakis C., Koulentaki M., Tsagarakis N., Kouroumalis A., Kouroumalis E. Circulating Endothelins in Primary Biliary Cirrhosis (PBC); Evidence that PBC may be a sinusoidal cell disease. (GUT)



6. Kolios G., Manousou P., **Notas G.**, Xidakis C., Bourikas L., Tsagarakis N., Mouzas I., Kouroumalis E. Ciprofloxacin inhibits cytokine induced nitric oxide production in a human colonic epithelial cell line HT-29. (Gastroenterology)

Δ) Ξενόγλωσσα abstracts δημοσιευμένα σε περιοδικά

1. **G. Notas**, V. Valatas, K. Xidakis, A. Kouroumalis, M Koulentaki, E. Kouroumalis (1999) : Circulating Endothelin 1 and Nitric Oxide in Primary Biliary Cirrhosis. Gut 44(suppl 1):A61
2. Kouroumalis E, Matrella E, Valatas V, **Notas G**, Roumpaki H, Xidakis C, Hatzidakis A, Mouzas I (2001) : Bolus somatostatin but not octreotide reduces hepatic sinusoidal pressure by a NO-independent mechanism in chronic liver disease. J Hepatol 34 (suppl 1): 195
3. Chatzikostas C, **Notas G**, Roussomoustakaki M, Mouzas I, Koutroubakis I, Skordilis P, Matrella E, Dimoulios F, Theodoropoulou A, Samonakis D, Vardas E, Antoniou P, Kouroumalis E Prediction of severity in acute pancreatitis: A comparative study of Ranson's score and 24 and 48 hours APACHE II and III scoring systems Gut 50: 153 Suppl. 2 APR 2002
4. Chatzikostas C, Roussomoustakaki M, **Notas G**, Vlachonikolis GI, Matrella E, Samonakis D, Vardas E, Kouroumalis E Prognostic accuracy of APACHE III scoring system is greater than that of the conventional Child-Pugh's score in predicting short-term hospital mortality of non intensive care unit patients with liver cirrhosis Gut 50: 418 Suppl. 2 APR 2002
5. Notas G, Kampa M, Xidakis C, Valatas V, Kolios G, Castanas E, Kouroumalis E. Octreotide and opioids inhibit the proliferation of human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line HepG2, with concurrent increase of nitric oxide (NO) production. Eur J Endocrinol. 2003 Jan;148 Suppl 1:50 pages
6. Valatas V, Kolios G, Notas G, Xidakis C, Kouroumalis EA Octreotide regulates CC but not CXC LPS-induced chemokine secretion in rat Kupffer cells. J Hepatol 38: 725 Suppl. 2 APR 2003
7. Notas G, Kampa M, Vasilaki A, Xidakis C, Valatas V, Thermos K, Kolios G, Castanas E, Kouroumalis E Octreotide and opioids reduce the rate of proliferation of human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line HepG2, with parallel increase of nitric oxide (NO) production. J Hepatol 38: 345 Suppl. 2 APR 2003
8. Diamantis I, Karamitopoulou E, Christodoulopoulos G, Valatas V, **Notas G**, Tsirogianni I HNF-1alpha and vHNF genes are up regulated in livers of CCL4 treated rats. J Hepatol 38: 247 Suppl. 2 APR 2003
9. Chatzikostas C, Roussomoustakaki M, **Notas G**, Mouzas I, Koutroubakis I, Spanoudakia S, Romanos J, Kouroumalis H. Prediction of severity, organ failure and gland necrosis development in acute pancreatitis: A prospective comparison of four prognostic scoring systems. Gastroenterology 124 (4): A398-A399 Suppl. S APR 2003
10. **Notas G**, Kolios G, Mastrodimou N, Kampa M, Xidakis C, Thermos K, Castanas E, Kouroumalis E. Cortistatin production by HepG2 hepatocellular carcinoma cell line and distribution of Somatostatin receptors. Gut 52 (suppl VI) A72 NOV 2003
11. Kolios G., Bourikas L., Manousou P., Tsagarakis N., **Notas G.**, Xidakis C., Mouzas I., Kouroumalis E. Ciprofloxacin inhibits cytokine induced nitric oxide production in a human colonic epithelial cell line HT-29. Gut 52 (suppl VI) A59 NOV 2003

12. Dimoulios P.D., **Notas G.**, Xidakis C., Tsagarakis N., Koulentaki M., Chatzikostas C., Kolios G., Kouroumalis E. Plasma levels of circulating Endothelins and Nitrates/Nitrites in patients with Primary Biliary Cirrhosis. Gut 52 (suppl VI) A163 NOV 2003
13. Kolios G., Kotzampassi K., **Notas G.**, Papanastasiou E., Manousou P., Tsagarakis N., Kouroumalis E., Eleftheriadis E. Nitric Oxide production in postoperative sepsis - The influence of enteral nutrition. Gut 52 (suppl VI) A229 NOV 2003
14. Papageorgiou M, Stiakaki E, Dimitriou H, Malliaraki N, **Notas G**, Castanas E, Kalmanti M. Cancer chemotherapy reduces plasma total antioxidant capacity in children with malignancies. BLOOD 102 (11): 4690 Part 2 NOV 16 2003
15. Kotzampassi K, Kolios G, Manousou P, **Notas G**, Tsagarakis N, Kouroumalis E, Eleftheriadis E. Enteral nutrition affects nitric oxide levels in peripheral blood and liver after a postoperative sepsis. SHOCK 21: 375 Suppl. 1 2004
16. Dimitriou H, Kampa M, **Notas G**, Kouroumalis E, Castanas E, Kalmanti M. Opioids induce a reversible inhibition of haemopoietic progenitor cell growth. BONE MARROW TRANSPLANTATION 33: S307-S307 Suppl. 1 MAR 2004
17. Dimoulios F, Kolios G, **Notas G**, Xidakis C, Tsagarakis N, Kouroumalis A, Kouroumalis E Increased circulating endothelin-2 may be a fundamental abnormality in primary biliary cirrhosis. J Hepatol 40: 545 Suppl. 1 APR 2004
18. Valatas V, Kolios G, **Notas G**, Xidakis C, Manousou P, Tsagarakis N, Kouroumalis E. Nitric oxide and MCP-1 regulation in LPS activated rat Kupffer cells. J Hepatol 40: 535 Suppl. 1 APR 2004
19. Manousou P, **Notas G**, Valatas V, Xidakis C, Kolios G, Kouroumalis E Kupffer cells production of nitric oxide (NO) is modulated by octreotide. J Hepatol 40: 531 Suppl. 1 APR 2004

#### E) Πλήρεις δημοσιεύσεις στα Ελληνικά

1. Χ. Λιονής, Α. Κούτης, Φ. Αναστασίου, Ι. Βλαχάκης, Γ. Μιχαλόπουλος, Ε. Ναθαναηλίδης, **Γ. Νότας**, Δ. Παπαδημητριάδης, Ν. Σαρουλάκης, Μ. Φιορέτος : Νέες εκπαιδευτικές μέθοδοι για τη σχέση γιατρού-ασθενούς στην προπτυχιακή ιατρική εκπαίδευση. Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας Τόμος 6, Τεύχος 2, 93-96, 1994 (παρουσιάστηκε ως εργασία στο Πανελλήνιο συνέδριο Γενικής Ιατρικής, Πόρτο Καρράς Χαλκιδικής 1994)

#### ΣΤ) Εργασίες σε Διεθνή Συνέδρια

1. C. Lionis, A. Koutis, F. Anastasiou, L. Vlahakis, A. Dimitrakaki, **G. Notas**, D. Papadimitriadis, N. Saroulakis, M. Fioretos. New Methods for Teaching Postgraduate Medical Students in Doctor-Patient Relationship. ("Changing medical Education in Europe", Athens 4-7 September 1994, abstract No 2C1)
2. **G. Notas**, V. Valatas, C. Xidakis, A. Kouroumalis, M Koulentaki, E. Kouroumalis (1999) : Circulating Endothelin 1 and Nitric Oxide in Primary Biliary Cirrhosis. (Annual Meeting of the British Gastroenterology Society, London 1999)
3. A. Vasilaki; **G. Notas**; S. Schulz; E. Kouroumalis; K. Thermos Mapping of Somatostatin receptors in the rat retina and colocalization with NADPH-Diaphorase.

- Effect of Somatostatin on Nitric Oxide production. (31<sup>st</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience's San Diego, CA, November 10 - 15, 2001)
4. Kouroumalis E, Matrella E, Valatas V, **Notas G**, Roumpaki H, Xidakis C, Hatzidakis A, Mouzas I (2001) : Bolus somatostatin but not octreotide reduces hepatic sinusoidal pressure by a NO-independent mechanism in chronic liver disease. (Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Prague 2001)
  5. Chatzikostas C, **Notas G**, Roussomoustakaki M, Mouzas I, Koutroubakis I, Skordilis P, Matrella E, Dimoulios F, Theodoropoulou A, Samonakis D, Vardas E, Antoniou P, Kouroumalis E Prediction of severity in acute pancreatitis: A comparative study of Ranson's score and 24 and 48 hours APACHE II and III scoring systems (British Society of Gastroenterology Meeting Birmingham March 2002)
  6. Chatzikostas C, Roussomoustakaki M, **Notas G**, Vlachonikolis GI, Matrella E, Samonakis D, Vardas E, Kouroumalis E Prognostic accuracy of APACHE III scoring system is greater than that of the conventional Child-Pugh's score in predicting short-term hospital mortality of non intensive care unit patients with liver cirrhosis (British Society of Gastroenterology Meeting Birmingham March 2002)
  7. **Notas G**, Kampa M, Xidakis C, Valatas V, Vasilaki A, Thermos K, Kolios G, Castanas E, Kouroumalis E. Octreotide and opioids inhibit the proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma (HCC) cell line HepG2 with concurrent increase of nitric oxide (NO) production (Somatostatin receptor physiology and targets for somatostatin analogue therapy. Barcelona 2002 )
  8. Valatas V, Kolios G, **Notas G**, Xidakis C, Kouroumalis EA. Octreotide inhibits inflammatory mediators production in rat Kupffer cells. (Somatostatin receptor physiology and targets for somatostatin analogue therapy. Barcelona 2002 )
  9. Valatas V, Kolios G, **Notas G**, Xidakis C, Kouroumalis EA Octreotide regulates CC but not CXC LPS-induced chemokine secretion in rat Kupffer cells. EASL Geneva 2003
  10. **Notas G**, Kampa M, Vasilaki A, Xidakis C, Valatas V, Thermos K, Kolios G, Castanas E, Kouroumalis E Octreotide and opioids reduce the rate of proliferation of human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line HepG2, with parallel increase of nitric oxide (NO) production. EASL Geneva 2003
  11. Diamantis I, Karamitopoulou E, Christodouloupoulos G, Valatas V, **Notas G**, Tsirogianni I HNF-1alpha and vHNF genes are up regulated in livers of CCL4 treated rats. EASL Geneva 2003
  12. Chatzikostas C, Roussomoustakaki M, **Notas G**, Mouzas I, Koutroubakis I, Spanoudakia S, Romanos J, Kouroumalis H. Prediction of severity, organ failure and gland necrosis development in acute pancreatitis: A prospective comparison of four prognostic scoring systems. DDW 2003
  13. **Notas G**, Kolios G, Mastrodimou N, Kampa M, Xidakis C, Thermos K, Castanas E, Kouroumalis E. Cortistatin production by HepG2 hepatocellular carcinoma cell line and distribution of Somatostatin receptors. 11<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week – Madrid 11/2003 **ABSTRACT AWARD**
  14. Kolios G., Bourikas L., Manousou P., Tsagarakis N., **Notas G.**, Xidakis C., Mouzas I., Kouroumalis E. Ciprofloxacin inhibits cytokine induced nitric oxide production in a human colonic epithelial cell line HT-29. 11<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week – Madrid 11/2003
  15. Dimoulios P.D., **Notas G.**, Xidakis C., Tsangarakis N., Koulentaki M., Chatzikostas C., Kolios G., Kouroumalis E. Plasma levels of circulating Endothelins and Nitrates/Nitrites in patients with Primary Biliary Cirrhosis. 11<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week – Madrid 11/2003

16. Kolios G., Kotzampassi K., **Notas G.**, Papanastasiou E., Manousou P., Tsagarakis N., Kouroumalis E., Eleftheriadis E. Nitric Oxide production in postoperative sepsis - The influence of enteral nutrition. 11<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week – Madrid 11/2003
17. Papageorgiou M, Stiakaki E, Dimitriou H, Malliaraki N, **Notas G**, Castanas E, Kalmanti M. Cancer chemotherapy reduces plasma total antioxidant capacity in children with malignancies. BLOOD 102 (11): 4690 Part 2 NOV 16 2003
18. Kotzampassi K, Kolios G, Manousou P, **Notas G**, Tsagarakis N, Kouroumalis E, Eleftheriadis E. Enteral nutrition affects nitric oxide levels in peripheral blood and liver after a postoperative sepsis. SHOCK 21: 375 Suppl. 1 2004
19. Dimitriou H, Kampa M, **Notas G**, Kouroumalis E, Castanas E, Kalmanti M. Opioids induce a reversible inhibition of haemopoietic progenitor cell growth. BONE MARROW TRANSPLANTATION 33: S307-S307 Suppl. 1 MAR 2004
20. Dimoulios F, Kolios G, **Notas G**, Xidakis C, Tsagarakis N, Kouroumalis A, Kouroumalis E Increased circulating endothelin-2 may be a fundamental abnormality in primary biliary cirrhosis. EASL Berlin 2004
21. Valatas V, Kolios G, **Notas G**, Xidakis C, Manousou P, Tsagarakis N, Kouroumalis E. Nitric oxide and MCP-1 regulation in LPS activated rat Kupffer cells. EASL Berlin 2004
22. Manousou P, **Notas G**, Valatas V, Xidakis C, Kolios G, Kouroumalis E Kupffer cells production of nitric oxide (NO) is modulated by octreotide. EASL Berlin 2004

#### Z) Εργασίες σε Ελληνικά Συνέδρια

1. **Γ. Νότας**, Α. Κουρούμαλης, Κ. Ξυδάκης, Β. Βαλάτας, Γ. Αλεξανδράκης, Ε. Ματρέλλα, Η. Κουρούμαλης (1999) Επίπεδα ενδοθηλίνης-1 και νιτρικού οξειδίου σε χρόνια ενεργό ηπατίτιδα C προ και μετά θεραπεία με ιντερφερόνη Περιλήψεις 6<sup>ου</sup> Ηπατολογικού Συνεδρίου, Θεσσαλονίκη. Ελληνική Ιατρική 65 (suppl. 1): 29: σελ. 258
2. Β. Βαλάτας, Κ. Ξυδάκης, Α. Κουρούμαλης, Γ. Αλεξανδράκης, Ε. Ματρέλλα, **Γ. Νότας**, Η. Κουρούμαλης (1999) Λευκοτριένες του ορρού στην χρόνια ενεργό ηπατίτιδα (ΧΕΗ). Επίδραση της θεραπείας με ιντερφερόνη Περιλήψεις 6<sup>ου</sup> Ηπατολογικού Συνεδρίου, Θεσσαλονίκη. Ελληνική Ιατρική 65 (suppl. 1): 41: σελ. 261
3. **Γ. Νότας**, Μ. Κουλεντάκη, Κ. Ξυδάκης, Β. Βαλάτας, Η. Κουρούμαλης (1999) Επίπεδα Νιτρικού Οξειδίου ορρού (NO) σε οξεία ιογενή ηπατίτιδα. Περιλήψεις 6<sup>ου</sup> Ηπατολογικού Συνεδρίου, Θεσσαλονίκη. Ελληνική Ιατρική 65 (suppl. 1): 42: σελ. 258
4. **Γ. Νότας**, Α. Κουρούμαλης, Β. Βαλάτας, Κ. Ξυδάκης, Μ. Κουλεντάκη, Η. Κουρούμαλης (1999) Επίπεδα ενδοθηλίνης-1 και νιτρικού οξειδίου σε πρωτοπαθή χολική κίρρωση. Περιλήψεις 6<sup>ου</sup> Ηπατολογικού Συνεδρίου, Θεσσαλονίκη. Ελληνική Ιατρική 65 (suppl. 1): 73: σελ. 269
5. **Γ. Νότας**, Α. Κουρούμαλης, Κ. Ξυδάκης, Β. Βαλάτας, Ε. Οικονομάκη, Ε. Ματρέλλα, Γ. Αλεξανδράκης, Η. Κουρούμαλης (1999) Επίπεδα ενδοθηλίνης-1 και νιτρικού οξειδίου σε κίρρωση και σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚ) Περιλήψεις 6<sup>ου</sup> Ηπατολογικού Συνεδρίου, Θεσσαλονίκη. Ελληνική Ιατρική 65 (suppl. 1): 74: σελ. 269
6. Β. Βαλάτας, Κ. Ξυδάκης, Α. Κουρούμαλης, **Γ. Νότας**, Γ. Αλεξανδράκης, Χ. Λεοντίδης, Η. Κουρούμαλης (1999) Μεταλλοπρωτεϊνάσες και αναστολείς τους στον

- ορρό ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΠΚ). Περιλήψεις 6<sup>ου</sup> Ηπατολογικού Συνεδρίου, Θεσσαλονίκη. Ελληνική Ιατρική 65 (suppl. 1): 81: σελ. 271
7. Ε. Οικονομάκη, **Γ. Νότας**, Κ. Ξυδάκης, Β. Βαλάτας, Η. Κουρούμαλης (1999) Η οξεία χορήγηση αιθανόλης επηρεάζει την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) στην χρόνια ηπατοπάθεια Περιλήψεις 6<sup>ου</sup> Ηπατολογικού Συνεδρίου, Θεσσαλονίκη. Ελληνική Ιατρική 65 (suppl. 1): 94: σελ. 274
  8. Ε. Οικονομάκη, Α. Κουρούμαλης, Κ. Ξυδάκης, Β. Βαλάτας, **Γ. Νότας**, Η. Κουρούμαλης (1999) Η οξεία χορήγηση αιθανόλης στις χημειοκίνες RANTES και MIP-1a επί χρόνιας ηπατοπάθειας. Περιλήψεις 6<sup>ου</sup> Ηπατολογικού Συνεδρίου, Θεσσαλονίκη. Ελληνική Ιατρική 65 (suppl. 1): 95: σελ. 274
  9. Κ. Ξυδάκης, Ε. Οικονομάκη, Β. Βαλάτας, **Γ. Νότας**, Ε. Ματρέλλα, Π. Παπακυριακού, Η. Κουρούμαλης (1999) Διαχρονική μεταβολή των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9 στη χρόνια ηπατοπάθεια μετά από οξεία χορήγηση αιθανόλης. Περιλήψεις 6<sup>ου</sup> Ηπατολογικού Συνεδρίου, Θεσσαλονίκη. Ελληνική Ιατρική 65 (suppl. 1): 96: σελ. 274
  10. Κ. Ξυδάκης, Α. Κουρούμαλης, Β. Βαλάτας, **Γ. Νότας**, Η. Κουρούμαλης (1999) Σύγκριση δύο μεθόδων προσδιορισμού γελατινασών (MMP2-MMP9) σε ηπατοπάθειες. Περιλήψεις 6<sup>ου</sup> Ηπατολογικού Συνεδρίου, Θεσσαλονίκη. Ελληνική Ιατρική 65 (suppl. 1): 102: σελ. 276
  11. Χατζηκώστας Κ., **Νότας Γ.**, Ρουσομουστακάκη Μ., Κουτρομπάκης Ι., Ματρέλλα Ε., Μουζάς Ι., Κουρούμαλης Η.(2000): Τα κριτήρια Ranson, Apache II και III ως προγνωστικοί δείκτες της διαρκείας νοσηλείας ασθενών με οξεία παγκρεατίτιδα. Annals of Gastroenterology : 13(Suppl 2): 60
  12. Βαλάτας Β, Κουλεντάκη Μ, Ξυδάκης Κ, **Νότας Γ**, Παπακυριάκου Π, Μουζάς Ι, Κουρούμαλης Η (2001). Μεταλλοπρωτεάσες και αναστολείς τους στην οξεία ιογενή ηπατίτιδα. Περιλήψεις 7<sup>ου</sup> Ηπατολογικού Συνεδρίου, Αθήνα Ελληνική Ιατρική
  13. Ξυδάκης Κ, Βαλάτας Β, Ματρέλλα Μ, **Νότας Γ**, Παπακυριάκου Π, Αλεξανδράκης Γ, Κουρούμαλης Η (2001). Η οξεία επίδραση της σωματοστατίνης στις μεταλλοπρωτεάσες και τους αναστολείς τους επί χρόνιας ιογενούς ηπατοπάθειας. Περιλήψεις 7<sup>ου</sup> Ηπατολογικού Συνεδρίου, Αθήνα. Ελληνική Ιατρική
  14. Βαλάτας Β, Ματρέλλα Ε, **Νότας Γ**, Ρουμπάκη Χ, Ξυδάκης Κ, Χατζηδακής Α, Παπακυριάκου Π, Κουρούμαλης Η (2001). Η φυσική σωματοστατίνη αλλά όχι η οκτρεοτίδη μειώνει την πίεση των κολποειδών στην κίρρωση με μηχανισμό ανεξάρτητο του NO. Περιλήψεις 7<sup>ου</sup> Ηπατολογικού Συνεδρίου, Αθήνα. Ελληνική Ιατρική
  15. Ξυδάκης Κ, Βαλάτας Β, **Νότας Γ**, Παπακυριάκου Π, Αλεξανδράκης Γ, Οικονομάκη Ε, Κουρούμαλης Η (2001). Επίδραση της ιντερφερόνης στις μεταλλοπρωτεάσες και τους αναστολείς τους επί χρόνιας ηπατίτιδος C. Περιλήψεις 7<sup>ου</sup> Ηπατολογικού Συνεδρίου, Αθήνα. Ελληνική Ιατρική
  16. Χατζηκώστας Κ, Ρουσομουστακάκη Μ, **Νότας Γ**, Κουτρομπάκης Ι, Σαμωνάκης Δ, Κουρούμαλης Ε Child-Pugh και Apache-III προγνωστική αξία σε νοσηλεύομενους Κίρρωτικούς. Περιλήψεις 7<sup>ου</sup> Ηπατολογικού Συνεδρίου, Αθήνα. Ελληνική Ιατρική
  17. Καμπά Μ., Νιστικάκη Ν., Τσαούσης Β., Μαλιαράκη Ν., **Νότας Γ.**, Καστανάς Η. Η Διορθωμένη Αντιοξειδωτική Ικανότητα του Πλάσματος σαν νέα παράμετρος υπολογισμού της οξειδοαναγωγικής στάθμης του οργανισμού : Μεθοδολογική και Κλινική προσέγγιση. Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας Αθήνα 2002
  18. Α.Φ. Νιφλή, Μ. Καμπά, Β.-Ι. Αλεξάκη, **Γ. Νότας**, Α. Νιστικάκη, Α. Χατζόγλου, Ε.Μπακογεώργου, Ε. Κουίμτζόγλου, Γ. Μπλέκας, Δ. Μπόσκου, Α. Γραβάνης και Η. Καστανάς. Μηχανισμοί Μετάδοσης Σήματος των φαινολικών οξέων σε ανθρώπινα

καρκινικά κύτταρα μαστού σειράς T47D. 55<sup>ο</sup> συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μορικής Βιολογίας – Αθήνα 11/2003. HSBMB Newsletter Vol 50 439-442

19. **Γ. Νότας**, Μ. Καμπά, Φ. Νιφλή, J. Vercauteren, Η. Κουρούμαλης, Η. Καστανάς. Οι πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού είναι ισχυροί αναστολείς του πολλαπλασιασμού της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2. 55<sup>ο</sup> συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μορικής Βιολογίας – Αθήνα 11/2003. HSBMB Newsletter Vol 50 454-460

## 6. ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΕΙΣ

1. Χρηματοδότηση με 13.000 Ευρώ από το INSTITUT EUROPEEN VIN ET SANTE DES REGIONS VITICOLES για μελέτη με θέμα Interaction of wine phenolic antioxidants with the Nitric Oxide/Nitric Oxide Synthases system in Breast, Prostate and Hepatocellular cancer (2001-2002)

## 7. ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

### A. Βραβεία

1. 1<sup>ο</sup> Βραβείο ελεύθερης ανακοίνωσης, 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής, 1994 Χαλκιδική, (βλέπε 11.E.1)
2. 2<sup>ο</sup> Βραβείο ελεύθερης ανακοίνωσης στο 7ο Ηπατολογικό συνέδριο, 2001 Αθήνα (βλέπε 11.Z.14)
3. Travel Grant για την συμμετοχή στη συνάντηση νέων ερευνητών Somatostatin receptor physiology and targets for somatostatin analogue therapy. Βαρκελώνη 31 Οκτωβρίου- 3 Νοεμβρίου 2002.
4. Abstract Award και Travel Grant νέων ερευνητών από την Ευρωπαϊκή εταιρία Γαστρεντερολογίας για την συμμετοχή στο Ετήσιο Συνέδριο της (βλέπε 11.ΣΤ.13)

### B. Υποτροφίες

1. Υποτροφία Μανασάκη για Μεταπτυχιακούς φοιτητές του Πανεπιστημίου Κρήτης 2002-2003

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
A. ΤΟ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ	2
1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	2
1.1. Επίπτωση	2
1.2. Παράγοντες κινδύνου	2
2. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	3
3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΗΚΚ	5
3.1. Κλινικά Χαρακτηριστικά.	5
3.2. Φυσικά Ευρήματα.	6
3.3. Εργαστηριακά ευρήματα.	6
3.4. Διαγνωστικά ζητήματα	7
3.5. Ορολογικοί δείκτες	7
3.6. Απεικονιστικές μελέτες	8
3.7. Ιστοπαθολογία	8
3.8. Προγράμματα πρόωμης διάγνωσης (Screening)	9
4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ	10
4.1. Τοπικές Θεραπείες	10
4.1.1. Χειρουργική αφαίρεση και μεταμόσχευση ήπατος	11
4.1.2. Διαδερμικές Θεραπείες	12
4.2. Συστηματικές Θεραπείες	12
4.2.1. Συστηματική χημειοθεραπεία	12
4.2.2. Η ιντερφερόνη α (IFN-α).	13
4.2.3. Χημειοανοσοθεραπεία.	13
4.2.4. Ορμονοθεραπεία	13
4.2.4.1. Αναστολείς υποδοχέων οιστρογόνων	14
4.2.4.2. Τα ανάλογα σωματοστατίνης	14
4.2.4.3. Συνδυασμός οκτρεοτίδης και ταμοξιφένης	15
5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΗΚΚ	16
5.1. Σε πειραματόζωα	16
5.1.1. Χημικά προκαλλούμενο ΗΚΚ	16
5.1.2. Γονιδιακά προκαλούμενο ΗΚΚ	18
5.1.3. Μοντέλα εμβολισμού ΗΚΚ σε πειραματόζωα	20
5.2. Κυτταρικές σειρές ΗΚΚ	21
B. Η ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ	23
1. Τα φυσικά σωματοστατινεργικά πεπτίδια	23
1.1. Σωματοστατίνη	23
1.2. Κορτιστατίνη	25
2. Οι υποδοχείς Σωματοστατίνης	26
2.1. Γονιδιακή Πολλαπλότητα	26
2.2. Φαρμακολογία των υποδοχέων σωματοστατίνης και ανάλογα σωματοστατίνης	29
2.3. Μηχανισμοί μετάδοσης σήματος των υποδοχέων σωματοστατίνης	33
2.4. Ιστική κατανομή των υποδοχέων σωματοστατίνης	35
2.4.1. ΚΝΣ	35
2.4.2. Περιφερικοί ιστοί	36
2.4.3. Έκφραση ssts από νεοπλασματικούς ιστούς.	38
3. Δράση της Σωματοστατίνης, της Κορτιστατίνης και των αναλόγων τους	39
3.1. Φυσιολογικός Ρόλος	39
3.1.1. Σωματοστατίνη	39
3.1.2. Κορτιστατίνη	40
3.2. Σωματοστατινεργικά πεπτίδια και καρκίνος	41
3.2.1. Πειραματικά μοντέλα	41
3.2.2. Θεραπευτικές Εφαρμογές	42
3.2.3. Διαγνωστικές Εφαρμογές	44

C.	ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ	45
1.	Τα οπιοειδή	45
1.1.	Ενδογενή οπιοειδή	45
1.2.	Εξωγενή οπιοειδή	46
2.	Υποδοχείς οπιοειδών.	47
2.1.	Οι μ-υποδοχείς οπιοειδών	48
2.2.	Οι δ-υποδοχείς οπιοειδών	51
2.3.	Οι κ-υποδοχείς οπιοειδών	53
3.	Σχέση οπιοειδών με τον καρκίνο	55
4.	Σχέση υποδοχέων οπιοειδών με τους υποδοχείς σωματοστατίνης	56
	<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	59
A.	ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	60
B.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	61
I.	ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	61
II.	ΜΕΘΟΔΟΙ	62
1.	Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών	62
2.	Μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων με την τεχνική μεταβολισμού του MTT	64
3.	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά Bradford	66
4.	Απομόνωση RNA από τα κύτταρα HepG2	67
5.	Επίδραση με DNάση, ανάστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.	69
6.	Μελέτες δέσμευσης για την ανίχνευση υποδοχέων	73
6.1.	Ανίχνευση ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα HepG2 και ανίχνευσης πρόσδεσης οπιοειδών στους υποδοχείς σωματοστατίνης.	73
6.2.	Ανίχνευση υποδοχέων οπιοειδών στα κύτταρα HepG2	77
7.	Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα HepG2 - Μικροσκοπία συνεστίασης	80
8.	Ραδιοανοσοανίχνευση και μέτρηση της εκκρινόμενης ποσότητας του πεπτιδίου κορτιστατίνη από τα κύτταρα HepG2	83
9.	Μελέτη της παραγωγής μεταβολιτών του μονοξειδίου του αζώτου	85
10.	Στατιστική Ανάλυση	87
C.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	88
1.	Μελέτης της έκφρασης και παρουσίας υποδοχέων σωματοστατίνης στην κυτταρική σειρά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2	88
1.1.	Ανίχνευση έκφρασης του mRNA των υποδοχέων σωματοστατίνης με PCR.	88
1.2.	Ανίχνευση των υποδοχέων σωματοστατίνης με μικροσκοπία συνεστίασης και ανοσοφθορισμό.	90
1.2.1.	Ανίχνευση υποδοχέα sst <sub>2A</sub>	91
1.2.2.	Ανίχνευση υποδοχέα sst <sub>3</sub>	92
1.2.3.	Ανίχνευση υποδοχέα sst <sub>5</sub>	93
1.3.	Ανίχνευση λειτουργικών θέσεων σύνδεσης ssts στις μεμβράνες των κυττάρων HepG2 με δοκιμασίες δέσμευσης ραδιενεργού SRIF.	94
2.	Επίδραση της οκτρεοτίδης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2.	96
3.	Μελέτη του ρόλου των Πρωτεϊνικών Φωσφοτυροσινικών Φωσφατασών (PTPs) στην αντιπολλαπλασιαστική δράση της οκτρεοτίδης στα κύτταρα HepG2.	98
4.	Μελέτη της παραγωγής φυσικών σωματοστατινεργικών πεπτιδίων από τα κύτταρα HepG2	100
4.1.	Μέτρηση της ανοσοδραστικότητας τύπου σωματοστατίνης στα κύτταρα HepG2	100
4.2.	Ανίχνευση του mRNA των φυσικών σωματοστατινεργικών πεπτιδίων SRIF και CST με PCR	101
4.3.	Ποσοτικοποίηση της παραγωγής CST από τα κύτταρα HepG2	102
5.	Τα κύτταρα HepG2 δεν φέρουν τον υποδοχέα MrgX2	103
6.	Ρόλος της κορτιστατίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2	104
7.	Επίδραση των οπιοειδών στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2	106
8.	Μελέτη της έκφρασης και παρουσίας υποδοχέων οπιοειδών στην κυτταρική σειρά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2	110
8.1.	Ανίχνευση έκφρασης του mRNA των υποδοχέων οπιοειδών με RT-PCR.	110



8.2.	Ανίχνευση των υποδοχέων οπιοειδών με δοκιμασίες δέσμευσης	112
9.	Μελέτη της αλληλεπίδρασης του οπιοειδούς πεπτιδίου ΕΚC με τους υποδοχείς σωματοστατίνης στα κύτταρα HepG2.	114
10.	Μελέτη του ρόλου των Πρωτεϊνικών Φωσφοτυροσινικών Φωσφατασών (PTPs) στην αντιπολλαπλασιαστική δράση της ΕΚC στα κύτταρα HepG2.	116
11.	Επίδραση της οκτρεοτίδης και των οπιοειδών στην παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO)	118
11.1.	Επίδραση της οκτρεοτίδης στην παραγωγή NOx	118
11.2.	Επίδραση των οπιοειδών στην παραγωγή NOx	119
12.	Επίδραση της αναστολής του NO στο αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της οκτρεοτίδης και της ΕΚC.	120
12.1.	Επίδραση του L-NAME στο αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της οκτρεοτίδης.	120
12.2.	Επίδραση του L-NAME στο αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της ΕΚC.	121
D.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	122
1.	Μελέτη της έκφρασης και παρουσίας υποδοχέων σωματοστατίνης και σωματοστατινεργικών πεπτιδίων στην κυτταρική σειρά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2	122
2.	Επίδραση της οκτρεοτίδης και της κορτιστατίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2.	128
2.1.	Οκτρεοτίδη	128
2.2.	Κορτιστατίνη	131
3.	Μελέτη της επίδρασης των οπιοειδών στην κυτταρική σειρά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2	133
4.	Επίλογος και μελλοντικές προοπτικές	138
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	140
	ABSTRACT	143
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	145

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

<b>ACTH</b>	<b>Adrenocorticotropin Hormone</b> (Αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη)
<b>APS</b>	<b>Ammonium peroxodisulfate</b> (Υπερθειικό αμμώνιο)
<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>DADLE</b>	<b>(D-Ala<sub>2</sub>, D-Leu<sub>5</sub>)</b> Εγκεφαλίνη
<b>DAGO</b>	<b>(D-Ala<sub>2</sub>-N-Me-Phe<sub>4</sub>, Gly<sub>5</sub>-ol)</b> Εγκεφαλίνη
<b>DMSO</b>	<b>Dimethyl sulfoxide</b> (.ιμεθυλσουλφοξύδιο)
<b>DNA</b>	<b>Desoribonucleic acid</b> (.εσοξυριβονουκλεϊκό οξύ)
<b>DPDPE</b>	<b>(D-Pen<sub>2</sub>, D-Pen<sub>5</sub>)</b> Εγκεφαλίνη
<b>DSLET</b>	<b>(D-Ser<sub>2</sub>, Leu<sub>5</sub>)</b> Εγκεφαλίνη
<b>DTT</b>	<b>Dithiothreitol</b> (.ιθειοθρεϊτόλη)
<b>EDTA</b>	<b>Ethylenediaminetetraacetic acid</b> (Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)
<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 Ανοσοπροσοφίτικη Μέτρηση)
<b>FAD</b>	<b>Flavin Adenine Dinucleotide</b> (Φλαβινο-αδενο-δινουκλεοτίδιο)
<b>FBS</b>	<b>Fetal bovine serum</b> (Ορός εμβρύου βοός)
<b>FITC</b>	<b>Fluorescein isothiocyanate</b> (Ισοθειοκυανιούχος φλουοροσκεΐνη)
<b>GDP</b>	<b>Guanosine diphosphate</b> (.ιφωσφορική γουανοσίνη)
<b>GF/B</b>	<b>Glass fibre filters</b> (Φίλτρα ινών υάλου)
<b>GTP</b>	<b>Guanosine triphosphate</b> (Τριφωσφορική γουανοσίνη)
<b>HepG2</b>	Κυτταρική σειρά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος
<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>KNS</b>	<b>Κεντρικό Νευρικό Σύστημα</b>
<b>MAP</b>	<b>Mitogen Activated Protein</b> (Πρωτεΐνη που ενεργοποιείται από μιτογόνους παράγοντες)
<b>mRNA</b>	<b>messenger RNA</b> (Αγγελιοφόρος RNA)
<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>NO</b>	<b>Nitric Oxide</b> (Ελεύθερη ρίζα 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>PCR</b>	<b>Polymerase Chain Reaction</b>
<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>PTP</b>	<b>Phosphotyrosine Phosphatases</b> (Φωσφοτυροσινικές Φωσφατάσες)
<b>RNA</b>	<b>Ribonucleic Acid</b> (ΡΙβονουκλεϊκό οξύ)
<b>RPMI</b>	<b>RPMI Medium 1640</b> (Θρεπτικό υλικό)
<b>SRIF</b>	<b>Somatotropin Release Inhibitory Factor</b> (Σωματοστατίνη)
<b>sst</b>	<b>Somatostatin Receptor</b> (Υποδοχείς σωματοστατίνης)
<b>TBS</b>	<b>Tris Buffered Saline</b> (Ρυθμιστικό διάλυμα Tris)
<b>TNF</b>	<b>Tumor Necrosis Factor</b> (Ογκονεκρωτικός παράγοντας)

- **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **A. ΤΟ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ**

### **1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ**

#### **1.1. Επίπτωση**

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) είναι ένα νεόπλασμα η επίπτωση του οποίου αυξάνεται παγκοσμίως. Αντιπροσωπεύει πάνω από το 5% όλων των καρκίνων και ο κατ'εκτίμηση ετήσιος αριθμός των περιπτώσεων υπερβαίνει τις 500.000. Ταυτόχρονα παρατηρούνται εντυπωσιακές γεωγραφικές διαφορές τόσο στους παράγοντες κινδύνου με τους οποίους σχετίζεται, όσο και στην επίπτωσή του. Συνήθως εμφανίζεται σε ασθενείς με κίρρωση ήπατος και αποτελεί την πίο συχνή αιτία θανάτου για αυτούς τους ασθενείς (1).

Η επίπτωση του ΗΚΚ στις αναπτυσσόμενες χώρες είναι δύο έως τρεις φορές υψηλότερη σε σχέση με τις αναπτυγμένες χώρες. Στην ανατολική Ασία και στην μέση Αφρική το σταθμιζόμενο με βάση την ηλικία ποσοστό επίπτωσης (Age Adjusted Incidence Rate – AAIR) κυμαίνεται από 20 έως 28 περιπτώσεις ανά 100000 άτομα, ενώ είναι λιγότερο από 5 περιπτώσεις ανά 100000 άτομα στη βόρεια Ευρώπη, την Αυστραλία και την Αμερική (1;2). Εντούτοις, μια σταθερή αύξηση έχει παρατηρηθεί στη Βόρεια Αμερική (3), αλλά οι αριθμοί είναι ακόμα χαμηλότεροι απ' ό,τι στη νότια Ευρώπη όπου το AAIR είναι περίπου δέκα ανά 100000 άτομα (4).

#### **1.2. Παράγοντες κινδύνου**

Το ανδρικό φύλο συνδέεται με μια υψηλότερη συχνότητα ΗΚΚ (5). Η επίπτωση αυξάνεται επίσης με την ηλικία, πιθανώς λόγω της παρουσίας σε μεγαλύτερες ηλικίες περισσότερων ασθενών με παρατεταμένη χρόνια ηπατική νόσο (6). Εντούτοις, ο ισχυρότερος παράγοντας κινδύνου είναι η παρουσία κίρρωσης ήπατος, ανεξάρτητα από την αιτιολογία της (5;7). Η ιογενής και αλκοολική κίρρωση σχετίζονται με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης ΗΚΚ (5;8-10). Στους Καυκάσιους φορείς του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV) το ΗΚΚ εμφανίζεται συχνότερα σε συνθήκες κίρρωσης (11), ενώ στην Αφρική και τη Νοτιοανατολική Ασία, όπου η μόλυνση HBV αποκτάται νωρίς στη ζωή και συμπίπτει με άλλους ογκογόνους παράγοντες (αφλατοξίνη) (12), το ΗΚΚ μπορεί να

αναπτυχθεί συχνότερα σε ένα μη-κίρρωτικό ήπαρ (13). Η ετήσια επίπτωση του ΗΚΚ στην ιογενή κίρρωση από HBV υπερβαίνει το 2%, ενώ στους χρόνιους φορείς χωρίς κίρρωση η επίπτωση ποικίλλει μεταξύ 0,4 και 0,6% (11;13-15). Στους ασθενείς με ηπατίτιδα C (HCV) ο αυξημένος κίνδυνος συμπίπτει με την δημιουργία της κίρρωσης, και η ετήσια επίπτωση ποικίλλει μεταξύ 3 και 8% (9-11;16;17). Οι ασθενείς με συγγενής αιμοχρωμάτωση μετά από την ανάπτυξη κίρρωσης, καθώς και οι άνδρες με πρωτοπαθή χολική κίρρωση έχουν υψηλό κίνδυνο για ανάπτυξη ΗΚΚ (18;19). Η επίπτωση του ΗΚΚ σε ασθενείς με αυτοάνοση κίρρωση και νόσο του Wilson δεν έχει προσδιοριστεί επαρκώς αλλά φαίνεται να είναι χαμηλότερη απ' ό,τι σε άλλες ομάδες. Η αφλατοξίνη παίζει κάποιο ρόλο στη δημιουργία του ΗΚΚ μόνο στους ασθενείς με προϋπάρχουσα χρόνια ηπατίτιδα Β (12). Η επίδραση του καπνίσματος είναι δύσκολο να μετρηθεί (20), ενώ η χρόνια λήψη αντισυλληπτικών δεν συνδέεται με υψηλότερη συχνότητα ΗΚΚ (21).

## 2. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Τέσσερα χαρακτηριστικά γνωρίσματα έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικοί καθοριστικοί παράγοντες της επιβίωσης στο ΗΚΚ: η σοβαρότητα της υποκείμενης ασθένειας του ήπατος, το μέγεθος του όγκου, η επέκταση του όγκου στις παρακείμενες δομές, και η παρουσία μεταστάσεων (22;23). Επομένως τα χαρακτηριστικά αυτά θα πρέπει να περιλαμβάνονται σε ένα πλήρες σύστημα σταδιοποίησης του ΗΚΚ. Ωστόσο δεν υπάρχει καθολικά αποδεκτό σύστημα σταδιοποίησης για το ΗΚΚ.

Τα τρέχοντα συστήματα σταδιοποίησης που υπάρχουν σήμερα είναι: (α) η σταδιοποίηση κατά Okuda (πίνακας 1) (22), (β) κατά το σύστημα Child-Pugh, (γ) κατά το σύστημα όγκων λεμφαδένων μεταστάσεων (TNM), (δ) κατά το Ιταλικό πρόγραμμα Καρκίνου του Ήπατος (Cancer of the Liver Italian Program - CLIP) (πίνακας 2) (23), (ε) το κλινικό σύστημα σταδιοποίησης της Βαρκελώνης (24) και (στ) το Ιαπωνικό σύνθετο σύστημα σταδιοποίησης το οποίο προέκυψε από την συγχώνευση του συστήματος TNM και του συστήματος Child-Pugh (Japan Integrated Staging Score - JIS score) (25). Η απουσία καθολικά αποδεκτού συστήματος σταδιοποίησης δημιουργεί ένα μεγάλο

πρόβλημα στη σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφόρων θεραπευτικών δοκιμών.

**Πίνακας 1.** Το σύστημα σταδιοποίησης κατά Okuda

Μεταβλητές	Τιμές	
	0	1
Μέγεθος όγκου	<50% του ήπατος	>50% του ήπατος
Παρουσία ασκίτη	Όχι	Ναι
Αλβουμίνη	≥3,0	<3,0
Χολερυθρίνη	<3,0	>3,0

Στάδια κατά Okuda

Στάδιο 1 = σκορ 0	Στάδιο 2 = σκορ 1 ή 2	Στάδιο 3 = σκορ 3 ή 4
-------------------	-----------------------	-----------------------

**Πίνακας 2.** Σύστημα σταδιοποίησης CLIP

Μεταβλητές	Βαθμοί		
	0	1	2
Στάδιο Child-Pugh	A	B	C
Μορφολογία όγκου	Μονήρης όζος και έκταση σε ≤50% του ήπατος	Πολλαπλοί όζοι και έκταση σε ≤50% του ήπατος	Μαζικό και έκταση σε >50% του ήπατος
AFP (ng/ml)	<400	≥400	
Πυλαία υπέρταση	Ναι	Όχι	

Το πιο κλασικό σύστημα σταδιοποίησης του ΗΚΚ είναι το σύστημα κατά Okuda. Περιλαμβάνει το μέγεθος του όγκου, και τρία μέτρα της βαρύτητας της κίρρωσης (τον ασκίτη, την λευκωματίνη και την χολερυθρίνη ορού). Η επιβίωση για τους μη υποβληθέντες σε θεραπεία ασθενείς ήταν 8.3, 2.0, και 0.7 μήνες για τα στάδια I, II, και III, αντίστοιχα (22). Το σύστημα Okuda δεν στρωματοποιεί τους ασθενείς με βάση την αγγειακή εισβολή ή την παρουσία ή απουσία μεταστάσεων. Το σύστημα CLIP είναι ένα πρόσφατα αναπτυγμένο σύστημα. Συνδυάζει τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του όγκου (μακροσκοπική μορφολογία όγκων, επίπεδα άλφα-εμβρυϊκής σφαιρίνης ορού, παρουσία ή απουσία θρόμβωσης φλεβών) με έναν δείκτη της βαρύτητας της κίρρωσης για να καθορίσει ένα προγνωστικό αποτέλεσμα που κυμαίνεται από 0 έως 6. Διάφορες μελέτες από ποικίλες γεωγραφικές περιοχές έχουν προτείνει ότι το σύστημα CLIP αποδίδει καλύτερα στην πρόβλεψη της επιβίωσης έναντι των συστημάτων TNM, Okuda και Child-Pugh (23;26-28). Σε μια μελέτη τα μέσα ποσοστά επιβίωσης για τους ασθενείς με στάδια CLIP 0, 1, 2, 3, 4, 5 και 6 ήταν 31, 27, 13, 8, 2, και 2 μήνες, αντίστοιχα (23). Τέλος το σύστημα JIS, που είναι και το τελευταίο που έχει αναπτυχθεί, έχει αναφερθεί ότι είναι πιο αποτελεσματικό από το σύστημα CLIP στην ταξινόμηση των ασθενών. Ειδικά για την περίπτωση επιλογής της ομάδας των ασθενών καλύτερης πρόγνωσης το σύστημα JIS αποδίδει σημαντικά καλύτερα από το CLIP. Τα αθροιστικά ποσοστά δεκαετούς επιβίωσης των ασθενών της καλύτερης προγνωστικής ομάδας του κάθε συστήματος ήταν για το μεν CLIP-0 23%, για το δε JIS-0 65%, ( $p < 0.01$ ) (25).

### **3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΗΚΚ**

#### **3.1. Κλινικά Χαρακτηριστικά.**

Οι ασθενείς που αναπτύσσουν ΗΚΚ δεν έχουν συνήθως κανένα σύμπτωμα εκτός από εκείνα που σχετίζονται με τη χρόνια πάθησή τους. Η υποψία για ΗΚΚ προκύπτει σε ασθενείς με προηγουμένως αντιρροπούμενη κίρρωση που εμφανίζουν σημεία ρήξης της αντιρρόπησης όπως ασκίτη, εγκεφαλοπάθεια, ίκτερο, ή κίρροραγία. Αυτές οι επιπλοκές συνδέονται συχνά με την επέκταση του όγκου στις ηπατικές φλέβες ή την πυλαία φλέβα ή αρτηριοφλεβικές αναστομώσεις που προκαλούνται από τον όγκο (29). Μερικοί



ασθενείς εμφανίζονται με ήπια επιγαστραλγία, απώλεια βάρους, μετεωρισμό ή μια προβάλλουσα μάζα στην ανώτερη κοιλία. Αυτά τα συμπτώματα δείχνουν συχνά προχωρημένη νόσο (30).

Άλλες ασυνήθιστες πρώτες εκδηλώσεις ΗΚΚ περιλαμβάνουν: (α) τον χολοστατικό ίκτερο που προκαλείται από την διήθηση του χοληφόρου δέντρου ή σπάνια, ως αποτέλεσμα αιμοχολίας, (β) την διάρροια (31), (γ) οστικά άλγη ή δύσπνοια λόγω μεταστάσεων, (δ) ενδοπεριτοναϊκή αιμορραγία λόγω της ρήξης όγκου. Η ρήξη όγκων συνδέεται συχνά με έντονο κοιλιακό πόνο και υπόταση. Η αξονική τομογραφία καταδεικνύει χαρακτηριστικά μια μάζα ήπατος και ελεύθερο ενδοπεριτοναϊκό αίμα. (ε) παρανεοπλασματικά σύνδρομα (υπογλυκαιμία, ερυθροκυττάρωση, υπερασβεστιαμία ή σοβαρή υδαρής διάρροια).

### **3.2. Φυσικά Ευρήματα.**

Τα φυσικά ευρήματα στους περισσότερους ασθενείς με ΗΚΚ απεικονίζουν την υποκείμενη ηπατική νόσο. Η σπληνομεγαλία, ο ασκίτης, ο ίκτερος ή άλλες εκδηλώσεις της κίρρωσης μπορεί να είναι εμφανείς (32). Η ηπατομεγαλία ή ένα φύσημα που ακούγεται στην περιοχή του ήπατος είναι περιστασιακά παρόντα. Διάφορες δερματικές εκδηλώσεις έχουν περιγραφεί σε συνδυασμό με ΗΚΚ εντούτοις, καμία δεν είναι ειδική (33). Σε αυτές περιλαμβάνονται η δερματομυοσίτιδα, *remphigus foliaceus*, σημείο Leser-Trelat, *Pityriasis rotunda*, *Porphyria cutanea Tarda*.

### **3.3. Εργαστηριακά ευρήματα.**

Οι εργαστηριακές εξετάσεις είναι συνήθως μη ειδικές. Η πλειοψηφία των ασθενών που αναπτύσσουν ΗΚΚ έχει κίρρωση, και μπορεί να έχει θρομβοκυτταροπενία, υπολευκωματιναιμία, υπερχολερυθριναιμία, και διαταραχές της πήξης. Οι ασθενείς είναι συχνά ελαφρά αναιμικοί και μπορεί να παρουσιάζουν διαταραχές ηλεκτρολυτών (π.χ., υπονατριαιμία, υποκαλιαιμία, μεταβολική αλκάλωση). Οι τρανσαμινάσες του ορού, η αλκαλική φωσφατάση και η γάμα-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάση είναι συχνά επηρεασμένες δίχως όμως ο συνδυασμός τους να επιτρέπει την εξαγωγή κάποιου συμπεράσματος (34).

### 3.4. Διαγνωστικά ζητήματα

Η υποψία για ΗΗΚ προκύπτει συχνά σε ασθενείς με υποκείμενη ηπατική νόσο (δηλ. κίρρωση, χρόνια ιογενή ηπατίτιδα) που εμφανίζουν αυξανόμενα επίπεδα άλφα-εμβρυϊκής σφαιρίνης (AFP). Σε τέτοιους ασθενείς, μια αξονική ή μαγνητική τομογραφία είναι συχνά η αρχική διαγνωστική προσέγγιση. Στους κίρρωτικούς ασθενείς, οποιοσδήποτε συμπαγές μόρφωμα που δεν είναι σαφώς ένα αιμαγγείωμα πρέπει να θεωρηθεί ΗΚΚ μέχρι αποδείξεως του εναντίου (35). Εάν η βλάβη έχει αυξημένη αγγείωση, έχει αυξημένο σήμα T2, εμφανίζει εισβολή στα αγγεία ή συνδέεται με υψηλή AFP (>400ng/ml) η διάγνωση είναι σχεδόν σίγουρη, και μια προεγχειρητική βιοψία μπορεί να μην είναι απαραίτητη για να επιβεβαιώσει τη διάγνωση. Η βιοψία μπορεί να είναι επικίνδυνη στους κίρρωτικούς ασθενείς και πρέπει μόνο να εκτελείται όταν θα έχει σημασία στην θεραπευτική προσέγγιση του ασθενούς.

Στις λιγότερο ξεκάθαρες περιπτώσεις, η επανάληψη του απεικονιστικού ελέγχου μπορεί να διευκρινίσει τη διάγνωση αν τα συμπαγή μορφώματα παραμένουν χαρακτηριστικά σταθερά, ενώ η διεύρυνση μιας βλάβης πιθανότατα αντιπροσωπεύει ένα ΗΚΚ. Ακόμη και τα απεικονιστικά σταθερά μορφώματα απαιτούν τη στενή παρακολούθηση, δεδομένου ότι οι ασθενείς αυτοί διατρέχουν μεγάλο κίνδυνο να αναπτύξουν ΗΚΚ στο μέλλον (36).

Για μη-κίρρωτικούς ασθενείς, η διάγνωση ΗΚΚ πρέπει να εξεταστεί για οποιαδήποτε ηπατική μάζα δεν είναι σαφώς ένα αιμαγγείωμα ή μια εστιακή οζώδης υπερπλασία, ειδικά εάν εμφανίζει υπεραγγείωση. Ελλείψει συγκεκριμένων ενδείξεων για την διάγνωση η βιοψία μπορεί να είναι το μόνο κατάλληλο μέσο.

### 3.5. Ορολογικοί δείκτες

Η άλφα-εμβρυϊκή σφαιρίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται κανονικά κατά τη διάρκεια της κύησης από το εμβρυϊκό ήπαρ και τον λεκιθικό σάκκο, της οποίας η συγκέντρωση στον ορό είναι συχνά αυξημένη στους ασθενείς με ΗΚΚ. Τα επίπεδα της AFP δεν συσχετίζονται σημαντικά με άλλα κλινικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα της νόσου, όπως το μέγεθος του όγκου, το στάδιο, ή την πρόγνωση. Υψηλά επίπεδα AFP

εμφανίζονται στην εγκυμοσύνη, στους όγκους του γεννητικού συστήματος καθώς και σε ασθενείς με τη χρόνια παθήσεις ήπατος χωρίς ΗΚΚ όπως η οξεία ή χρόνια ιογενής ηπατίτιδα (37). Τα επίπεδά όμως στις περιπτώσεις αυτές δεν ξεπερνούν τα 400ng/ml.

Μια άνοδος της AFP σε έναν ασθενή με κίρρωση πρέπει να προκαλεί ανησυχία ότι έχει αναπτυχθεί ΗΚΚ. Γενικά είναι αποδεκτό ότι επίπεδα AFP μεγαλύτερα από 400 μg/L (φυσιολογικές τιμές στα περισσότερα εργαστήρια είναι μεταξύ 10 και 20 μg/L) σε έναν υψηλού κινδύνου ασθενή είναι διαγνωστικά του ΗΚΚ (38).

Εντούτοις, ΗΚΚ εντοπίζεται συχνά και με χαμηλότερα επίπεδα AFP (37;39). AFP δεν εκκρίνουν όλοι οι όγκοι και οι συγκεντρώσεις στον ορό είναι φυσιολογικές σε περίπου 40% των μικρού μεγέθους ΗΚΚ (40). Επιπλέον, μια υψηλή AFP μπορεί να είναι συχνότερη σε ασθενείς με ΗΚΚ λόγω ιογενούς ηπατίτιδας σε σχέση με ασθενείς με αλκοολική νόσο ήπατος (41). Μια μετανάλυση 5 μελετών σχετικά με την ευαισθησία και την ειδικότητα της AFP ορού στη διάγνωση του ΗΚΚ, και στην οποία χρησιμοποιήθηκε μια τιμή AFP > 20μg/L ως όριο, κατέληξε ότι η AFP είχε ευαισθησία και ειδικότητα 41-65% και 80-94% αντίστοιχα (42).

### **3.6. Απεικονιστικές μελέτες**

Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες απεικονιστικές μελέτες για τη διάγνωση του ΗΚΚ είναι οι υπέρηχοι, η υπολογιστική τομογραφία, η μαγνητική τομογραφία και η αγγειογραφία. Μια τυπική εικόνα ΗΚΚ σε μια από αυτές τις τεχνικές απεικόνισης που συνδυάζεται με μια αυξημένη συγκέντρωση AFP στο κατάλληλο κλινικό πλαίσιο είναι συνήθως ικανοποιητική για να τεθεί η διάγνωση ΗΚΚ.

### **3.7. Ιστοπαθολογία**

Για να υπάρξει ιστοπαθολογική επιβεβαίωση του ΗΚΚ απαιτείται βιοψία, συχνά υπό απεικονιστική καθοδήγηση, η οποία όμως δεν είναι δίχως κινδύνους. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η αιμορραγία και η μετάδοση του όγκου κατά μήκος της διαδρομής της βελόνας (43;44)

Η ιστολογική εμφάνιση του ΗΚΚ μπορεί να κυμανθεί από καλά διαφοροποιημένος όγκος (με τα μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα να εμφανίζονται σχεδόν ίδια με τα κανονικά ηπατοκύτταρα) έως κακώς διαφοροποιημένος όγκος με μεγάλα πολυπύρρηνα αναπλαστικά γιγαντιαία κύτταρα. Η κεντρική νέκρωση των μεγάλων όγκων είναι συχνή (45).

Σε μερικές περιπτώσεις εντοπίζεται δυσπλασία αντί για καρκίνωμα. Το ζήτημα της χρησιμότητας των διάφορων βαθμών δυσπλασίας στην πρόβλεψη της ανάπτυξης ΗΚΚ είναι υπό συζήτηση.

### **3.8. Προγράμματα πρώιμης διάγνωσης (Screening)**

Διάφορες μελέτες έχουν προσπαθήσει να προσδιορίσουν τους ασθενείς που διατρέχουν το μεγαλύτερο κίνδυνο για ΗΚΚ, γεγονός το οποίο μπορεί να βοηθήσει στην βελτιστοποίηση των προγραμμάτων screening (46-48). Δυστυχώς ο προσδιορισμός των παραγόντων κινδύνου στους ασθενείς που είναι αρκετά υγιείς για να υποβληθούν σε θεραπεία έχει αποδειχθεί δύσκολος.

Το ζήτημα του screening των ασθενών σε κίνδυνο για ΗΚΚ είναι ακόμα υπό συζήτηση από άποψη οικονομικής αποτελεσματικότητας δεδομένου ότι δεν έχει καταδειχθεί με συνέπεια βελτίωση στην επιβίωση των ασθενών (37;49;50).

Η αξία των προγραμμάτων screening ασθενών που είναι χρόνιοι φορείς του ιού ηπατίτιδας Β είναι απογοητευτική (51). Σε μια σειρά 1069 χρόνιων φορέων HBV, η επίπτωση νέου ΗΚΚ ήταν 0,47 τοις εκατό ετησίως (έναντι 1 έως 6 τοις εκατό ετησίως στην κίρρωση (37)) (51). Τιμές AFP πάνω από 20 μg/L είχαν ευαισθησία μόνο 64% για ΗΚΚ και ειδικότητα 91%, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για την υπερηχοτομογραφία ήταν 79 και 94%.

Ακόμη και σε ασθενείς με εγκατεστημένη κίρρωση, το όφελος του screening είναι αβέβαιο (52). Ωστόσο το ΗΚΚ μπορεί να εντοπιστεί σε ένα πιο αρχικό στάδιο στους ασθενείς που υποβάλλονται σε screening. Σε μια μελέτη οι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε screening είχαν σημαντικά μικρότερους όγκους από εκείνους ασθενών

που παρουσίασαν συμπτώματα, ένα όφελος που μετέφρασε σε βελτιωμένη επιβίωση (περίπου 35% έναντι 10% στους 30 μήνες) (53).

Παρά τη σχετική έλλειψη σαφών αποδείξεων, η παρακολούθηση για ΗΚΚ ασθενών με κίρρωση έχει γίνει αποδεκτή από του περισσότερους ηπατολόγους (37;54). Η μέτρηση AFP και η διενέργεια υπερηχοτομογραφίας κάθε έξι μήνες εκτελείται συνήθως σε ασθενείς με Child-Pugh κίρρωση A που είναι κατάλληλοι υποψήφιοι για μερική ηπατεκτομή, μεταμόσχευση ήπατος ή διαδερμική θεραπεία, σε περίπτωση ανίχνευσης ενός ΗΚΚ.

#### **4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Δεν υπάρχει γενικά αποδεκτός αλγόριθμος θεραπείας του ΗΚΚ που να εφαρμόζεται παγκοσμίως. Εάν το ΗΚΚ εντοπίζεται σε αρχικά στάδια, οι ασθενείς πρέπει να προγραμματιστούν για οποιαδήποτε από τις διαθέσιμες επιλογές που μπορούν να παρέχουν ένα υψηλό ποσοστό ίασης. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, οι ασθενείς πρέπει να συμπεριλαμβάνονται σε ερευνητικά πρωτόκολλα, κατά προτίμηση τυφλές τυχαιοποιημένες μελέτες, που στοχεύουν να προσδιορίσουν νέες θεραπείες που μπορεί τελικά να οδηγήσουν σε μια βελτίωση της επιβίωσης.

##### **4.1. Τοπικές Θεραπείες**

Η χειρουργική αφαίρεση, η μεταμόσχευση ήπατος και οι διαδερμικές τεχνικές επιτυγχάνουν ένα σχετικά υψηλό ποσοστό ίασης στους κατάλληλα επιλεγμένους υποψηφίους και πρέπει έτσι να ταξινομηθούν ως θεραπευτικές/αποτελεσματικές επιλογές για το ΗΚΚ. Αυτές οι επιλογές βελτίωσαν τη φυσική ιστορία της ασθένειας, και παρέτειναν την επιβίωση των ασθενών με μονήρη ΗΚΚ μικρότερο από 5 εκατ. ή τρεις όζους ΗΚΚ μικρότερους από 3 εκατ.. Εάν οι μεγαλύτεροι όγκοι μπορούν να αντιμετωπιστούν επιτυχώς δεν έχει διευκρινιστεί. Τυφλές τυχαιοποιημένες μελέτες που συγκρίνουν αυτές τις τρεις επιλογές δεν υπάρχουν και η επιλογή ενός αλγορίθμου πρέπει να βασιστεί στην ανάλυση προοπτικών μελετών (55).

#### 4.1.1. Χειρουργική αφαίρεση και μεταμόσχευση ήπατος

Η θεραπευτική μερική ηπατεκτομή θεωρείται η βέλτιστη θεραπεία (56). Οι ασθενείς με ΗΚΚ που θεωρούνται κατάλληλοι για αυτή τη θεραπευτική επιλογή θα πρέπει να έχουν ένα περιφερικό ΗΚΚ στο ήπαρ τους που δεν παρουσιάζει κανένα ακτινογραφικό στοιχείο εισβολής στο ηπατικό αγγειακό δέντρο, καλά διατηρημένη ηπατική λειτουργία, και κανένα στοιχείο πυλαίας υπέρτασης (56-59). Δυστυχώς, οι περισσότεροι ασθενείς δεν εμπίπτουν σε αυτήν την κατηγορία. Στις περιοχές υψηλής-επίπτωσης της νόσου, μόνο 10 έως 15% των πρόσφατα διαγνωσθέντων ασθενών είναι υποψήφιοι για ηπατεκτομή, ενώ στις περιοχές χαμηλής επίπτωσης, 15 έως και 30% των ασθενών έχουν ενδεχομένως χειρουργήσιμο όγκο (60-64). Επιπλέον, μόνο ο μισός αριθμός των ασθενών που παραπέμπονται σε χειρουργείο έχει πραγματικά χειρουργήσιμους όγκους. Μεταξύ των λόγων για την αδυναμία χειρουργικής αφαίρεσης είναι η πολυεστιακή ενδοηπατική νόσος, η εξωηπατική επέκταση, το ανεπαρκές λειτουργικό υπόλειμμα ήπατος, η αδυναμία διενέργειας της εκτομής με τα κατάλληλα (1 εκατ.) χειρουργικά όρια ελεύθερα όγκου και η συμμετοχή των πυλαίων ή των ηπατικών φλεβών (60;64;65).

Η μεταμόσχευση έχει το πλεονέκτημα της αφαίρεσης του νοσούντος ήπατος μαζί με τον όγκο, ένα θεωρητικό πλεονέκτημα που όμως αποδυναμώνεται από την έλλειψη δοτών. Μετά από τη είσοδό τους στην λίστα για μεταμόσχευση ήπατος, οι ασθενείς πρέπει να περιμένουν ένα ποικίλο χρονικό διάστημα κατά τη διάρκεια του οποίου ο όγκος μπορεί να επεκταθεί (66). Οι ασθενείς με κίρρωση ή με πολυοζιδιακή νόσο (τρεις όζοι <3 εκατ.) δεν πρέπει να υποβάλλονται σε ηπατεκτομή αλλά η μεταμόσχευση ήπατος θα πρέπει να είναι η πρώτη προσέγγιση. Η πενταετής επιβίωση των ασθενών που μεταμοσχεύονται λόγω ΗΚΚ είναι ίδια με αυτήν των ασθενών που υπεβλήθησαν σε μεταμόσχευση για άλλη νόσο (70% στα 5 έτη) και το ποσοστό υποτροπής είναι λιγότερο από 25% (55;67-70). Η μόλυνση του μοσχεύματος από τον ιό της ηπατίτιδας C και η ανάπτυξη κίρρωσης είναι ένα σοβαρό και άλυτο πρόβλημα στους φορείς HCV (71;72).

#### **4.1.2. Διαδερμικές Θεραπείες**

Η διαδερμική έγχυση αιθανόλης είναι μια καλά ανεκτή θεραπεία με υψηλή αποτελεσματικότητα για μικρά περιφερικά ΗΚΚ (73-75). Η διαδερμική έγχυση αιθανόλης είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική για όγκους μικρότερους από 3 εκατοστά στους οποίους μπορεί να αναμένεται ένα ποσοστό πλήρους ανταπόκρισης μέχρι και 80% (76). Σε μεγαλύτερους ή/και πολυοζιδιακούς όγκους είναι λιγότερο πιθανό να επιτευχθεί πλήρης νέκρωση με διαδερμική έγχυση αιθανόλης (76-78).

Διαδερμικές επιλογές, με μεγαλύτερο οικονομικό κόστος, είναι η χρήση ραδιοσυχνότητας (79), μικροκυμάτων (80;81), η κρυοθεραπεία (82) και η χρήση λέιζερ (83) αλλά δεν υπάρχουν οι επαρκείς μελέτες για την επίδρασή τους στη μακροπρόθεσμη επιβίωση των ασθενών και την οικονομοτεχνική αποτελεσματικότητά τους.

Ωστόσο η θερμική καταστροφή με ραδιοσυχνότητες είναι μια ελπιδοφόρος τεχνική. Εκτιμάται πως έχει παρόμοια ή ακόμα και καλύτερα αντικειμενικά ποσοστά απάντησης σε σχέση με την διαδερμική έγχυση αιθανόλης, αλλά αυτά τα οφέλη συνοδεύονται από υψηλότερο ποσοστό παρενεργειών και χαμηλότερη δυνατότητα εφαρμογής της θεραπείας λόγω της θέσης των όγκων (84).

Η υποτροπή μετά από την αποτελεσματική διαδερμική θεραπεία είναι τόσο συχνή όσο μετά από τη χειρουργική ηπατεκτομή (50% στα 3 έτη και πάνω από 70% στα 5 έτη) (77;78;85).

#### **4.2. Συστηματικές Θεραπείες**

##### **4.2.1. Συστηματική χημειοθεραπεία**

Η χημειοθεραπεία δεν χρησιμοποιείται συνήθως για τους ασθενείς με εκτεταμένο ΗΚΚ για διάφορους λόγους: (α) ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος έχει θεωρηθεί ένας όγκος ανθεκτικός στη χημειοθεραπεία (υψηλού ποσοστού έκφραση γονιδίων αντίστασης στα φάρμακα) (86-89). (β) Μπορεί να είναι δύσκολο να μετρηθεί το όφελος από τη χημειοθεραπεία στους ασθενείς με εκτεταμένο ΗΚΚ δεδομένου ότι η επιβίωση

καθορίζεται συχνά όχι από την επιθετικότητα του όγκου ή την αποτελεσματικότητα μιας συστηματικής θεραπείας, αλλά από το βαθμό ηπατικής δυσλειτουργίας. Η συστηματική χημειοθεραπεία δεν είναι συνήθως καλά ανεκτή από τους ασθενείς με ΗΚΚ λόγω της σημαντικής ηπατικής δυσλειτουργίας αυτών των ασθενών.

Παρά από αυτούς τους περιορισμούς, διάφοροι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες καθώς και συνδυασμοί τους έχουν μελετηθεί. Εντούτοις, τα αποτελέσματα των μελετών ήταν συχνά αντικρουόμενα ενώ η μέση επιβίωση των ασθενών που συμμετείχαν στις μελέτες αυτές ήταν σύντομη. Χημειοθεραπευτικά που έχουν χρησιμοποιηθεί στο ΗΚΚ είναι η ντοξορουμπικίνη (Doxorubicin) (90-92), η 5-φλουουρακίλη (5- fluorouracil, 5FU) (93), η σις-πλατίνη (Cis-Platin) (94) καθώς και τα νεότερα φάρμακα gemcitabine (95;96) και capecitabine (97).

#### **4.2.2. Η ιντερφερόνη α (IFN-α).**

Η ιντερφερόνη-α είναι μια ανοσοτροποποιητική κυτταροκίνη που έχει αναφερθεί πως είναι αποτελεσματική έναντι διαφόρων τύπων όγκων. Τουλάχιστον δύο κλινικές μελέτες δοκιμές έχουν αξιολογήσει την μονοθεραπεία με IFN-α σε ασθενείς με εκτεταμένο ΗΚΚ με αντιφατικά αποτελέσματα τόσο όσον αφορά την εμφάνιση παρενεργειών όσο και την αποτελεσματικότητα της θεραπείας στο ΗΚΚ (98;99)

#### **4.2.3. Χημειοανοσοθεραπεία.**

Νεότερες προσεγγίσεις περιλαμβάνουν συνδυασμούς χημειοθεραπείας με ιντερφερόνη-άλφα (IFN-α). Οι περισσότερες θεραπευτικές αγωγές που έχουν δοκιμαστεί περιλαμβάνουν εκτός από IFN-α, doxorubicin, 5-FU και cisplatin (100-103) δίχως όμως τα αποτελέσματα των έως τώρα μελετών να έχουν οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα αυτών των συνδυασμών.

#### **4.2.4. Ορμονοθεραπεία**

Σε ασθενείς με ανεγχείρητο ΗΚΚ έχει δοκιμαστεί η θεραπεία με μια σειρά από ορμονικούς παράγοντες.



#### 4.2.4.1. Αναστολείς υποδοχέων οιστρογόνων

##### I) Ταμοξιφαίνη (Tamoxifen).

Οι υποδοχείς οιστρογόνων είναι παρόντες σε περίπου ένα τρίτο των ΗΚΚ. Θεωρητικά, τα ΗΚΚ με υποδοχείς οιστρογόνων θα μπορούσαν ενδεχομένως να επηρεάζονται από τον αποκλεισμό των υποδοχέων αυτών. Εντούτοις, τουλάχιστον τρεις μελέτες με ταμοξιφαίνη σε ασθενείς με ανεγχείρητο ΗΚΚ έχουν αποτύχει να παρουσιάσουν ένα όφελος στην επιβίωση ή βελτιωμένη ποιότητα ζωής (104;105).

Η Ταμοξιφαίνη μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως πιθανός ανασταλτικός παράγοντας της p-glycoprotein (του προϊόντος του γονιδίου αντίστασης σε πολλαπλά φάρμακα (multidrug resistance-MDR)). Οι συνδυασμοί της ταμοξιφαίνης με διάφορους χημειοθεραπευτικούς πράκτορες έχουν μελετηθεί σε ασθενείς με ανεγχείρητο ΗΚΚ δίχως να έχει αποδειχθεί σημαντικό όφελος (106-108).

##### II) Μεγεστρόλη (Megestrol).

Τουλάχιστον δύο μελέτες έχουν αναφέρει κάποια μικρή αποτελεσματικότητα της μεγεστρόλης σε ασθενείς με προχωρημένο ΗΚΚ (109;110).

#### 4.2.4.2. Τα ανάλογα σωματοστατίνης

Η παρουσία υποδοχέων σωματοστατίνης στο ΗΚΚ έχει περιγραφεί από διάφορους ερευνητές (111;112). Η παρατήρηση αυτή παρείχε την λογική βάση για την δοκιμή της θεραπείας του ΗΚΚ με ανάλογα σωματοστατίνης. Πρόσφατα μια ελεγχόμενη τυχαιοποιημένη μελέτη για την εφαρμογή του αναλόγου της σωματοστατίνης οκτρεοτίδη για την θεραπεία του ανεγχείρητου ΗΚΚ έχει καταδείξει ένα σημαντικό όφελος επιβίωσης για τους θεραπευθέντες ασθενείς (113). 58 ασθενείς με ανεγχείρητο ΗΚΚ τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν είτε το ανάλογο σωματοστατίνης οκτρεοτίδη ή ψευδοφάρμακο. Έναντι του ψευδοφαρμάκου, οι ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε οκτρεοτίδη είχαν μια σημαντική αύξηση στη μέση επιβίωση (13 μήνες έναντι 4). Έκτοτε διάφορες άλλες κλινικές δοκιμές των ανάλογων σωματοστατίνης για την θεραπεία του ΗΚΚ έχουν δημοσιευθεί, αλλά τα στοιχεία είναι αντιφατικά (114-116). Σε

μια μελέτη σε 70 ασθενείς με προχωρημένο ΗΚΚ χορηγήθηκε σε τυχαιοποιημένους ασθενείς οκτρεοτίδη ή ψευδοφάρμακο (116). Εντούτοις, η μέση επιβίωση ήταν εξαιρετικά σύντομη και στις δύο ομάδες (δύο μήνες), γεγονός που απέκλεισε τη δυνατότητα αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου. Πιθανόν διαφορές στη φυσική πορεία της νόσου στις διαφορετικές πληθυσμιακά και γεωγραφικά ομάδες που συμπεριλαμβάνονταν σε αυτές τις μελέτες, διαφορές στην αιτιολογία της υποκείμενης ηπατικής νόσου ή διαφορές μεταξύ της αναμενόμενης επιβίωσης των ασθενών και του κλινικού σταδίου της νόσου στο οποίο βρίσκονταν όταν εισήχθησαν σε αυτές τις μελέτες να εξηγούν κάποιες από τις διαφορές στα αποτελέσματα αυτής της μελέτης με εκείνη των Κουρούμαλη και συν. (117). Σε άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η λανρεοτίδη, που είναι ένα ανάλογο σωματοστατίνης με μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής από την οκτρεοτίδη αλλά συγκρίσιμη αποτελεσματικότητα με αυτήν στην θεραπεία της μεγαλακρίας όταν χορηγείται ενδομυϊκά δύο έως τρεις φορές τον μήνα. Από 21 ασθενείς με ανεγχείρητο ΗΚΚ που έλαβαν λανρεοτίδη ένας εμφάνισε αντικειμενική απάντηση στη θεραπεία, και 38% των ασθενών είχαν μικρές χρονικές περιόδους σταθεροποίησης της νόσου (114). Σε μια ακόμα μελέτη με λανρεοτίδη η ομάδα των ασθενών που έλαβε το ανάλογο της σωματοστατίνης παρουσίασε σημαντική διαφορά στο μέσο χρόνο επιβίωσης (31 έναντι 16 εβδομάδων) και βελτίωση της ποιότητας ζωής (60% έναντι 23%) (115).

#### **4.2.4.3. Συνδυασμός οκτρεοτίδης και ταμοξιφαίνης**

Αξίζει επίσης να αναφερθεί μια πρόσφατη τυχαιοποιημένη μελέτη της αποτελεσματικότητας του συνδυασμού της ταμοξιφαίνης με την οκτρεοτίδη σε σύγκριση με τον συνδυασμό της 5-FU με την μυτομικίνη για την θεραπεία του ανεγχείρητου ΗΚΚ. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα αθροιστικά ποσοστά επιβίωσης 6 μηνών, 1 έτους και 2 ετών τα οποία ήταν 95,7% εναντίον 41,2% ( $P<0.01$ ), 63,7% εναντίον 21,1% ( $P<0.01$ ), 25,4% εναντίον 0 ( $P<0.01$ ), αντίστοιχα για τις δυο ομάδες ασθενών. Ο μέσος χρόνος επιβίωσης ήταν 12,8 μήνες στην ομάδα TAM+OCT και 5,5 μήνες στη ομάδα που έλαβε χημειοθεραπεία (118).

## 5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΗΚΚ

### 5.1. Σε πειραματόζωα

#### 5.1.1. Χημικά προκαλλούμενο ΗΚΚ

Πολυάριθμα πρωτόκολλα χημικά προκαλούμενης ηπατοκαρκινογένεσης έχουν εφαρμοστεί και μελετηθεί σε τρωκτικά. Οι μελέτες αυτές είχαν σαν κύριο στόχο την *in vitro* επιβεβαίωση της ικανότητας ηπατοκαρκινογένεσης των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν. Κάποια μοντέλα, ωστόσο, χρησιμοποιήθηκαν και για την μελέτη μοριακών μηχανισμών που χαρακτηρίζουν την έναρξη και εξέλιξη του ΗΚΚ. Οι διάφορες χημικές καρκινογόνες ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί σε αυτά τα πρωτόκολλα παρουσιάζουν διαφορετικές καρκινογόνες ικανότητες (119). Επίσης ο τύπος του τρωκτικού αλλά και ο ειδικός υποτύπος αυτού φαίνεται πως έχει σημασία για το τελικό αποτέλεσμα. Μια βραχυπρόθεσμη έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες είναι επαρκής για να κινηθεί αλλά όχι απαραίτητως και για να ολοκληρώσει την καρκινογόνο διαδικασία (119) και έτσι συχνά οι καρκινογόνες ουσίες έχουν ανάγκη υποστήριξης από μια δεύτερη ουσία που δρα είτε ως επιλογέας των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (όπως το 2-ακετυλοφλουορένιο) είτε των ανθεκτικών λόγω βλάβης από την πρώτη ουσία κυττάρων. Οι συνδυασμοί αυτοί κάνουν τέτοια πρωτόκολλα ακόμα πιο περίπλοκα ενώ επίσης έχει ανευρεθεί ότι τα πειραματικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιούν μια πρώτη ουσία (που προκαλεί την καρκινογένεση) και έναν υποστηρικτή δεν είναι ισοδύναμα με τα πειραματικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιούν μια χρόνια χορήγηση της καρκινογόνου ένωσης (119)

*Αρσενικό.* Το αρσενικό είναι μια περιβαλλοντική τοξική ουσία καθώς και ανθρώπινο καρκινογόνο. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συνδέσει την ανθρώπινη έκθεση στο αρσενικό με διάφορες ασθένειες και καρκίνους, που περιλαμβάνουν ασθένειες του ήπατος καθώς και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (120). Μια σειρά από μελέτες σε ποντίκια έχουν αναδείξει ένα μοντέλο πρόκλησης ΗΚΚ μετά από *in utero* έκθεση σε αρσενικό. Το ανόργανο αρσενικό ενεργεί ως διαπλακουντιακή καρκινογόνος ουσία στα ποντίκια, όπου προκαλεί από μόνο του όγκους επί πολλαπλών οργάνων, καθώς επίσης επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε διάφορους άλλους ιστούς (121-123). Το

γεγονός ότι όγκοι του δέρματος δεν επάγονται από το αρσενικό στα έμβρυα ποντικών δείχνουν ενδεχομένως μια ιστό-ειδική δράση του αρσενικού που περιλαμβάνει και το ήπαρ (122). Υπάρχουν επίσης διάφορες μελέτες με *ex utero* έκθεση τρωκτικών σε αρσενικό (120). Η ανάπτυξη αυτών των μοντέλων καρκινογένεσης από αρσενικό σε τρωκτικά έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη του μηχανισμού πρόκλησης καρκίνου από αυτήν την κοινή στο περιβάλλον καρκινογόνο ουσία (120;121;123).

*Δι-αιθυλ-νιτροζαμίνη*. Η δι-αιθυλ-νιτροζαμίνη έχει χρησιμοποιηθεί είτε από μόνη της (124-126) είτε σε συνδυασμό με φαινοβαρβιτάλη (127) ή 2-ακετυλοφλουορένιο (128) για την πρόκληση ΗΚΚ σε τρωκτικά. Η σχετική ευκολία στην εφαρμογή, με μία μόνο χορήγηση κάνει αυτό το μοντέλο πολύ εύκολο στην εφαρμογή του. Με αυτό το μοντέλο έχει ανευρεθεί πως η IFN-α προλαμβάνει και επιβραδύνει μέσω άμεσης δράσης την ηπατοκαρκινογένεση (128). Ο συνδυασμός αυτού του μοντέλου με την τεχνική των διαγονιδιακών ζώων έχει δείξει πως η έκφραση της πρωτεΐνης tat του ιού HIV στο ήπαρ δημιουργεί προδιάθεση για ηπατοκαρκινογένεση και επάγει τους όγκους του ήπατος (129). Ακόμα έχει μελετηθεί ο ρόλος προστατευτικών περιβαλλοντικών παραγόντων όπως το ιχνοστοιχείο βανάδιο το οποίο ανευρέθη πως παρέχει μια ουσιαστική προστασία ενάντια στην καρκινογένεση από δι-αιθυλ-νιτροζαμίνη σε ήπαρ τρωκτικών (130;131). Τέλος με το μοντέλο αυτό έχει συσχετιστεί η δράση του TGF-α (132) αλλά και της κυκλοσπορίνης (133) με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, ενδεχομένως μέσω ενός μηχανισμού επαγωγής του πολλαπλασιασμού των ηπατοκυττάρων με προκαρκινική βλάβη.

*N-νιτροζομορφολίνη*. Η ουσία αυτή είχε χρησιμοποιηθεί κατά το παρελθόν για την πρόκληση ηπατοκαρκινογένεσης σε μια σειρά από μελέτες (134-137). Με αυτό το μοντέλο έχει ανευρεθεί πως καρκινογόνες ουσίες προκαλούν μόνιμες αλλοιώσεις στα ένζυμα μεταβολισμού φαρμάκων, συμβατές με την παρατηρούμενη αυξημένη αντίσταση στις τοξίνες των προκαρκινικών ηπατοκυττάρων (136). Επίσης ανευρέθη ότι η AFP αυξάνεται σημαντικά από τα πρώιμα στάδια της χημικά προκαλούμενης ηπατοκαρκινογένεσης (137).

*Άλλες ουσίες.* Άλλες ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της ικανότητάς τους να προκαλέσουν ΗΚΚ σε ζώα είναι η ανθρακινόνη, το AZT, η πριμακρόνη, το τριχλωροαιθυλένιο, το τετραχλωροαιθυλένιο, το διχλωρο-οξικό οξύ, το χλωριούχο μεθυλένιο, η οξαζεπάμη και η διοξίνη (138) καθώς και πάρα πολλές άλλες.

### **5.1.2. Γονιδιακά προκαλούμενο ΗΚΚ**

Η δυνατότητα εισαγωγής κλωνοποιημένων τμημάτων DNA στο γονιδίωμα ζώων έχει επιτρέψει την μελέτη των ιστοειδικών και αναπτυξιακών χαρακτηριστικών μιας σειράς γονιδίων. Επιπλέον, αυτό το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών με τους οποίους σχετίζεται το εισαχθέν γονίδιο στο σώμα του τρανσγενομικού ζώου. Επομένως, πρόκειται για μια από τις καλύτερες προσεγγίσεις για την ανάλυση των μηχανισμών ογκογένεσης. Με τέτοια μοντέλα έχει μελετηθεί ο μοριακός μηχανισμός της ογκογένεσης (i) από μεταλλάξεις ή υπερέκφραση μιας σειράς γονιδίων, (ii) και από γονίδια ιών, καθώς επίσης και (iii) η επίδραση διαφόρων παρεμβάσεων και θεραπειών στην ανάπτυξη του καρκινικού μοντέλου.

Πολυάριθμα μοντέλα διαγονιδιακών ζώων έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη του του ΗΚΚ. Οι μελέτες αυτές έχουν αναδείξει τον ρόλο της αυξητικής ορμόνης (139;140), του υποστρώματος-1 του υποδοχέα της ινσουλίνης (human insulin receptor substrate-1, hIRS-1) (141), του παράγοντα αύξησης ινοβλαστών 19 (fibroblast growth factor 19, FGF19) (142), της βήτα κατενίνης (143), του μεταγραφικού παράγοντα E2F-2 (144), της κυκλίνης D1 (145), του ογκογονιδίου ras (human H-ras oncogene) (143;146), του ογκογονιδίου v-erbA (το οποίο αποτελείται από ρετροϊκό γονίδιο που έχει συντηχθεί με έναν μεταλλαγμένο γονίδιο του υποδοχέα των θυροειδικών ορμονών) (147), του ογκογονιδίου c-myc και του TGF- $\alpha$  (148-152) στην ηπατοκαρκινογένεση. Ειδικά τα διαγονιδιακά μοντέλα του c-myc έχουν χρησιμοποιηθεί και για την μελέτη της θεραπείας του ΗΚΚ με IFN- $\gamma$  (148;153).

Ένα συχνά χρησιμοποιούμενο διαγονιδιακό μοντέλο είναι εκείνο που έχει αναπτυχθεί με την εισαγωγή ενός γονιδίου που έχει προκύψει από την σύντηξη του υποκινητή ενός ειδικού για το ήπαρ ανθρώπινου γονιδίου (π.χ. της αντιθρομβίνης III) με την περιοχή κωδικοποίησης του μεγάλου ογκο-αντιγόνου (large tumor antigen, Tag) του

ιού 40 των πιθήκων (simian virus 40, SV40) (154-156). Το μοντέλο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της τοπικής θεραπείας με IFN- $\gamma$  στο ΗΚΚ (157) καθώς και για την μελέτη των παραγόντων που επάγουν την αγγειογένεση στο ΗΚΚ (158).

Διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν τον μεγάλο πολυπεπτιδικό φάκελο του ιού της ηπατίτιδας Β και συσσωρεύουν τοξικές ποσότητες του αντιγόνου επιφάνειας της ηπατίτιδας Β (HBsAg) στα ηπατοκύτταρα παρουσιάζουν επίσης προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις ΗΚΚ (159). Στο μοντέλο αυτό έχει επίσης βρεθεί ότι κατά την διάρκεια της εξέλιξης των βλαβών σε ΗΚΚ υπάρχει σταδιακή αύξηση της έκφρασης του γονιδίου πολλαπλής αντίστασης στα φάρμακα τύπου 3 (multidrug resistance gene 3, MDR3) (160). Επίσης παρατηρείται τροποποίηση της έκφρασης ενζύμων που μεταβολίζουν καρκινογόνες ουσίες με αποτέλεσμα η χορήγηση αφλατοξίνης (η οποία σε συνδυασμό με τον ΗΒV προκαλεί συχνά ΗΚΚ στον άνθρωπο) να οδηγεί σε συχνότερη εμφάνιση ΗΚΚ στα διαγονιδιακά ζώα (161;162). Η συνέκφραση TGF- $\alpha$  σε αυτά τα ζώα επιτάχυνε την εμφάνιση ΗΚΚ (163).

Διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν το γονίδιο HB $_x$  του ιού ΗΒV εμφανίζουν επίσης αυξημένη συχνότητα ΗΚΚ (164;165), κατάσταση που σχετιζόταν με αυξημένη έκφραση του γονιδίου c-myc (166;167) και επιδεινωνόταν ακόμα περισσότερο με τον συνδυασμό με χημική ηπατοκαρκινογένεση (168;169).

Επίσης έχει αναπτυχθεί διαγονιδιακό μοντέλο ηπατοκαρκινογένεσης με την μεταφορά του γονιδίου του πυρήνα της ηπατίτιδας C (HCV core protein) (165;170) στο οποίο φάνηκε πως ο ρόλος του οξειδωτικού stress είναι μεγάλης σημασίας για την ανάπτυξη του ΗΚΚ (170) αν και ένα παρόμοιο μοντέλο απέτυχε να αποδείξει άμεση ηπατοκαρκινογένεση απουσία ηπατοτοξικού παράγοντα (171).

Επίσης διαγονιδιακά ποντίκια που φέρνουν αντίσωμα tat του ιού HIV αναπτύσσουν ελαφρώς συχνότερα ΗΚΚ και επίσης σημαντική ηπατοκυτταρική δυσπλασία (172).

### 5.1.3. Μοντέλα εμβολισμού ΗΚΚ σε πειραματόζωα

Οι μελέτες με μεταμοσχεύσεις ανθρώπινων όγκων, ορθοτοπικές (στο όργανο από το οποίο προέρχεται το νεόπλασμα) ή ξενοτοπικές (σε άλλο όργανο π.χ. δέρμα), σε «γυμνά» αθυμικά ποντίκια (nude athymic mice) ή άλλα ειδικά είδη τρωκτικών έχουν παρουσιάσει προοδευτική αύξηση κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών ως πειραματικά μοντέλα για την έρευνα του καρκίνου. Τα στοιχεία δείχνουν ότι τέτοια μοντέλα μπορεί να είναι χρήσιμα για τον *in vivo* υπολογισμό της μεταστατικής δυναμικής των ανθρώπινων νεοπλασμάτων και για τη μελέτη της αποτελεσματικότητας μιας πλειάδας συστηματικών και τοπικών θεραπειών (173;174). Φυσικά τέτοια μοντέλα έχουν αναπτυχθεί και για το ΗΚΚ.

Σε ότι αφορά τις τοπικές θεραπείες, έχουν γίνει μελέτες με τοπικές εγχύσεις αιθανόλης (175;176), εξαφωσφορικής ινοσιτόλης (Inositol hexaphosphate, IP6, ενός φυσικού υδατάνθρακα) (177) και κατιονικών λιπιδίων (ως φορείς γονιδιακής θεραπείας) (178).

Έχουν δημοσιευθεί αναφορές για την συστηματική χορήγηση αδριαμυκίνης προσδεδεμένης σε μονοκλωνικά αντισώματα έναντι αντιγόνων του ΗΚΚ (179), IFN- $\gamma$  για την αντιμετώπιση υποτροπών ΗΚΚ (180), του αναστολέα αγγειογένεσης TNP-470 (181), του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών BB-94 (182), του αναστολέα της Πρωτεϊνικής Κινάσης C 317615 (183), του μεθυλιωμένου ολιγονουκλεοτιδίου (MON1) (184), των συνδυασμών ραδιενεργών ουσιών με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι αντιγόνων του ΗΚΚ (185), καθώς και διαφόρων γονιδιακών θεραπειών (177;186-188).

Τέλος έχει περιγραφεί με τέτοιου είδους μοντέλα και η μελέτη της διεγχειρητικής χορήγησης 5-FU κατά την διάρκεια τμηματικής ηπατεκτομής (189).

Αξίζει να αναφερθεί ιδιαιτέρως μια μελέτη από τους Jia et.al. η οποία μελέτησε με ένα μοντέλο ΗΚΚ σε nude mice την επίδραση της θεραπείας με οκτρεοτίδη στην αγγειογένεση και την αύξηση των όγκων (190). Η οκτρεοτίδη κατέστειλε την νεοαγγείωση των όγκων και το μέγεθος των όγκων στα ποντίκια δίχως να έχει επίδραση στις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήσαν οι ερευνητές, οι οποίες όμως δεν είχαν

υποδοχείς σωματοστατίνης. Έτσι η αντιπολλαπλασιαστική δράση της οκτρεοτίδης έναντι των όγκων μπορεί, τουλάχιστον εν μέρει να οφείλεται στην κατασταλτική επίδρασή της στο αγγειακό δίκτυο τροφοδοσίας των όγκων (190).

## 5.2. Κυτταρικές σειρές ΗΚΚ

Το 1963, αναπτύχθηκε η πρώτη ανθρώπινη κυτταρική σειρά ΗΚΚ (BEL-16) (191). Τις τέσσερις τελευταίες δεκαετίες, ένας μεγάλος αριθμός ανθρώπινων κυτταρικών σειρών ΗΚΚ έχει αναπτυχθεί. Οι Shen και συν. μετά από την ανάπτυξη της πρώτης ανθρώπινης κυτταρικής σειράς ΗΚΚ το 1963, ανέπτυξαν μέσα στα επόμενα έτη μια σειρά ανθρώπινων κυτταρικών σειρών ΗΚΚ (BEL-7402, BEL-7404, BEL-7405). Το 1973, οι Alexander και συν. ανέπτυξαν τη διάσημη ανθρώπινη κυτταρική σειρά ΗΚΚ PLC/PRF/5 που παράγει HbsAg (192) όπως και η πολύ συχνά χρησιμοποιούμενη σειρά Hep3B (193). Ο Dong ανέπτυξε την ανθρώπινη κυτταρική σειρά ΗΚΚ SMMC-7721 το 1977, η οποία παραμένει μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ΗΚΚ στην Κίνα (194).

Πολλές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ΗΚΚ έχουν αναπτυχθεί για τις μελέτες αιτιολογικών παραγόντων ΗΚΚ, όπως ο ιός ηπατίτιδας Β (HBV) (193-198), ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) (199), ο ιός της ηπατίτιδας D (σειρά Huh-712D) (200), η αιμοχρωμάτωση (201), καθώς και για άλλες μελέτες (202-207).

Η κυτταρική σειρά όμως που χαίρει της μεγαλύτερης εκτίμησης και χρησιμοποιείται περισσότερο τόσο για μελέτες πάνω στο ΗΚΚ όσο και για μελέτες στο επίπεδο της μοριακής βιολογίας είναι η κυτταρική σειρά HepG2 η οποία αναπτύχθηκε το 1979 (193). Προέρχεται από ένα καλά διαφοροποιημένο ΗΚΚ και έτσι διατηρεί μια σειρά από χαρακτηριστικά και του φυσιολογικού ηπατοκυττάρου (π.χ. εκκρίνει λευκωματίνη, άλφα-1 αντιθρυψίνη, τρανσφερρίνη, πλασμινογόνο) που την κάνουν πολύτιμη για μελέτες ηπατικής βιολογίας (208-213). Πάνω από 5.200 άρθρα στο PUBMED αναφέρονται σε μελέτες με κύτταρα HepG2, αριθμός πολλαπλάσιος από την επόμενη συχνότερα χρησιμοποιούμενη σειρά ΗΚΚ Huh-712D (πίνακας 3). Το αντιγόνο επιφάνειας του ιού της ηπατίτιδας Β δεν έχει ανιχνευθεί στα κύτταρα HepG2 (193). Επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολυάριθμες μελέτες που είχαν σαν σκοπό την



ανεύρεση νέων θεραπειών για το ΗΚΚ, καθώς και των μηχανισμών με τους οποίους δρουν αυτές οι θεραπείες (214-227).

Σε ότι αφορά τις ζωικές κυτταρικές σειρές ΗΚΚ, έχει αναφερθεί ανάπτυξη από αρουραίο (228-232), ποντίκι (233-235), μαρμότα (236;237) και κοτόπουλο (238).

### **Πίνακας 3.** Αριθμός αναφορών στο PUBMED

των κυτταρικών σειρών ΗΚΚ (6/2004)

Κυτταρική Σειρά	Αναφορές στο PUBMED
HepG2	5334
Huh-712D	1546
Hep3B	607
PLC/PRF/5	451
SMC-7721	160
SK-HEP-1	143
BEL-16	78

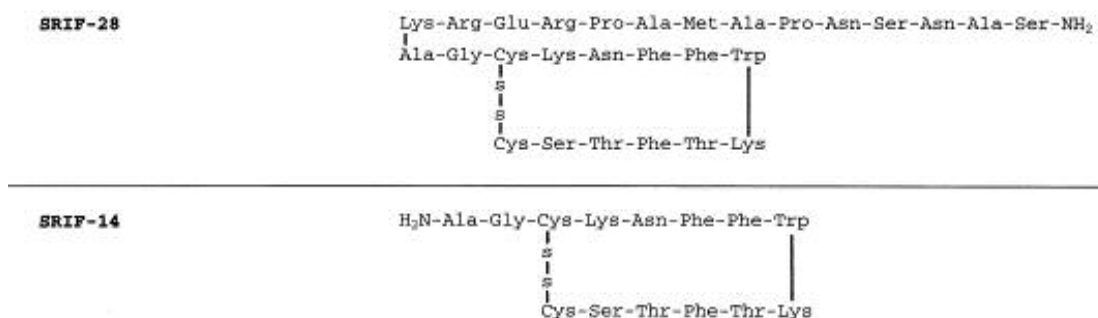
## B. Η ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ

### 1. Τα φυσικά σωματοστατινεργικά πεπτίδια

#### 1.1. Σωματοστατίνη

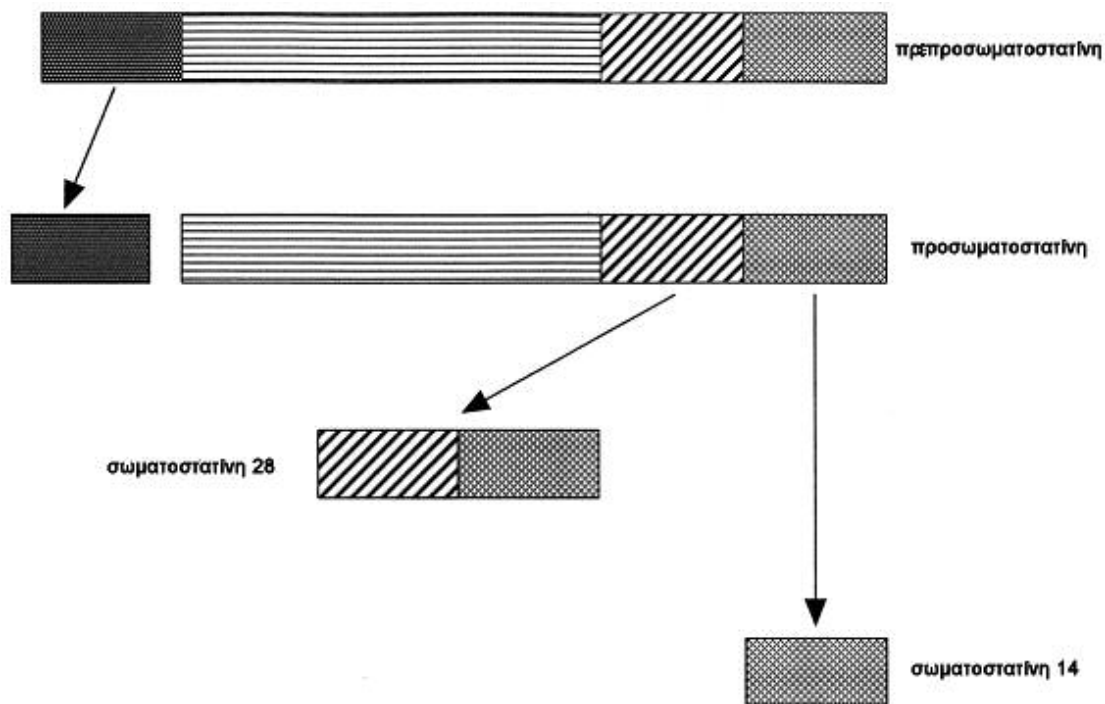
Το 1968 οι Krulich και συν. (239) αναγνώρισαν έναν παράγοντα που μείωνε την απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης (GH) από την υπόφυση του αρουραίου *in vitro*. Ονόμασαν αυτόν τον παράγοντα «Παράγοντα αναστολής της αυξητικής ορμόνης» ("GH-inhibiting factor", GIF) και σκέφτηκαν ότι αυτός ο παράγοντας πιθανόν ήταν το φυσιολογικό αντίστοιχο του παράγοντα απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης (GH-releasing factor, GRF), ο οποίος είχε περιγραφεί από τους Dhariwal και συν. (240;241). Το 1973 οι Brazeau και συν. (242) παρατήρησαν μια αντεκκριτική απάντηση των κυττάρων που παράγουν GH σε υποθαλαμικά εκχυλίσματα, παρατήρηση που οδήγούσε στο συμπέρασμα ότι στην πραγματικότητα υπήρχε ένας αρνητικός ρυθμιστής της απελευθέρωσης της GH. Η ουσία αυτή απομονώθηκε τελικά από τον υποθάλαμο, αρχικά προβάτων και ονομάστηκε σωματοστατίνη (somatotropin release-inhibiting factor, SRIF). Αποδείχθηκε τελικά ότι είναι ένα κυκλικό πεπτίδιο με δύο βιολογικά ενεργές ισομορφές: την δεκατετραμερή SRIF-14 και το αμινοτελικά μεγαλύτερο εικοσιοκταπεπτίδιο SRIF-28 (Εικόνα 1).

**Εικόνα 1.** Αλληλουχία των αμινοξέων των SRIF-14 και SRIF-28



Το γονίδιο της SRIF εδράζεται στο χρωμόσωμα 3 και κωδικοποιεί την παραγωγή μιας μεγάλης πρόδρομης πρωτεΐνης, της πριπροσωματοστατίνης (preproSRIF), η οποία διασπάται αρχικά στην προσωματοστατίνη (92 αμινοξέα, proSRIF) (Εικόνα 2). Η proSRIF υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία στο καρβοξυτελικό άκρο της για να προκύψουν τελικά οι SRIF 14 και SRIF-28. Τα τελικά αυτά προϊόντα προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς που ονομάζονται υποδοχείς σωματοστατίνης (sst) (243;244).

**Εικόνα 2.** Διάσπαση της preproSRIF στα τελικά προϊόντα SRIF-14 και SRIF-28



Τα κύτταρα που παράγουν SRIF είναι νευρώνες ή ενδοκρινικά κύτταρα που βρίσκονται σε υψηλή πυκνότητα στο νευρικό σύστημα, στο πάγκρεας, στο έντερο, στον αμφιβληστροειδή, και σε μικρούς αριθμούς στο θυροειδή, τα επινεφρίδια, τα νεφρά, τον προστάτη και τον πλακούντα, πλην όμως έχει αναφερθεί έκφραση SRIF και σε πλειάδα περιφερικών ιστών (243;245-256).

## 1.2. Κορτιστατίνη

Περάσαν 23 χρόνια μέχρι να ανακαλυφθεί το επόμενο φυσικό σωματοστατινεργικό νευροπεπτίδιο, η Κορτιστατίνη (CST). Το 1996 οι de Lecea και συν. περιέγραψαν την ανακάλυψη της CST, ενός νευροπεπτιδίου με σημαντική δομική ομοιότητα με την SRIF. (257;258). Είναι προϊόν ενός γονιδίου, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 1, διαφορετικό από αυτό που παράγει την SRIF, αλλά αρκετά παρόμοιας δομής ώστε να προταθεί ότι είναι προϊόν κάποιου πρώιμου γονιδιακού διπλασιασμού (259). Η ανθρώπινη CST17 προκύπτει από την ενδοπρωτεόλυση της πρεπροκορτιστατίνης, μιας πρωτεΐνης με 112 αμινοξέα που κωδικοποιείται από το γονίδιο της CST. Η CST του αρουραίου και του ποντικού είναι δεκατετραπεπτίδια (rCST14 και mCST14) αλλά η ανθρώπινη CST είναι ένα δεκαεπταπεπτίδιο (hCST17) (259). Η CST17 έχει υψηλή συγγένεια για όλες τις υποκατηγορίες των υποδοχέων σωματοστατίνης δίχως να εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για κάποιον από αυτούς (260;261). Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι πιθανός φυσικός υποδοχέας της CST είναι ο μέχρι πρότινος ορφανός υποδοχέας MrgX-2 (262).

Το mRNA της CST έχει ανιχνευθεί στον εγκέφαλο του ανθρώπου, του αρουραίου και του ποντικού (257;258;260) καθώς και στο ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα (263;264). Μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε παρουσία έκφραση CST σε ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπινων ιστών πέρα από τους προαναφερθέντες, μεταξύ αυτών οι όρχεις, ο θυροειδής, το πάγκρεας και το ήπαρ (253). Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι τα αποτελέσματά τους μπορεί να έχουν επηρεαστεί από την εκτεταμένη παρουσία κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στους περιφερικούς ανθρώπινους ιστούς. Ωστόσο αναφέρουν ότι σε ιστούς με σχετικά μικρή διήθηση από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα επινεφρίδια, ο θυροειδής και το ήπαρ η αυξημένη παρουσία mRNA της CST μπορεί να αποδοθεί στην έκφρασή του από άλλα κύτταρα αυτών των ιστών. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι η CST ανευρίσκεται σε όλο το ανθρώπινο σώμα και έτσι ενδεχομένως μπορεί να διαδραματίζει έναν ευρύτερο ρόλο στη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Για την περίπτωση του ήπατος αξίζει να αναφερθεί πως στα κύτταρα του Kupffer, τα οποία ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα, έχει ανευρεθεί έκφραση CST (Κουρούμαλης και συν. αδημοσίευτες πληροφορίες).

## 2. Οι υποδοχείς Σωματοστατίνης

Η σωματοστατίνη ασκεί την δράση της μέσω της δέσμευσης της σε ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς. Οι Schonbrunn και Tashjian ήταν οι πρώτοι που ανέδειξαν ότι υπάρχουν ειδικοί υποδοχείς σωματοστατίνης στην καρκινική κυτταρική σειρά από υπόφυση αρουραίων GH4C1 που εκκρίνει αυξητική ορμόνη (265). Στη συνέχεια, η ύπαρξη πολλαπλών υποδοχέων σωματοστατίνης περιγράφηκε σε διάφορες κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένων και των κυτταρικών σειρών από υπόφυση ποντικού και αρουραίου AtT-20 και GH3 αντίστοιχα (266).

### 2.1. Γονιδιακή Πολλαπλότητα

Έχουν αναγνωριστεί και κλωνοποιηθεί έως τώρα πέντε υποτύποι υποδοχέων σωματοστατίνης που ονομάζονται  $sst_{1-5}$  και παρουσιάζουν σημαντική ομολογία μεταξύ τους (Εικόνα 3 και Πίνακας 4) (246).

**Πίνακας 4.** Χαρακτηριστικά των ανθρώπινων κλωνοποιημένων υποδοχέων σωματοστατίνης

	$sst_1$	$sst_2$	$sst_3$	$sst_4$	$sst_5$
Χρωμοσωμική εντόπιση	14q13	17q24	22q13.1	20p11.2	16p13.3
Μοριακό Βάρος (kDa)	53–72	71–95	65–85	45	52–66
Αριθμός αμινοξέων	391	369	418	388	363
Μέγεθος mRNA (kb)	4.8	8.5	5.0	4.0	4.0

<--		
sst <sub>1</sub>	MFPNGTASSPSSPSPGSCGEGGSRGPGAGAADMEEPRGNASQNGTLESGQGSAIL	60
sst <sub>2</sub>	M-----DMADEPLNGSHTWLSIPFDLNGSVVSTNTSNQTEPYDLT-----SNAVL	46
sst <sub>3</sub>	M-----DMLHPSVSTTSEPENASSAWPPDATLGNVSAGSPAGLA-----VSGVL	46
sst <sub>4</sub>	M-----SAPSTLPGGEELGTAMPSSAANASSAPAEAEVAQPGDARA-----AGMVA	49
sst <sub>5</sub>	M-----EPLFPASTPSWNASSPGAASGGDNRTLVGPAAPSAG-----ARAVL	42
-----TSI-----> <-----TSII----->		
sst <sub>1</sub>	ISFIYSVVCLVGLCONSMVIYVILRYAKMKTATNIYILNLAIADELLMLSVFPLVTSTLL	120
sst <sub>2</sub>	T-FIYFVVCIIIGLCGNTLVIYVILRYAKMKTITNIYILNLAIADELFMLGLPFLAMQVAL	105
sst <sub>3</sub>	IPLVYLVCVVGLLGNLSLVIYVLRHTASPSVTNVIYILNLAIADELFMLGLPFLAAQNAL	106
sst <sub>4</sub>	IQCIIYALVCLVGLVGNALVIFVILRYAKMKTATNIYILNLAVADELFMLSVFVASSAAL	109
sst <sub>5</sub>	VPVLYLLVCAAGLGGNTLVIYVLRFAKMKVTNIYILNLAVADVLYMLGLPFLATQNA	102
<-----TSIII-----> <-----		
sst <sub>1</sub>	RHWPFGALLCRLVLSVDVAVMPTSIYCLTVLSVDRYVAVVHPKAAARYRRPTVAKVNVNLG	180
sst <sub>2</sub>	VHWPFGKAI CRVVMVTVDGINQPTSIFCLTVMSIDRYLAVVHPKSAKWRPRPTAKMITMA	165
sst <sub>3</sub>	SYWPFGLMCRVMAVDGINQPTSIFCLTVMSVDRYLAHVHPTRSARWRTPAVARTVSAA	166
sst <sub>4</sub>	RHWPFGLVLCRAVLSVDLGNMPTSVFCLTVLSVDRYVAVVHPLRAATYRRPVAKLINLG	169
sst <sub>5</sub>	SFWPFGLVLCRLVMTLDGVNQPTSIFCLTVMSVDRYLAHVHPLSSARWRPRVAKLASAA	162
-TSIV-----> <-----TSV---		
sst <sub>1</sub>	VWVLSLLVILPIVFSRT-AANSDGTACNMLMPEAQRWLVGFVLYTFLMGFLFPVGA	239
sst <sub>2</sub>	VWVLSLLVILPIVFSRT-RSNQWGRSSCTINWPGESGANVTGFI ILYTFILGLFVLELTI	224
sst <sub>3</sub>	VWVASAVVVLVVFVSGV-P--RGMSTCHMQWPEPAAAWRAGFI IYTAALGFFGFLVI	222
sst <sub>4</sub>	VWLASLLVTLPIAIFADTRPARGGQAVACNLQWHPFA--NSAVFVVYTFLLGFLFPVLA	227
sst <sub>5</sub>	AVVLSLCLMPLLVFADV-Q---EGGTACNASWPEVGLWGAVFIIYTAVGLGFFAPLLVI	217
-----> <-----TSVI----->		
sst <sub>1</sub>	CLCYVLI IAKMRMVALK--GWQQRKRSEKILTMVMVMVVFVICWMPFYVVLNVF	296
sst <sub>2</sub>	CLCYLFI I I KVKSSGIRV--GSSKRKKEKIVTRMVSIVVAVFIFCWLPHYIFNVSSVS	281
sst <sub>3</sub>	CLCYLLIVKVRAGREVWAPSCQRRRREERRVTRMVAVALFVLCWMPFYVLIINNVV	282
sst <sub>4</sub>	GLCYLLIVKMRVALRA--GWQQRKRSEKILTRVLMVVVVFVLCWMPFYVQLLNLV	284
sst <sub>5</sub>	CLCYLLIVKVRAGVRV--GCV-RRRERKVRMLVVVLFAGCWLFPFTVNIINLA	273
<-----TSVII----->		
sst <sub>1</sub>	AEQDDATVS---QLSVILGYANSCANPILYGLSDNFKRSPQRILCL-----	340
sst <sub>2</sub>	MAISPTPALKGMDFVVLTYANSCANPILYAPLSDNFKSPQNVLCIV-----	330
sst <sub>3</sub>	CPLPEEPAGFLYFLVVALPYANSCANPILYGLSFRKQGFRRVLLRPSRRVRSQEPY	342
sst <sub>4</sub>	VTSLDATVN---HVSLILSYANSCANPILYGLSDNFRRSFORVLC-----	328
sst <sub>5</sub>	VALPQEPASAGLYFFVVLISYANSCANPILYGLSDNFRQSPQKVLCLR-----	322
sst <sub>1</sub>	-----SWMNAAEBEPVYATALKSRA-----YSVEDF	368
sst <sub>2</sub>	-----KVSMTDDGERSDSKQDKSR-----	349
sst <sub>3</sub>	GPPEKTEED---EEEDGEESEREGGKEMNGRVSQITQPOTSGQERPPSRVASKEQ	397
sst <sub>4</sub>	-----RCCLLEGAGGAEELDYATALKSKGG-----AGCMCEPLPC	366
sst <sub>5</sub>	-----KSGAKDADATEPRDRIR-----Q	342
sst <sub>1</sub>	QPENLESGVFRNGTCSRITTL-	391
sst <sub>2</sub>	LNETTETQRTLLNGDLQ--TS-I	369
sst <sub>3</sub>	QLLPQEAETGKSSTMRI--SYL-	418
sst <sub>4</sub>	QQEALQPEPGRKRIPLTR--TTTF	388
sst <sub>5</sub>	QQEATPPAHRAAANGLMQ--TSKL	364

**Εικόνα 3.** Ανάλυση της ομολογίας των αμινοξικών αλληλουχιών των υποδοχέων ssts.

Σχεδόν μια δεκαετία έχει παρέλθει από τότε που οι Yamada και συν. (267) κατόρθωσαν να προσδιορίσουν τη θεμελιώδη δομή του υποδοχέα της SRIF. Οι ανθρώπινοι υποδοχείς sst<sub>1</sub> και sst<sub>2</sub> αποδείχθηκαν ότι ήταν συγγενείς σχετικά μονομερείς πρωτεΐνες μεγέθους 391 και 369 αμινοξέων, αντίστοιχα.

Ωστόσο ο sst<sub>2</sub> υποδοχέας των ποντικών, αν και ίδιος στο μέγεθος με το ανθρώπινο ομόλογο σύμφωνα με τις πρώτες μελέτες (267), βρέθηκε πως υφίσταται

διαφορετική κατεργασία (splicing) κατά την μεταγραφή. Έτσι αυτή η υποκατηγορία είναι μοναδική. Κατά συνέπεια, ο υποδοχέας του ποντικού  $sst_{2A}$  περιλαμβάνει 369 αμινοξέα και ο  $sst_{2B}$  346 αμινοξέα (268;269). Στο ποντίκι το DNA του  $sst_{2B}$  κλωνοποιήθηκε αρχικά από κύτταρα γλοιώματος νευροβλαστώματος (NG 108–15). Ο υποδοχέας  $sst_{2B}$  αντιπροσωπεύει μια περικεκομμένη ισομορφή του  $sst_2$ , στερημένος από περίπου 300 νουκλεοτίδια του διαμεμβρανικού τμήματος VII και του καρβοξυλικού άκρου. Έτσι, το mRNA του  $sst_{2B}$  μεταφράζεται σε μια ακολουθία υπολειπόμενη κατά 23 αμινοξέα από εκείνη του  $sst_{2A}$  (Εικόνα 4). Επιπλέον, οι δύο αυτές ισομορφές διαφέρουν σε 15 αμινοξέα καρβοξυλικά της Lys331 (268).

**Εικόνα 4.** Διαφορές στις αμινοξικές αλληλουχίες των υποτύπων  $sst_{2A}$  και  $sst_{2B}$ .

$sst_{2A}$	VSGTEDGERSDSKQDKSRLNETTETQRTLLNGDLQTSI	332-369
$sst_{2B}$	ADNSQSGAEDI IAWV	332-346

Τώρα είναι πλέον γνωστό ότι αυτό το φαινόμενο που παρατηρείται στον  $sst_2$  του ποντικού δεν είναι ένα μεμονωμένο φαινόμενο. Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδίου  $sst_2$  αποκάλυψε επίσης την παρουσία ορίων ιντρονίων-εξονίων, γεγονός που έδειχνε πως ο  $sst_2$  του ανθρώπου όπως και του ποντικού μπορεί να έχει επίσης ισομορφές (270). Παρόμοια χαρακτηριστικά αναγνωρίστηκαν στον  $sst_2$  του αρουραίου και του χοίρου (271-273).

Μετά από την αρχική ανακάλυψη του Yamada, η ανίχνευση ανθρώπινων βιβλιοθηκών γενομικού DNA με ένα τμήμα του ανθρώπινου γονιδίου του  $sst_2$  οδήγησε σύντομα στην απομόνωση μιας αλληλουχίας DNA που περιέχει την τρίτη υποκατηγορία υποδοχέων σωματοστατίνης, τον ανθρώπινο  $sst_3$ , μια πρωτεΐνη 418 αμινοξέων. Παρόμοια με τον ανθρώπινο  $sst_1$ , η υποκατηγορία  $sst_3$  στερείται ιντρονίων στην περιοχή πρωτεϊνικής κωδικοποίησης (274).

Ακολούθησε σύντομα ο ανθρώπινος  $sst_4$  που κλωνοποιήθηκε αρχικά από τους Rohrer και συν. (275) και κατόπιν από τους Xu και συν. (276) μέσω της ανίχνευσης μιας ανθρώπινης βιβλιοθήκης γενομικού DNA με ολόκληρη την περιοχή κωδικοποίησης του ανθρώπινου γονιδίου  $sst_1$ . Ο κλώνος που απομονώθηκε αποτελείται από το 1164 νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη 388 αμινοξέων και στερείται επίσης ιντρονίων (275-278).

Τέλος συνδυάζοντας PCR με ανίχνευση μια ανθρώπινης βιβλιοθήκη γενομικού DNA επιτεύχθηκε η κλωνοποίηση του ανθρώπινου  $sst_5$  από τους Panetta και συν., που αποτελείται από 363 αμινοξέα (279).

## **2.2. Φαρμακολογία των υποδοχέων σωματοστατίνης και ανάλογα σωματοστατίνης**

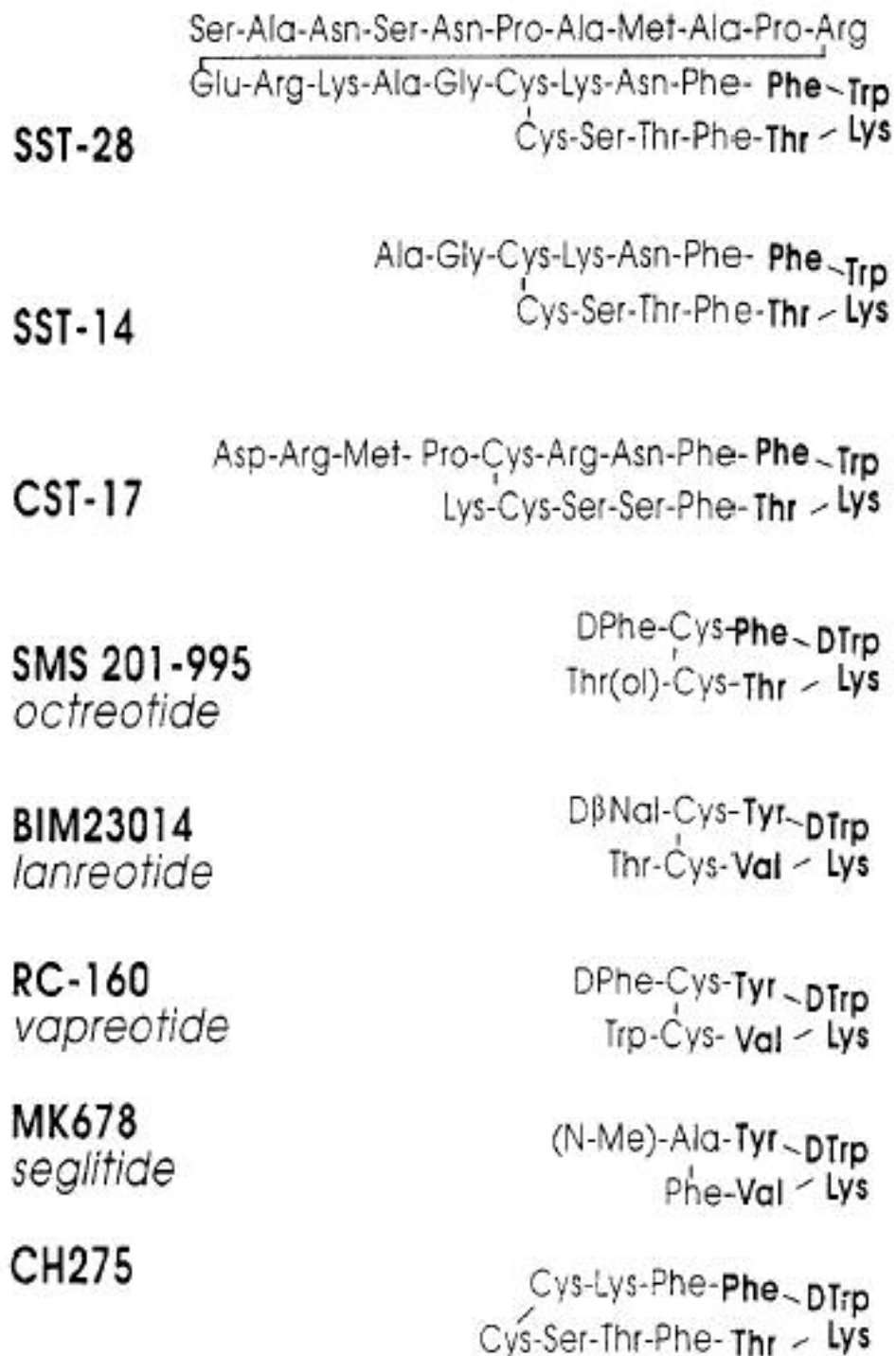
Όλοι οι υποδοχείς δεσμεύουν τη φυσική σωματοστατίνη με υψηλή συγγένεια αλλά διαφέρουν στα χαρακτηριστικά πρόσδεσης διαφόρων αναλόγων σωματοστατίνης (280). Τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά τους, επιτρέπουν τον περαιτέρω διαχωρισμό των υποδοχέων σωματοστατίνης σε δύο κατηγορίες, την SRIF1 ( $sst_2$  /  $sst_3$  /  $sst_5$ , υψηλή συγγένεια για την οκτρεοτίδη ή το seglitide) και την SRIF2 ( $sst_1/sst_4$ , πολύ χαμηλή συγγένεια για τους προαναφερθέντες αγωνιστές) (243;252).

Οι πέντε υποκατηγορίες  $ssts$  δεσμεύουν την SRIF-14 και την SRIF-28 σε συγκεντρώσεις της τάξης του nmol (Πίνακας 5). Οι άνθρωποι  $ssts$  1 έως 4 δεσμεύουν τις SRIF-14 και SRIF-28 σε παρόμοιες συγκεντρώσεις, ενώ ο  $sst_5$  εμφανίζει μεγαλύτερη πρόσδεση κατά 10-15 φορές για την SRIF-28 σε σχέση με την SRIF-14 (243;281). Η hCST17 και η rCST14, παρουσιάζουν επίσης συνάφεια για τους πέντε  $ssts$  σε συγκεντρώσεις της τάξης των λίγων nmol (281;282).



Πίνακας 5.	IC <sub>50</sub> (nM)				
	sst <sub>1</sub>	sst <sub>2</sub>	sst <sub>3</sub>	sst <sub>4</sub>	sst <sub>5</sub>
<b>Φυσικά πεπτίδια</b>					
SST-14	0,1–2,26	0,2–1,3	0,3–1,6	0,3–1,8	0,2–0,9
SST-28	0,1–2,2	0,2–4,1	0,3–6,1	0,3–7,9	0,05–0,4
HCST-17	7	0,6	0,6	0,5	0,4
rCST-29	2,8	7,1	0,2	3	13,7
<b>Συνθετικά πεπτίδια</b>					
Octreotide	290–1140	0,4–2,1	4,4–34,5	1000	5,6–32
Lanreotide	500–2330	0,5–1,8	43–107	66–2100	0,6–14
Vapreotide	1000	5,4	31	45	0,7
Seglitide	1000	0,1–1,5	27–36	127–1000	2–23
BIM23268	18,4	15,1	61,6	16,3	0,37
NC8-12	1000	0,024	0,09	1000	1000
BIM23197	1000	0,19	26,8	1000	9,8
CH275	3,2–4,3	1000	1000	4,3–874	1000
SOM230	8,2	9,0	9,1	<7,0	9,9
<b>Μη-πεπτιδικά ανάλογα</b>					
L-797,591	1,4	1,875	2240	170	3600
L-779,976	2760	0.05	729	310	4260
L-796,778	1255	10.000	24	8650	1200
L-803,087	199	4720	1280	0.7	3880
L-817,818	3.3	52	64	82	0,4

Η ειδικότητα της ενδογενούς SRIF οφείλεται στο γεγονός ότι παράγεται κυρίως τοπικά και αδρανοποιείται ταχύτατα μετά από την απελευθέρωση από πεπτιδάσες των ιστών και του αίματος, ελαχιστοποιώντας με αυτόν τον τρόπο τα ανεπιθύμητα συστηματικά αποτελέσματα. Η χορήγηση όμως συνθετικών αναλόγων SRIF, προκαλεί μια σειρά συστηματικών αποτελεσμάτων λόγω της ταυτόχρονης ενεργοποίησης πολλαπλών κυττάρων στόχων. Κατά συνέπεια για την ανάπτυξη αποτελεσματικής θεραπείας που αποσκοπεί στην ενεργοποίηση των υποδοχέων ssts, είναι απαραίτητο να σχεδιαστούν ανάλογα με εκλεκτικές δράσεις σε αυτούς και με μεγαλύτερη μεταβολική σταθερότητα από τα φυσικά πεπτίδια (Εικόνα 4). Μελέτες της δομής και της δραστηριότητας της SRIF-14 έχουν δείξει ότι τα αμινοξέα Phe7, Trp8, Lys9 και Thr10 είναι απαραίτητα για τη βιολογική δραστηριότητά της, ενώ τα αμινοξέα Trp8 και Lys9 είναι ουσιαστικής σημασίας, ενώ τα Phe7 και Thr10 μπορούν να υποβληθούν σε δευτερεύουσες αντικαταστάσεις π.χ. Phe με Tyr και Thr με Ser ή Val.



**Εκόνα 5.** Δευτεροταγής δομή των φυσικών και συνθετικών σωματοστατινεργικών πεπτιδίων.

Η γενική στρατηγική για τα ανάλογα SRIF ήταν να διατηρηθούν τα κρίσιμα Phe7, Trp8, Lys9, Thr10 και να ενσωματωθούν ποικίλες κυκλικές και δικυκλικές δομές μέσω είτε ενός δεσμού δισουλφιδίου είτε ενός δεσμού αμιδίων για να σταθεροποιηθεί η β στροφή γύρω από τα συντηρημένα υπολείμματα (283;284). Κατ' αυτό τον τρόπο έχει συντεθεί μια σειρά συνθετικών ενώσεων, αρκετές από τις οποίες παρουσιάζουν μεγαλύτερη μεταβολική σταθερότητα καθώς και επιλεκτικότητα για συγκεκριμένους υποδοχείς σε σχέση με την SRIF-14 (Πίνακας IC50) (243). Με την χρήση αυτής της προσέγγισης προέκυψε η πρώτη κλινικά χρήσιμη ένωση που ήταν το οκταπεπτίδιο SMS201-995 (SMS, Οκτρεοτίδη, Octreotide), η οποία εισήχθη στην κλινική πράξη το 1983 για την θεραπεία ορμονοπαραγωγών όγκων της υπόφυσης, του παγκρέατος και του εντέρου και αποτελεί ακόμα και σήμερα την βάση της θεραπείας με ανάλογα SRIF (248;283;285). Η οκτρεοτίδη μαζί με την BIM23014 (Λανρεοτίδη, Lanreotide, που τώρα είναι επίσης διαθέσιμη για κλινική χρήση), το οκταπεπτίδιο RC160 (Βαπρεοτίδη, Vapreotide) και το εξαπεπτίδιο MK678 (Seglitide) δεσμεύονται μόνο σε τρεις από τους ssts, εμφανίζοντας μεγαλύτερη συγγένεια για τους υποτύπους sst<sub>2</sub> και sst<sub>5</sub> και μέτρια συγγένεια για τον sst<sub>3</sub> (243;246;280;281). Εκτός από τις SRIF-14, SRIF-28, CST και μερικά από τα άμεσα δομικά παράγωγά τους, μόνο το νέο ανάλογο SOM230 έχει περιγραφεί να προσδένεται σε όλους τους υποδοχείς σωματοστατίνης (286-288). Τα διάφορα άλλα ανάλογα SRIF έχουν αναφερθεί κατά καιρούς να είναι εκλεκτικά για μια υποκατηγορία ssts, εντούτοις, τέτοιες αξιώσεις επιλεκτικότητας δεν έχουν επιβεβαιωθεί (246;252;280). Έχει περιγραφεί επίσης μια σειρά μη-πεπτιδικών αγωνιστών για καθένα από τους ssts (289;290). Τρεις από τις ενώσεις αυτές, οι L-797591, L-779976, και L-803087, επιδεικνύουν συγγένεια σε συγκεντρώσεις της τάξης των nmol για τους sst<sub>1</sub> (1,4 nM), sst<sub>2</sub> (0,05 nM), και sst<sub>4</sub> (0,7 nM), (174). Το L-796778 δεσμεύεται στον sst<sub>3</sub> με συγγένεια 50 φορές μικρότερη απ'ότι με τους άλλους υποδοχείς (24 nM), ενώ το L-817818 προσδένεται με μεγάλη συγγένεια στους υποτύπους sst<sub>1</sub> και sst<sub>5</sub> (0,4 και 3,3 nM, αντίστοιχα) αλλά παρουσιάζει και κάποια συγγένεια και για τους άλλους τρεις υποτύπους. Η διαθεσιμότητα αυτών των αγωνιστών υψηλής-συγγένειας και ειδικότητας για αρκετούς από τους ssts παρέχει ένα χρήσιμο εργαλείο στον χώρο της μελέτης των δράσεων της SRIF, καθώς επιτρέπει την άμεση εξέταση των υπέρ-ειδικών φυσιολογικών λειτουργιών της SRIF καθώς επίσης και την ανάπτυξη ενεργών υποτυπο-ειδικών

θεραπευτικών ενώσεων που μπορούν να χορηγηθούν *per os*. Πρόσφατα, περιγράφηκαν επίσης οι πρώτοι πιθανοί ανταγωνιστές *ssts* (291-295), αλλά νέα στοιχεία έχουν δείξει ότι κάποιοι από αυτούς έχουν επίσης ιδιότητες μερικών αγωνιστών (*partial agonists*) ή ότι μπορεί να μην είναι τόσο εκλεκτικοί για συγκεκριμένους υποτύπους όπως πρωτοπεριγράφηκαν (296;297).

### 2.3. Μηχανισμοί μετάδοσης σήματος των υποδοχέων σωματοστατίνης

Οι υποδοχείς σωματοστατίνης ασκούν τις δράσεις τους μέσω G-πρωτεϊνών και κυρίως των ανασταλτικών G<sub>i</sub>-πρωτεϊνών (298-301), τροποποιώντας μια σειρά από συστήματα δεύτερου αγγελιοφόρου που περιλαμβάνουν την αδενυλική κυκλάση, κανάλια ιόντων ασβεστίου και καλίου, κανάλια ανταλλαγής νατρίου/υδρογόνου, την γουανυλική κυκλάση, τη φωσφολιπάση C, την φωσφολιπάση A2, τις PI3 κινάσες, τις MAP κινάσες (MAPK) και φωσφατάσες σερίνης, θρεονίνης και φωσφοτυροσινικών πρωτεϊνών (Πίνακας 6) (243;302).

#### Πίνακας 6.

Δεύτερο μήνυμα	<i>sst</i> <sub>1</sub>	<i>sst</i> <sub>2</sub>	<i>sst</i> <sub>3</sub>	<i>sst</i> <sub>4</sub>	<i>sst</i> <sub>5</sub>
Αδενυλική κυκλάση	↓	↓	↓	↓	↓
Τυροσινική Φωσφατάση	↑	↑	↑	↑	↑
MAP κινάση	↑	↓	↓↑	↑	↓
Κανάλια K <sup>+</sup>		↑	↑	↑	↑
Κανάλια Ca <sup>++</sup>	↓	↓			
Κανάλια Ανταλλαγής Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	↑				
Φωσφολιπάση C/PI3 κινάση		↑			↑↓
Φωσφολιπάση A2				↑	

Σε ότι αφορά τις φωσφατάσες των φωσφοτυροσινικών πρωτεϊνών (*phosphotyrosine phosphatases*, PTPs, SHP-1 και 2), αξίζει να αναφερθεί ότι μια σειρά μελετών έχουν παρουσιάσει αποδείξεις ότι μπορεί να διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στη μεσολάβηση της κυτταροστατικής επίδρασης των *ssts* σε πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων (303-309).

Και οι τρεις υποτύποι της  $G_{ai}$  G-πρωτεΐνης,  $G_{ia1}$ ,  $G_{ia2}$ , και  $G_{ia3}$  (καθώς και οι  $G_{oa}$ ,  $G_{za}$ ,  $G_{b36}$ ,  $G_{g2}$ ,  $G_{g3}$ ) έχουν συσχετιστεί με την ενεργοποίηση των υποδοχέων σωματοστατίνης. Η δε κατάσταση μόνιμης σύνδεσης ή όχι των ssts με αυτές τις πρωτεΐνες φαίνεται να εξαρτάται από την παρουσία ή απουσία αγωνιστή (298-301). Ένα βασικό ζήτημα σχετικά με την ειδικότητα του σήματος σε μια οικογένεια υποδοχέων όπως οι ssts είναι εάν μια δεδομένη υποκατηγορία ενεργοποιεί μόνο μια ή περισσότερες G-πρωτεΐνες-διαβίβασης σήματος. Διάφορα εργαστήρια έχουν αρχίσει να εξετάζουν αυτό το ζήτημα χρησιμοποιώντας τις υποκατηγορίες ssts που εκφράζονται χωριστά στα διάφορους τύπους κυττάρων. Μια υποθετική αλληλουχία η οποία θεωρείται ειδική για την πρωτεϊνική σύζευξη με τις G-πρωτεΐνες υπάρχει στο τρίτο κυτταροπλασματικό τμήμα των  $sst_{2-5}$  αλλά όχι στον  $sst_1$ . Εν τούτης, και ο  $sst_1$  συνδέεται με την αδενυλική κυκλάση μέσω της  $G_{ai3}$  (310). Ο  $sst_{2A}$  έχει βρεθεί πως συνδέεται με τις  $G_{ia1}$ ,  $G_{ia2}$ ,  $G_{ia3}$ , και  $G_{oa}$  (301) ενώ ο  $sst_3$  αλληλεπιδρά με τις  $G_{ai1}$ ,  $G_{ai2}$ ,  $G_{ai4}$ , και  $G_{ai6}$  (311). Οι συγκεκριμένες G-πρωτεΐνες που συνδέονται με τις άλλες υποκατηγορίες ssts δεν έχουν αναγνωρισθεί.

Επομένως, οι διάφορες υποκατηγορίες των ssts μπορούν να ενεργοποιήσουν περισσότερες από μία G-πρωτεΐνες καθώς και τους συνδεδεμένους με αυτές τις G-πρωτεΐνες καταρράκτες μεταφοράς σήματος. Αφού οι πέντε ssts δεσμεύουν τους φυσικούς αγωνιστές SRIF-14 και SRIF-28 με συγγένεια της τάξης των λίγων nMol και μοιράζονται κοινά μονοπάτια διαβίβασης σήματος όπως η αδενυλική κυκλάση, και δεδομένου ότι τα περισσότερα κύτταρα εκφράζουν περισσότερες από μια υποκατηγορίες ssts, το ερώτημα που προκύπτει είναι εάν οι πολλοί υποτύποι ssts στο ίδιο κύτταρο είναι περιττοί ή εάν αλληλεπιδρούν λειτουργικά για τη πρόκληση διαφορετικού σήματος. Υπάρχουν κάποια στοιχεία που προτείνουν ότι τα μέλη της οικογένειας ssts υφίστανται ομοδιμερισμό ή και ετεροδιμερισμό και ότι η διμερής ένωση αλλάζει τις λειτουργικές ιδιότητες του υποδοχέα όπως τη δεσμευτική συγγένεια για κάποιο αγωνιστή και την πρόκληση σήματος από κάποιο αγωνιστή. Τέτοια άμεση πρωτεϊνική αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφορετικών υποτύπων ssts και ενδεχομένως μεταξύ των ssts και των συγγενών με αυτούς υποδοχέων, όπως οι υποδοχείς οπιοειδών, πιθανόν να δημιουργεί ένα νέο επίπεδο μοριακής αλληλεπίδρασης μεταξύ των συνδεδεμένων με G-πρωτεΐνες υποδοχέων (312-318).

## 2.4. Ιστική κατανομή των υποδοχέων σωματοστατίνης

Η ιστική κατανομή των υποκατηγοριών των ssts έχει μελετηθεί στους ιστούς των τρωκτικών και του ανθρώπου καθώς επίσης και σε διάφορους όγκους και καρκινικές κυτταρικές σειρές με Northern Blot, RT-PCR, δοκιμασίες προστασίας ριβονουκλεάσης, *in situ* υβριδισμό και ανοσοϊστοχημεία (243;247;281;319-323). Αυτές οι μελέτες έχουν αποκαλύψει ένα περίπλοκο χάρτη έκφρασης των διαφόρων υποκατηγοριών ssts σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα και την περιφέρεια με ποικίλη επικάλυψη των διαφόρων υποτύπων, με χαρακτηριστικά που είναι ειδικά για κάθε υπότυπο, ιστό και είδος (246;281;323).

### 2.4.1. ΚΝΣ

Ο ssts<sub>1</sub> βρέθηκε να διανέμεται ευρέως σε όλο το ΚΝΣ (320;322;324-326). Έχουν παρατηρηθεί διαφορές μεταξύ διαφόρων ειδών, π.χ. υψηλά επίπεδα mRNA στην αμυγδαλή στον εγκέφαλο ποντικών και αρουραίων (320;324;325) και μη ανιχνεύσιμη έκφραση στις αντίστοιχες περιοχές του ανθρώπινου εγκεφάλου. Sst<sub>1</sub> έχει ανιχνευθεί στην υπόφυση τόσο του ανθρώπου όσο και του αρουραίου (327;328).

Το mRNA του sst<sub>2</sub> βρέθηκε να εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού (320;322;324;325;327). Άλλες περιοχές που παρουσίασαν έκφραση mRNA του sst<sub>2</sub> περιλαμβάνουν τα ινία, την οδοντωτή έλικα και την παρεγκεφαλίδα (320;322;324;327). Υψηλά επίπεδα mRNA sst<sub>2</sub> βρέθηκαν στην υπόφυση του αρουραίου και του ανθρώπου (327;328). Χρησιμοποιώντας ειδικά υβρίδια έναντι του sst<sub>2A</sub> και του sst<sub>2B</sub>, mRNAs των υποτύπων αυτών βρέθηκαν σε όλο τον εγκέφαλο του ποντικού αλλά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (sst<sub>2A</sub>>sst<sub>2B</sub>). Αντίθετα, η γέφυρα και ο προμήκης μυελός περιείχαν παρόμοια επίπεδα mRNA των δύο υποτύπων (269).

Τα επίπεδα έκφρασης mRNA των sst<sub>3</sub> στο ΚΝΣ που αναφέρεται από διάφορους μελετητές ποικίλλουν (322;324-326;329). Εντούτοις, υπάρχει συναίνεση σχετικά με την αφθονία mRNA του sst<sub>3</sub> στα παρεγκεφαλιδικά κύτταρα του Purkinje και της κοκκώδους στιβάδας (322;324-326;329). Επιπλέον, παρατηρήθηκε έκφραση mRNA του sst<sub>3</sub> στα

βαθιά φλοιώδη στρώματα, στο ιππόκαμπο και σε διάφορους πυρήνες του μεσεγκεφάλου (322;324-326;329), στους κινητικούς νευρώνες και στους αισθητήριους νευρώνες του νωτιαίου μυελού και του τρίδυμου νεύρου αρουραίων (330). Επίσης τόσο στον αρουραίο όσο και στον άνθρωπο παρατηρήθηκε αδύνατο σήμα mRNA του *sst<sub>3</sub>* στην υπόφυση (327;328).

Τα πυραμιδικά κύτταρα του ιππόκαμπου έχουν το πιο υψηλό επίπεδο έκφρασης *sst<sub>4</sub>* mRNA στο ΚΝΣ του αρουραίου (329;331). Στον αρουραίο και στον ανθρώπινο εγκέφαλο έχει ανευρεθεί mRNA αυτού του υποδοχέα στα βαθιά στρώματα του μετωπιαίου φλοιού και σε διάφορους πυρήνες του ισθμού του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένου του ερυθρού πυρήνα, του σφηνοειδούς και νωτιαίου πυρήνα του τρίδυμου νεύρου (324-327;331). Ταυτόχρονος εντοπισμός του mRNA των *sst<sub>3</sub>* και *sst<sub>4</sub>* βρέθηκε στον ιππόκαμπο και σε φλοιώδεις νευρώνες αρουραίου και ανθρώπου (329).

Λίγες μελέτες είναι διαθέσιμες για την κατανομή της έκφρασης του mRNA του *sst<sub>5</sub>* στο ΚΝΣ. Στον αρουραίο, υψηλότερη έκφραση mRNA βρέθηκε στον υποθάλαμο και τη προοπτική περιοχή και χαμηλότερο στον ιππόκαμπο και τον εγκεφαλικό φλοιό (325). Εντούτοις, στον ανθρώπινο εγκέφαλο ο mRNA του *sst<sub>5</sub>* ανιχνεύθηκε μόνο στα κοκκιώδη κύτταρα της παρεγκεφαλίδας (327), μια περιοχή στην οποία δεν έχει αναφερθεί έκφραση στον αρουραίο. Μελέτες συνεντοπισμού έδειξαν ότι ένα μεγάλο μέρος των κυττάρων που παράγουν GH στην υπόφυση του αρουραίου εκφράζουν mRNAs τόσο του *sst<sub>4</sub>* όσο και του *sst<sub>5</sub>* (328). Η έκφραση του *sst<sub>5</sub>* έχει παρατηρηθεί επίσης στην ανθρώπινη υπόφυση (327).

#### **2.4.2. Περιφερικοί ιστοί**

Πέρα από το ΚΝΣ, μια πλειάδα περιφερικών ιστών φέρουν υποδοχείς σωματοστατίνης (πίνακας 7, (302)).

Πίνακας 7.

	sst1	sst2	sst3	sst4	sst5
ΚΝΣ	εγκέφαλος υποθάλαμος υπόφυση νωτιαίος μυελός	παρεγκεφαλίδα εγκέφαλος υπόφυση	παρεγκεφαλίδα εγκέφαλος υπόφυση	παρεγκεφαλίδα εγκέφαλος υπόφυση	παρεγκεφαλίδα υποθάλαμος υπόφυση
Θώρακας	πνεύμονας σκελετικοί μυες			πνεύμονας	καρδιά
Κοιλία	δωδεκαδάκτυλο νεφρός ήπαρ πάγκρεας πλακούντας στομάχι	νεφρός πάγκρεας στομάχι	πάγκρεας στομάχι	πάγκρεας πλακούντας στομάχι	επινεφρίδια πάγκρεας πλακούντας λεπτό έντερο στομάχι

Όπως τα κύτταρα της υπόφυσης, ομοίως και κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος τύπου β, α και δ εκφράζουν πολλαπλές ισομορφές των υποδοχέων ssts, με τα β κύτταρα να είναι πλούσια σε sst<sub>1</sub> και sst<sub>5</sub>, τα α κύτταρα σε sst<sub>2</sub>, και τα δ κύτταρα σε sst<sub>5</sub> (332). Έκφραση mRNA και των πέντε ssts έχει ανευρεθεί επίσης στο στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα, τον ειλέο, και το παχύ έντερο αρουραίων (333). Σε όλους αυτούς τους ιστούς οι ssts<sub>1-5</sub> βρίσκονται στο επιθήλιο και στα εξωτερικά μυϊκά στρώματα ενώ το εντερικό νευρικό πλέγμα χαρακτηρίζεται από την παρουσία μόνο sst<sub>1-3</sub> mRNA και των πέντε ssts έχει επίσης ανευρεθεί και στο ανθρώπινο στομάχι (334). Τα επινεφρίδια, ένα γνωστό όργανο-στόχος της δράσης της SRIF, επιδεικνύουν μια πλούσια συγκέντρωση sst<sub>2</sub> καθώς και μέτρια επίπεδα sst<sub>1</sub> και sst<sub>3</sub> (323;335). Διάφορα άλλα όργανα παρουσιάζουν επίσης ένα σημαντικό επίπεδο έκφρασης μερικών υποκατηγοριών ssts, π.χ. sst<sub>3</sub> στο ήπαρ και τον σπλήνα, sst<sub>4</sub> στον πνεύμονα, την καρδιά, και τον πλακούντα, και sst<sub>1,2</sub> και 3 στα σπερματοκύτταρα και στα κύτταρα Sertoli των όρχεων (275;323;328;335-337). Και οι πέντε ssts εκφράζονται στην αορτή αρουραίων, κυρίως στα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών (338). mRNA των sst<sub>1</sub>, sst<sub>2A</sub> και sst<sub>3</sub> εκφράζεται στον ανθρώπινο θύμο αδένα (263;339). Τέλος, τα ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού (μακρόφαγα, Τ-λεμφοκύτταρα, Β-λεμφοκύτταρα) εκφράζουν την υποκατηγορία sst<sub>2</sub> (263;264;340;341).



### 2.4.3. Έκφραση ssts από νεοπλασματικούς ιστούς.

Εκτός από τους φυσιολογικούς ιστούς, πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές υπόφυσης (AtT-20, GH4C1), παγκρέατος (AR42J), μαστού (MCF7, T47D), προστάτη (LNCaP, PC-3, DU-145), παχέως εντέρου (HCT-116, LoVo, HCT-15, HT-29) νευρικού ιστού (LA-N-2 neuroblastoma), και αιμοποιητικού ιστού (Jurkat, U266, ISK-B, MT-2T) είναι πλούσιες σε ssts και συνήθως εκφράζουν mRNA για περισσότερες της μίας υποκατηγορίες ssts (246;281;323;342-344). Επιπλέον, η πλειοψηφία των ανθρωπίνων όγκων, είτε καλοήθεις είτε κακοήθεις, είναι γενικά θετικοί για περισσότερους από έναν ssts (246;247;281;319;345). Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι όγκοι της υπόφυσης, οι καρκινοειδείς όγκοι, τα ισουλινώματα, τα γλυκαγονώματα, το φαιοχρωμοκύτωμα, ο καρκίνος του μαστού, του νεφρού, του ήπατος, του προστάτη, της μήτρας, των ωοθηκών, του πνεύμονα, τα μηνιγγιώματα και τα γλοιώματα ενώ νέες δημοσιεύσεις διευρύνουν συνεχώς αυτή τη λίστα (343;344;346-352). Σε γενικές γραμμές παρατηρείται σε αυτούς τους όγκους πολύ συχνή έκφραση mRNA του sst<sub>2</sub>. Έκφραση mRNA του sst<sub>1</sub> παρατηρείται λιγότερο συχνά και ακολουθείται από τον sst<sub>3</sub> και τον sst<sub>4</sub>. Η έκφραση sst<sub>5</sub> φαίνεται πως είναι όγκο-εξαρτώμενη, όντας θετική σε μερικούς όγκους, π.χ. μαστός, αλλά απύσα σε άλλους, π.χ. όγκους των νησιδίων του παγκρέατος (243;281;323). Πρέπει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι ουσιαστικά οι περισσότερες πρώιμες αναλύσεις των υποκατηγοριών των ssts που είχαν πραγματοποιηθεί, είχαν βασιστεί στην έκφραση mRNA, η οποία μπορεί να μην συμβαδίζει απαραίτητα με την παρουσία λειτουργικών υποδοχέων. Πάντως, νεότερες μελέτες με ανοσοϊστοχημεία και μελέτες ανίχνευσης της πρωτεΐνης των ssts φαίνεται να επιβεβαιώνουν σε μια πρώτη φάση τα έως τώρα ευρήματα (343;344;347-352). Επίσης η τεχνική της ανίχνευσης των όγκων αυτών με ραδιενεργά σημασμένα οκτρεοτίδη φαίνεται να επιβεβαιώνει και αυτή την παρουσία ssts σε πολυάριθμους ανθρώπινους όγκους (248;353;354)

Ειδικά για το HKK και τις κυτταρικές σειρές HKK υπάρχουν πολύ λίγα δεδομένα σχετικά με την παρουσία υποδοχέων σωματοστατίνης. Σε τρεις διαφορετικές μελέτες πάντως έχει αναφερθεί παρουσία ssts αλλά όχι σε όλους τους όγκους (113;115;355).

### 3. Δράση της Σωματοστατίνης, της Κορτιστατίνης και των αναλόγων τους

#### 3.1. Φυσιολογικός Ρόλος

##### 3.1.1. Σωματοστατίνη

Στα έτη που ακολούθησαν την ανακάλυψή της SRIF, ένας μεγάλος αριθμός μελετών αποκάλυψε διάφορες λειτουργίες της. Όσον αφορά τη φυσιολογική δράση της SRIF είναι πλέον γνωστό ότι εμποδίζει την έκκριση ενός ευρέος φάσματος ορμονών, συμπεριλαμβανομένης της GH (356-358), της προλακτίνης (PL) (359), και TSH (359), πολλών ορμονών του γαστρεντερικού συστήματος, π.χ. χολοκυστοκινίνη (CCK), γαστρικό ανασταλτικό πεπτίδιο (GIP), γαστρίνη, μοτιλίνη, νευροτενσίνη και σεκρετίνη (319), καθώς και της γλυκαγόνης, της ινσουλίνης, και του παγκρεατικού πολυπεπτιδίου (PP) από τα παγκρεατικά νησίδια του Langerhans (360). Η ανασταλτική της δράση επεκτείνεται στη εξωκρινή δραστηριότητα των σιελογόνων αδένων (αμυλάση), του γαστρεντερικού βλεννογόνου (υδροχλωρικό οξύ, πεψινογόνο, ενδογενής παράγοντας) (361), των παγκρεατικών πόρων (ένζυμα, διττανθρακικό άλας) (362-366) και του ήπατος (χολή) (364-366). Ομοίως, η εντερική απορρόφηση των βασικών θρεπτικών ουσιών (γλυκόζη, λίπος, και αμινοξέα) εμποδίζεται από την SRIF (367). Αλλά όσον αφορά την γαστρεντερική κινητικότητα, οι δράσεις της SRIF είναι αρκετά σύνθετες, καθυστερώντας την πρόωμη φάση γαστρικής εκκένωσης, αποδυναμώνοντας τη συστολή της χοληδόχου κύστεως (364;365), και παρατείνοντας τον χρόνο διέλευσης της τροφής από το λεπτό έντερο (368). Εντούτοις, η οκτρεοτίδη προκαλεί μια αύξηση 3 έως 4 φορές στον χρόνο διέλευσης της τροφής από το στόμα μέχρι το ορθό (364;369). Τα αιμοδυναμικά χαρακτηριστικά των μεσεντέριων αγγείων έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζονται από την SRIF, με αποτέλεσμα πτώση της πυλαίας πίεσης (370). Διάφορες παράμετροι της νεφρικής λειτουργίας αποκρίνονται στην SRIF. Όταν χρησιμοποιείται σε φαρμακολογικές δόσεις, η SRIF έχει μια αντιδιουρητική επίδραση (371;372) και αναστέλλει την έκκριση ρενίνης (373). Στο ΚΝΣ η SRIF θεωρείται ότι ρυθμίζει δραστηριότητες που σχετίζονται με τη γνώση-μάθηση και την κίνητικότητα ενώ εμπλέκεται και στην παθοφυσιολογία νευρολογικών και ψυχιατρικών νόσων (256;374;375). Στο ανοσοποιητικό σύστημα έχει αναφερθεί ότι παρεμποδίζει τη σύνθεση

ανοσοσφαιρινών και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων αλλά αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του θύμου και διεγείρει τα T-λεμφοκύτταρα (376-379). Τέλος η SRIF έχει μια αντιπολλαπλασιαστική επίδραση, έναντι μιτογόνων σημάτων που προκαλούν ουσίες όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και η σωματομεδίνη C (somatomedin C/insulin-like growth factor 1, IGF-1) (302). Ωστόσο νέες μελέτες κάθε μέρα περιγράφουν και άλλες φυσιολογικές δράσεις της SRIF.

### 3.1.2. Κορτιστατίνη (CST)

Η CST περιγράφηκε αρχικά ως ένα πεπτίδιο που μειώνει τη νευρωνική ηλεκτρική δραστηριότητα και προκαλεί τα χαμηλής συχνότητας κύματα στον εγκεφαλικό φλοιό χαρακτηριστικά που την συσχέτισαν με τις διαδικασίες του ύπνου και με τον έλεγχο της λειτουργίας του φλοιού (258;380;381). Συγκεκριμένα επάγει τον ύπνο αργών-κυμάτων, μέσω του ανταγωνισμού των διεγερτικών αποτελεσμάτων της ακετυλοχολίνης στο φλοιό και τη μείωση της κινητικής δραστηριότητας, ενώ η έκφραση του mRNA της CST ακολουθεί έναν κιρκάδιο ρυθμό και επάγεται από τη στέρηση ύπνου (259). Στη συνέχεια βρέθηκε ότι επηρεάζει την σταθεροποίηση τόσο της πρόσφατης όσο και της μακροπρόθεσμης μνήμης (382;383), τις κινητικές δραστηριότητες (384) και την αντίληψη του πόνου (385). Ακόμα έχει βρεθεί ότι έχει προστατευτικές ιδιότητες έναντι νευροτοξικών παραγόντων (386;387) αλλά και της ισχαιμίας (388). Η CST είναι και αυτή ένας ισχυρός και αποτελεσματικός ανασταλτικός παράγοντας της απελευθέρωσης της GH αλλά και της ινσουλίνης, δίχως να επηρεάζει την προλακτίνη, την ACTH ή την κορτιζόλη (389-391). Επίσης η CST, σε αντίθεση με την σωματοστατίνη, δεσμεύεται από τον υποδοχέα έκκρισης της GH (growth hormone secretagogue receptors, GHS-R receptors) της ανθρώπινης υπόφυσης, του οποίου φυσικός αγωνιστής είναι το πεπτίδιο γκρελίνη και πιθανόν να τροποποιεί την δραστηριότητα αυτών των υποδοχέων (392). Επίσης αναστέλει και την έκκριση της γκρελίνης (390). Αρκετά ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η CST-14 έχει βρεθεί ότι ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων θύμου μέσω είτε των ssts είτε του GHS-R (393). Η ανεύρεση της έκφρασης της CST στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος υποδεικνύει έναν πιθανό

ανοσοτροποποιητικό ρόλο αυτού του πεπτιδίου (253;263;264). Τέλος η ανεύρεση CST στο φυσιολογικό πάγκρεας μπορεί να παίζει ρόλο στην ρύθμιση μαζί με την SRIF της έκκρισης της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης (394).

### **3.2. Σωματοστατινεργικά πεπτίδια και καρκίνος**

#### **3.2.1. Πειραματικά μοντέλα**

Ένας πολύ μεγάλος αριθμός ανθρώπινων και ζωικών καρκινικών κυτταρικών σειρών έχει αναφερθεί πως εμφανίζουν μείωση του πολλαπλασιασμού τους ή και απόπτωση μετά από επίδραση με ανάλογα SRIF, όπως καρκινικές κυτταρικές σειρές υπόφυσης (AtT-20, GH4C1), παγκρέατος (AR42J), μαστού (MCF7, T47D), προστάτη (LNCaP, PC-3, DU-145), παχέως εντέρου (HCT-116, LoVo, HCT-15, HT-29) νευρικού ιστού (LA-N-2 neuroblastoma), αιμοποιητικού ιστού (Jurkat, U266, ISK-B, MT-2T) και η λίστα των μελετών με νέα ανάλογα SRIF και άλλες κυτταρικές σειρές συνεχώς αυξάνεται (246;248;281;303;306;323;342-344;346;354;395).

Επίσης τα ανάλογα SRIF έχει αναφερθεί πως εμποδίζουν την ανάπτυξη διάφορων όγκων που μεταμοσχεύθηκαν χειρουργικά ή με ένεση σε τρωκτικά όπως οστεοσαρκώματα, χονδροσαρκώματα, αδenoκαρκινώματα παγκρέατος και παχέως εντέρου, όγκους της υπόφυσης, μη μικροκυτταρικά καρκινώματα πνεύμονα, ινσουλινώματα, καρκίνους μαστού και προστάτη, καθώς και ηπατοκυτταρικά καρκινώματα. Πέρα από την αναστολή/μείωση της μεγέθυνσης του όγκου παρατηρείται και παράταση στην επιβίωση των ζώων που φέρουν τους όγκους (190;248;354;396). Το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών των όγκων εξέφραζε ssts. Επειδή τα άμεσα αντιπολλαπλασιαστικά αποτελέσματα των αναλόγων SRIF έχουν καταδειχθεί σε πολλά μοντέλα κυτταρικών σειρών *in vitro*, εκτιμήθηκε αρχικά ότι και στους μεταμοσχεύσιμους όγκους η επίδραση θα ήταν κυρίως άμεση. Εντούτοις ssts δεν εκφράζονταν σε όλα αυτά τα πειραματικά μοντέλα όγκων, γεγονός που καταδεικνύει την παρουσία έμμεσων μηχανισμών ελέγχου των όγκων από τα SRIF ανάλογα. Αυτοί θα μπορούσαν να είναι η παρεμπόδιση της απελευθέρωσης της GH, της γαστρίνης ή της ινσουλίνης, και επίσης η

παρεμπόδιση των IGFs. Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων τα ανάλογα SRIF ασκούν το αντιπολλαπλασιαστικό τους αποτέλεσμα είναι μέσω της παρεμπόδισης της νεοαγγειογένεσης των όγκων ή της επίδρασης στο ανοσοποιητικό σύστημα. Διάφορες πειραματικές μελέτες προτείνουν ότι τα ανάλογα SS εμποδίζουν την αγγειογένεση *in vitro* και *in vivo*, ενώ η υπερέκφραση στο γύρω από τον όγκο αγγειακό πλέγμα υποδοχέων ssts έχει αναφερθεί σε διάφορους ανθρώπινους καρκίνους (249;397). Ένας τέτοιος έμμεσος τρόπος δράσης των αναλόγων SRIF έχει περιγραφεί και σε πειραματικά μοντέλα HKK σε ποντίκια (190).

### 3.2.2. Θεραπευτικές Εφαρμογές

Η αρχική και πιο σημαντική έως τώρα εφαρμογή των αναλόγων σωματοστατίνης στον καρκίνο αφορά τους νευροενδοκρινικούς όγκους της υπόφυσης αλλά και του γαστρεντερικού συστήματος και των νησιδίων του παγκρέατος (354;398). Η μακροχρόνια θεραπεία με τα μακράς δράσης ανάλογα SRIF octreotide και lanreotide καταστέλλει την απελευθέρωση της GH από αδενώματα της υπόφυσης που παράγουν GH, με αποτέλεσμα την ομαλοποίηση των επιπέδων του IGF-1 στα δύο τρίτα των ασθενών με τη μεγαλακρία. Εκτός από τη άμεση κλινική βελτίωση παρατηρείται και συρρίκνωση των όγκων λόγω μείωσης του μεγέθους των κυττάρων, τα οποία δεν συνθέτουν και δεν εκκρίνουν πλέον την ορμόνη (399).

Στους περισσότερους ασθενείς με τους μεταστατικούς καρκινοειδείς όγκους η θεραπεία με οκτρεοτίδη βελτιώνει τα κλινικά συμπτώματα ελέγχοντας τις διάρροιες και τα επεισόδια έξαψης, που προκαλούνται από την υπερπαραγωγή σεροτονίνης ή ταχυκινίνης. Επίσης με την θεραπεία με οκτρεοτίδη επιτυγχάνεται καλός έλεγχος της διάρροιας, της αφυδάτωσης και της υποκαλιαιμίας στους ασθενείς με τους όγκους που εκκρίνουν αγγειοκινητικό εντερικό πεπτίδιο, καθώς και του πεπτικού έλκους, των υπογλυκαιμικών επεισοδίων και των νεκρωτικών δερματικών βλαβών στους ασθενείς με όγκους που εκκρίνουν γαστρίνη, ινσουλίνη και γλυκαγόνη αντίστοιχα (285). Τα αποτελέσματα από τις μελέτες αυτές δείχνουν επίσης μια προσωρινή σταθεροποίηση της αύξησης των όγκων κατά τη διάρκεια της θεραπείας στο ένα με δύο τρίτα των ασθενών

με καρκινοειδές ή/και όγκους των νησιδιακών κυττάρων του παγκρέατος. Η παρατηρηθείσα παρατεταμένη επιβίωση στους ασθενείς με αυτούς τους όγκους (GEP) φαίνεται να οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην προσωρινή παρεμπόδιση της αύξησης των όγκων, αλλά και στη βελτίωση της ποιότητας της ζωής αυτών των ασθενών (354).

Η κλινική εμπειρία της θεραπείας ασθενών με μεταστάσεις από καρκίνους άλλων οργάνων με ανάλογο σωματοστατίνης είναι περιορισμένη αλλά και απογοητευτική. Υπάρχουν ελάχιστες μόνο τυχαιοποιημένες διπλές τυφλές μελέτες χρήσης αναλόγων SRIF για τη θεραπεία του καρκίνου, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή αξιολόγων συμπερασμάτων, ενώ κατά καιρούς δημοσιεύονται διάφορα case reports με συχνά αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η μεγαλύτερη τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη που έχει γίνει έως τώρα σύγκρινε την ταμοξιφαίνη μόνη ή σε συνδυασμό με οκτρεοτίδη σε 135 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο του μαστού (400) όπου και δεν διαπιστώθηκε ότι η θεραπεία συνδυασμού ήταν καλύτερη από την ταμοξιφαίνη από μόνη της.

Τα πράγματα διαφοροποιούνται στο ΗΚΚ όπου έχουν παρουσιαστεί περισσότερες μελέτες. Η πρώτη από αυτές έδειξε ότι η θεραπεία ασθενών με ΗΚΚ με οκτρεοτίδη βελτιώνει τα συμπτώματα και πιθανώς την επιβίωση (113). Μια άλλη τυχαιοποιημένη μελέτη αξιολόγησε την θεραπεία με συνδυασμό ταμοξιφένης με οκτρεοτίδης σε σχέση με τους κλασικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες 5-FU και Μιτομυκίνη σε προχωρημένο ΗΚΚ καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι το πρώτο σχήμα είχε σαν αποτέλεσμα παράταση του χρόνου επιβίωσης με λιγότερες παρενέργειες (118). Σε άλλη μελέτη σε ΗΚΚ χρησιμοποιήθηκε η λανρεοτίδη, που είναι ένα ανάλογο σωματοστατίνης με μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής από την οκτρεοτίδη αλλά συγκρίσιμη αποτελεσματικότητα με αυτήν στην θεραπεία της μεγαλακρίας όταν χορηγείται ενδομυϊκά δύο έως τρεις φορές τον μήνα. Από 21 ασθενείς με ανεγχείρητο ΗΚΚ που έλαβαν λανρεοτίδη ένας εμφάνισε αντικειμενική απάντηση στη θεραπεία, και 38% των ασθενών είχαν μικρές χρονικές περιόδους σταθεροποίησης της νόσου (114). Σε μια ακόμα μελέτη με λανρεοτίδη σε ΗΚΚ η ομάδα των ασθενών που έλαβε το ανάλογο της σωματοστατίνης παρουσίασε σημαντική διαφορά στο μέσο χρόνο επιβίωσης (31 έναντι 16 εβδομάδων) και βελτίωση της ποιότητας ζωής (60% έναντι 23%) (115).

Επίσης σημαντική έρευνα είναι υπό εξέλιξη για την εφαρμογή των ανάλογων σωματοστατίνης που έχουν σημειωθεί με κατάλληλες ραδιενεργές ουσίες (παραδείγματος χάριν Ύτριο<sup>90</sup>) στη θεραπεία του καρκίνου (401;402). Μια ακόμα προσέγγιση είναι η στοχοθέτηση χημειοθεραπευτικών παραγόντων μέσω της σύνδεσής τους με ανάλογα σωματοστατίνης, ώστε να προσεγγίζουν με μεγαλύτερη ακρίβια (χρησιμοποιώντας τους υποδοχείς ssts και κατά συνέπεια με μικρότερες και λιγότερο τοξικές δόσεις) ορισμένους καρκίνους (401;402).

### 3.2.3. Διαγνωστικές Εφαρμογές

Η παρουσία ssts επιτρέπει τον εντοπισμό μερικών όγκων και των μεταστάσεών τους χρησιμοποιώντας τεχνικές ανίχνευσης με ραδιενεργά σημασμένα σωματοστατινεργικά πεπτίδια (403). Τα ραδιενεργά ανάλογα της σωματοστατίνης, όπως η Octreotide<sup>111</sup> (OctreoScan) είναι κατάλληλα για τέτοιες κλινικές εφαρμογές. Νευροενδοκρινικοί όγκοι που θα μπορούσαν να εντοπιστούν με OctreoScan είναι τα καρκινοειδή και το μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα. Μη-νευροενδοκρινικοί όγκοι που θα μπορούσαν να εντοπιστούν με τεχνικές σπινθηρογραφήματος είναι ο καρκίνος του μαστού, του νεφρού, το λέμφωμα Hodgkin, οι όγκοι του εγκεφάλου (συμπεριλαμβανομένων των αστροκυτωμάτων) και τα μη μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα, όπως τα επιθηλιοειδή (403;404).

## C. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ

### 1. Τα οπιοειδή

Τα οπιοειδή είναι μια ομάδα εξωγενών και ενδογενών ουσιών που λειτουργούν μέσω της ενεργοποίησης ενός ή περισσότερων από τους υποδοχείς των οπιοειδών. Η πρώτη επαφή του ανθρώπου με τα εξωγενή οπιοειδή ξεκινάει από την αρχαιότητα και υπάρχουν πάρα πολλές ιστορικές αναφορές για την χρήση τους ως μέσο για την πρόκληση έκστασης ή θανάτου καθώς και για την φαρμακευτική χρήση τους από την ιατρική της αρχαιότητας (405). Το όπιο, το οποίο είναι και η πρώτη οπιούχα ουσία που χρησιμοποιήθηκε, είναι ένα ακατέργαστο προϊόν από την κάψα του σπόρου της παπαρούνας *papaver somniferum* (μόκων η υπνοφόρος), το οποίο περιέχει τις οπιοειδείς αλκαλοειδείς ενώσεις μορφίνη και κωδεΐνη. Η ηρωίνη, η συνηθέστερα παράνομα χρησιμοποιούμενη οπιούχος ουσία στις μέρες μας, είναι ένα ημισυνθετικό ανάλογο της μορφίνης.

#### 1.1. Ενδογενή οπιοειδή

Έως σήμερα έχει αναγνωριστεί ένας μεγάλος αριθμός ενδογενών οπιοειδών πεπτιδίων τα οποία δρουν ως νευροδιαβιβαστές, νευρο-ορμόνες ή κλασικές ορμόνες ανάλογα με την περιοχή όπου παράγονται και εκκρίνονται καθώς και από τα κύτταρα στόχους. Χωρίζονται σε τρεις οικογένειες τις εγκεφαλίνες, τις ενδορφίνες και τις δυνορφίνες (406). Τα ενδογενή οπιοειδή προέρχονται από τρεις διαφορετικές πρόδρομες πρωτεΐνες την προεγκεφαλίνη A (407) και B (προδυνορφίνη) (408) και την προοπιομελανοκορτίνη (proopiomelanocortin, POMC) (409). Από αυτές τις τρεις πρωτεΐνες προκύπτει μια σειρά από οπιοειδή πεπτίδια με διαφορετικές συγγένειες προς τους υποδοχείς των οπιοειδών. Από την προεγκεφαλίνη A προκύπτουν τέσσερις μεθειονίνες-εγκεφαλίνες, μια λευκίνη-εγκεφαλίνη, η μεθειονίνη-εγκεφαλίνη-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> και η μεθειονίνη-εγκεφαλίνη-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>. Από την προδυνορφίνη προκύπτουν διάφορα πεπτίδια που περιλαμβάνουν την αλληλουχία της λευκίνης-εγκεφαλίνης όπως η δυνορφίνη A, η δυνορφίνη B, η α-νεοενδορφίνη και η β-νεοενδορφίνη. Η



προόπιομελανοκορτίνη είναι η πρόδρομος πρωτεΐνη για την κορτικοτροπίνη και την α-μελανοτροπίνη καθώς και για το ενδογενές οπιοειδές β-ενδορφίνη, που περιλαμβάνει την αλληλουχία της μεθειονίνης-εγκεφαλίνης. Συνολικά από τις τρεις πρόδρομες πρωτεΐνες προκύπτουν περισσότερα από 20 πιθανά πεπτίδια με οπιοειδή δράση (410). Τα ενδογενή οπιοειδή εκφράζονται και παράγονται όχι μόνο σε κύτταρα του νευρικού συστήματος αλλά και σε πολλά άλλα όργανα και συστήματα που συμπεριλαμβάνουν το γεννητικό (411-413), το ανοσοποιητικό (414-416) το ερειστικό σύστημα (417), το δέρμα (418) και τα επινεφρίδια (419).

Τα ενδογενή οπιοειδή συμμετέχουν σε ένα μεγάλο αριθμό λειτουργιών. Παίζουν πρωταρχικό ρόλο στη ρύθμιση του πόνου (420-423), στη ρύθμιση της έκκρισης ορμονών και νευροπεπτιδίων (424-427), στον έλεγχο της καρδιακής λειτουργίας και της πίεσης του αίματος (428-431), στη ρύθμιση της αναπνευστικής λειτουργίας (432-434) και της σεξουαλικής συμπεριφοράς (435), στη θερμορύθμιση του οργανισμού (436), ενώ πολυάριθμες δημοσιεύσεις τα τελευταία χρόνια συσχετίζουν το σύστημα των ενδογενών οπιοειδών με την ρύθμιση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος (437-439). Η λίστα με τις επιδράσεις των οπιοειδών σε διάφορες λειτουργίες διευρύνεται συνεχώς (436). Επίσης τα ενδογενή πεπτίδια έχει αναφερθεί ότι ασκούν ανασταλτική δράση σε διάφορα καρκινικά κύτταρα (440-443). Επιπλέον, διάφορα πεπτίδια, που έχουν αναγνωριστεί τα τελευταία χρόνια, κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα όπως η ορφανίνη (nociceptin/orphanin FQ) καθώς και έναν πιθανός νέος υποδοχέας οπιοειδών, που ονομάζεται ORL-1 (opioid receptor related protein 1 (ORL-1)(444) ανοίγουν νέους δρόμους στην έρευνα των οπιοειδών.

## 1.2. Εξωγενή οπιοειδή

Τα φυσικά εξωγενή οπιοειδή είναι γνωστά στον άνθρωπο εδώ και πάρα πολλά χρόνια. Σήμερα όμως διαθέτουμε πολύ πιο καθαρές μορφές των φυσικών οπιοειδών καθώς και πολυάριθμους τεχνητούς οπιοειδείς αγωνιστές με ξεχωριστές φαρμακολογικές ιδιότητες (Πίνακας opioid ligands) (436). Επίσης υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν πως η *in vitro* πρωτεόλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος οδηγεί στην δημιουργία οπιοειδών πεπτιδίων (καζομορφίνες) (445;446). Έχει εκόμα περιγραφεί ένα νέο πεπτίδιο, η

ρεσεπτορφίνη (receptorphin, Tyr-Ile-Phe-Asn-Leu) , που προέρχεται από την ακολουθία του δεύτερου διαμεμβρανικού τμηματός του υποδοχέα των οπιοειδών, ακολουθία μοναδική για αυτόν τον υποδοχέα και συντηρημένη σε όλα τα ζωικά είδη και τους υποτύπους του. Η ρεσεπτορφίνη δεσμεύεται σε όλους τους υποδοχείς οπιοειδών, ενώ επίσης δεσμεύεται και στους υποδοχείς σωματοστατίνης και εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων διάφορων ανθρώπινων κυτταρικών σειρών καρκίνου (447).

Μερικοί από αυτούς τους οπιοειδείς αγωνιστές θα περιγραφούν περαιτέρω στο κεφάλαιο των υποδοχέων των οπιοειδών.

## 2. Υποδοχείς οπιοειδών

Η παρουσία τόσο μεγάλου αριθμού ενδογενών οπιοειδών πεπτιδίων, οδηγούσε στο συμπέρασμα πως θα υπήρχαν περισσότεροι του ενός υποδοχείς οπιοειδών. Ο αρχικός χαρακτηρισμός των υποδοχέων βασίστηκε στις φαρμακολογικές τους ιδιότητες και στην ικανότητά τους να δεσμεύουν συγκεκριμένους οπιοειδείς αγωνιστές με διαφορετική συγγένεια. Τα πρώτα δεδομένα για το ενδεχόμενο ύπαρξης πολλαπλών υποδοχέων οπιοειδών, προήλθαν από τους Martin και συν. Εκτελώντας πειράματα με τα οποία αναζητούσαν διασταυρούμενη ανοχή (δηλ. ικανότητα ενός φαρμάκου να προλαμβάνει τα συμπτώματα στέρησης ενός άλλου φαρμάκου που του είχε χορηγηθεί νωρίτερα μέχρι εθισμού) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν τρεις τύποι υποδοχέων που ονομάστηκαν με τα αρχικά των φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις μελέτες: μ (μορφίνη), κ (κετοκυκλαζολίνη) και σ (SKF 10,047). Ο υποδοχέας σ θεωρείται σήμερα πως δεν είναι υποδοχέας οπιοειδών (448). Την επόμενη χρονιά αναγνωρίστηκε φαρμακολογικά και ο υποδοχέας δ από τους Kosterlitz και συν. (449). Φαρμακολογικά δεδομένα επέτρεψαν την περαιτέρω υποδιαίρεση των δέλτα υποδοχέων στους δ-1 και δ-2, των μι υποδοχέων σε μ-1 και μ-2 και των κάππα υποδοχέων σε κ-1, κ-2 και κ-3 .

Στον άνθρωπο έχει περιγραφεί η κλωνοποίηση των υποδοχέων δ-, κ-, και μ- (450-453). Επίσης έχουν περιγραφεί και παραλλαγές στην μεταμεταγραφική κατεργασία του mRNA του υποδοχέα μ (454). Τα γονίδια των οπιοειδών υποδοχέων μ-, δ-, και κ-

βρίσκονται στα χρωμοσώματα 6q24-25 (450), 1p34.3-36.1 (455) και 8q11.2 (456), αντίστοιχα.

Σήμερα πλέον γνωρίζουμε πως οι υποδοχείς οπιοειδών είναι μέλη της οικογένειας των συνδεδεμένων με ανασταλτικές G πρωτεΐνες υποδοχέων με επτά διαμεμβρανικά τμήματα (Gi (inhibitory) protein-coupled seven transmembrane receptor (GPCR) superfamily) (405). Γενικά, οι αλληλουχίες των αμινοξέων αυτών των υποδοχέων εμφανίζουν περίπου 60% ομολογία. Μεγαλύτερη ταύτιση παρατηρείται στις διαμεμβρανικές (73-76%) και τις ενδοκυτταρικές περιοχές (63-66%). Αντιθέτως, οι εξωκυττάρια περιοχές εμφανίζουν σημαντικές διαφορές (34-40% ομολογία). Μεταξύ των άλλων υποδοχέων της οικογένειας GPCR, οι υποδοχείς σωματοστατίνης εμφανίζουν την μεγαλύτερη ομολογία με τους υποδοχείς οπιοειδών (34-42% στην αλληλουχία των αμινοξέων).

## 2.1. Οι μ-υποδοχείς οπιοειδών

Ο κλωνοποιημένος υποδοχέας μ έχει την υψηλή συγγένεια για την μορφίνη τη ναλοξόνη και το DADLE (Πίνακας 8). Επιπλέον, στον υποδοχέα αυτό δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια ο εκλεκτικός μ-αγωνιστής DAMGO (457), αλλά όχι ο δ-ειδικός αγωνιστής DPDPE (458) ή οι κ-ειδικοί αγωνιστές U50,488 (459) και U69,593 (460), γεγονός που επιβεβαιώνει ότι ο κλωνοποιημένος υποδοχέας είναι ο μ. Φαρμακολογικές μελέτες έχουν προτείνει την ύπαρξη πολλαπλών υποδοχέων μ που ονομάζονται  $\mu_1$  και  $\mu_2$  (461). Οι  $\mu_1$  υποδοχείς χαρακτηρίζονται από υψηλή συγγένεια για την ναλοξόνη (μη αντιστρέψιμη πρόσδεση), την μορφίνη και το DADLE ( $K_n = 0,1-2$  nM), και σχετίζονται με την αναλγησία σε επίπεδο εγκεφάλου, την απελευθέρωση προλακτίνης, τη ανακύκλωση της ακετυλοχολίνης και την επαγωγή κόματος (461;462). Οι  $\mu_2$  υποδοχείς χαρακτηρίζονται από χαμηλότερη συγγένεια για τη μορφίνη και το DADLE ( $K_D = 5-50$  nM) και υψηλότερη συγγένεια για την ναλοξοναζίνη, ενώ σχετίζονται με την καταστολή της αναπνευστικής λειτουργίας, την ανακύκλωση της ντοπαμίνης και την μειωμένη κινητικότητα του γαστρεντερικού συστήματος από τα οπιοειδή. Οι Thompson και συν (463) θεώρησαν αρχικά ότι ο κλωνοποιημένος υποδοχέας μ αντιστοιχούσε στην υποκατηγορία  $\mu_2$  βάσει της σχετικά χαμηλής συγγένειας για τη μορφίνη και το DADLE

( $K_i = 6-8 \text{ nM}$ ). Εντούτοις, άλλη ερευνητική ομάδα βρήκε υψηλή συγγένεια της ναλοξοναζίνης για ίδιο κλωνοποιημένο  $\mu$ -υποδοχέα και πρότεινε ότι ο κλωνοποιημένος  $\mu$ -υποδοχέας αντιστοιχεί στην υποκατηγορία  $\mu_1$  (453). Τελικά, μελέτες υβριδισμού αποκάλυψαν ότι mRNA του κλωνοποιημένου υποδοχέα  $\mu$  εκφράζεται όχι μόνο στις περιοχές εγκεφάλου που υποτίθεται ότι σχετίζονται με την αναλγησία σε επίπεδο εγκεφάλου, αλλά και σε περιοχές που σχετίζονται με τα αποτελέσματα που προκύπτουν μέσω της μεσολάβησης του υποδοχέα  $\mu_2$ , όπως η αναπνευστική καταστολή. Αυτό το εύρημα δείχνει πως η διαφορά μεταξύ των  $\mu_1$  και των  $\mu_2$  υποδοχέων οφείλεται σε μεταμεταγραφική επεξεργασία του mRNA του γονιδίου που οδηγεί σε διαφορετικά προϊόντα (454).

**Πίνακας 8.** Σταθερές διάστασης διαφόρων οπιοειδών αγωνιστών και ανταγωνιστών για τους υποδοχείς  $\mu$  όπως μελετήθηκαν με διάφορους ραδιενεργά σημασμένους αγωνιστές (από <http://www.gpcr.org>).

Ραδιενεργός αγωνιστής	[*H]CARFENTANIL K, nM	[*H]DAGO K, nM	[*H]NALOXONE K, nM	[*H]DERMORPHIN K, nM	[*H]SUFENTANIL K, nM	[*H]OHMEFENTANYL K, nM	[*H]DIPRENORPHINE K, nM
Σταθερά διάστασης ραδιενεργού αγωνιστή	Kd=0.08	Kd=1,6-6,7	Kd=0,98-5,2	Kd=0.86	Kd=0,13-0,5	Kd=1.68	Kd=0,1-0,23
$\beta$ -Casomorphin							
Codeine(-)			20000				
Cyclazocine			<b>0,2-2,5</b>				<b>0,3</b>
Cyclazocine(±)			<b>0.45</b>				
Cyclazocine(-)			<b>10</b>				
DADLE	13		150		340		500
<b>DAGO</b>	<b>4.7</b>	<b>1.1-10</b>				<b>23.5</b>	<b>11</b>
Deltorphin		1600					
[D-Ala-2]Deltorphin I		3150					
[D-Ala-2]Deltorphin II		2450					
Dermenkephalin		370		620			
(L-Met-2)Derm- enkephalin		3350		3370			
<b>Dermorphin</b>		<b>0.7</b>		<b>0.73</b>			
Dextrophan			8000				
Dezocine							
<b>Dihydromorphine</b>			<b>0.9</b>				<b>1.4</b>
<b>Diprenorphine</b>			<b>0.2</b>				<b>0.1-0,6</b>
DPDPE		6,6-2000		600	7720		
<b>DPLPE</b>		<b>6.8</b>					
DSLET					120		400
Dynorphin							
<b>Dynorphin A-(1-17)</b>		<b>1.6</b>					
<b>Dynorphin-(1-11)</b>		<b>2.7</b>					
<b>Dynorphin-(1-13)</b>			<b>31</b>				
<b>[D-Pro-10]dynorphin -(1-11)</b>		<b>2</b>					
EKC	2.8		220-330			312	10-16
EKC(+)			2500				
EKC(-)			<b>2.3</b>				
<b>alpha-Endorphin</b>			<b>21</b>				<b>11</b>
<b><math>\beta</math>-Endorphin</b>			<b>0.8</b>				<b>0.4</b>
<b>D-Ala-2-enkephalin</b>			<b>5.3</b>				<b>2.8</b>
<b>[D-Ala-2, Met-5] Enkephalin</b>			<b>C=6</b>				
Leu-enkephalin			7,4-25		>600		835
Met-enkephalin			3-10		>600		2,4-835
Ketocyclazocine							60
Methadone			750		2,2		
<b>Methadone(-)</b>			<b>C=30</b>				
Methadone(+)			C=300				
Morphiceptin	130						>20000
<b>Morphine</b>	<b>1.4</b>		<b>0,5-420</b>		<b>5,7-31</b>		<b>4,5-100</b>
<b>Morphine(-)</b>			<b>C=7</b>				
<b>Naloxone</b>	<b>2.4</b>		<b>0,5-11</b>		<b>3,1-11</b>		<b>0.8-8,5</b>
<b>Naltrexone</b>			<b>0.77</b>				
Pethidine					190		
SKF 10,047(+)	5100		1900				
<b>SKF 10,047(-)</b>	<b>1.7</b>		<b>3</b>				
U-50488H		6,7-530	830-14000		7230	C>10000	1400
U69,593	1600				38000		

## 2.2. Οι δ-υποδοχείς οπιοειδών

Ο κλωνοποιημένος υποδοχέας δέλτα έχει ο υψηλή συγγένεια για το DADLE και τον εκλεκτικό δ-αγωνιστή DPDPE, αλλά όχι για το μ-εκλεκτικό DAMGO ή τα κ-εκλεκτικά U50,488 και U69,593, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι ο κλωνοποιημένος δέκτης είναι ο δέλτα. Η ύπαρξη πολλαπλών υποδοχέων δ έχει προταθεί από μελέτες συμπεριφοράς και πρόσδεσης ειδικών αγωνιστών (464). Τα DPDPE, DADLE, DALCE και BNTX δεσμεύονται σε 81 περιοχές με υψηλή συγγένεια, ενώ τα DSLET και NTB δεσμεύονται σε 62 άλλες περιοχές με υψηλή συγγένεια. Παρόλο που δεν είναι ξεκάθαρο αν ο κλωνοποιημένος δέλτα υποδοχέας είναι  $\delta_1$  ή  $\delta_2$ , λόγω της έλλειψης αρκετά ειδικών αγωνιστών, η υψηλότερη συγγένειά για τους  $\delta_2$  απ'ό,τι για τους  $\delta_1$  αγωνιστές δείχνει ότι πρέπει να είναι στην πραγματικότητα ο υποδοχέας  $\delta_2$ . Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από το εύρημα ότι ολιγονουκλεοτίδια αντίστροφου μηνύματος έναντι του κλωνοποιημένου δ-υποδοχέα καταστέλλουν τα αναλγητικά αποτελέσματα των  $\delta_2$  αγωνιστών αλλά όχι εκείνα των  $\delta_1$  αγωνιστών (465). (Πίνακας 9)

**Πίνακας 9.** Σταθερές διάστασης διαφόρων οπιοειδών αγωνιστών και ανταγωνιστών για τους υποδοχείς δέλτα όπως μελετήθηκαν με διάφορους ραδιενεργά σημασμένους αγωνιστές (από <http://www.gpcr.org>).

Ραδιενεργός αγωνιστής	[*H]DELTORPHIN-ALA K, nM	[*H]DADLE K, nM	[*H]DPDPE K, nM	[*H]LOFENTANIL K, nM	[*H]DSLET K, nM	[*H]MET- ENKEPHALIN K, nM
Σταθερά διάστασης ραδιενεργού αγωνιστή	Kd=0.104	Kd=0,59-2.4	Kd=1.61	Kd=0.29	Kd=1.24	
<b>Cyclazocine (±)</b>		<b>6.3</b>				<b>0.6</b>
DADLE		0.63	1.35			
DAGO	820		64.7-407			
Deltorphin	2.41					
<b>[D-Ala-2]Deltorphin I</b>			<b>0.15</b>			
<b>[D-Ala-2]Deltorphin II</b>			<b>0.71</b>			
<b>Dermkephalin</b>			<b>3.15</b>			
(L-Met-2)Derm- enkephalin			>5000			
Dermorphin			61.7			
Dihydromorphine						26
Diprenorphine			1			<b>0.9</b>
DPDPE	<b>8.87</b>		<b>0.95-6.44</b>			
DPLPE			<b>0.56</b>			
DSLET			<b>1.05</b>			
Dynorphin		<b>0.74</b>				
Dynorphin-(1-9)		<b>39</b>				
Dynorphin-(1-11)					<b>10.66</b>	
Dynorphin-(1-13)		<b>12</b>				
Dynorphin A-(1-17)					<b>6.3</b>	
[D-Pro-10]dynorphin -(1-11)					<b>7.47</b>	
EKC		<b>7.6</b>				
EKC(+)		>10000				
EKC(-)		<b>5.2</b>	<b>6.62</b>			
alpha-endorphin						<b>18</b>
β-endorphin						<b>1.8</b>
D-Ala-2-enkephalin						<b>4.7</b>
Leu-5-enkephalin						<b>6.2</b>
Met-5-enkephalin						<b>2</b>
Etorphine			<b>1.13</b>	<b>0.59</b>		<b>0.4</b>
Fentanyl						<b>33</b>
Met-enkephalin				528		
Morphine		<b>510</b>	<b>161-2602</b>	<b>33.4</b>		<b>29</b>
Naloxone		<b>16</b>	<b>14.3-22.8</b>	<b>11.9</b>		<b>6.6</b>
SKF 10,047(+)		19000				
SKF 10,047(-)		15				
U50,488		21000	7800-13100	>750	2445	
U69593			13400			

### 2.3. Οι κ-υποδοχείς οπιοειδών

Ο κλωνοποιημένος υποδοχέας κ έχει υψηλή συγγένεια για την δυνορφίνη A, που είναι ένας ενδογενής αγωνιστής των κ-υποδοχέων (466), καθώς και για τους κ-ειδικούς αγωνιστές U50,488 και U69,593, αλλά όχι τον μ-ειδικό αγωνιστή DAMGO ή το δ-ειδικό αγωνιστή DPDPE, γεγονός που επιβεβαιώνει πως ο κλωνοποιημένος υποδοχέας είναι ένας κάππα υποδοχέας. Οι κ-υποδοχείς οπιοειδών έχουν ταξινομηθεί στις υποκατηγορίες κ<sub>1</sub>, κ<sub>2</sub> και κ<sub>3</sub> (467;468). Το κύριο ενδογενές οπιοειδές που προσδέεται με τους κ<sub>1</sub> είναι η δυνορφίνη A, ενώ στους κ<sub>2</sub> και κ<sub>3</sub> συνδέονται με μεγάλη συγγένεια η β-ενδορφίνη και η μεθειονίνη-εγκεφαλίνη-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> (468;469). Αν και οι περισσότεροι κ-αγωνιστές συμπεριλαμβανομένων της δυνορφίνης A, του U50,488, της αιθυλκετοκυκλαζολίνης και της βρεμαζοσίνης δεσμεύονται στις υποκατηγορίες κ<sub>1</sub> και κ<sub>2</sub>, το U69,593 δεσμεύεται επιλεκτικά στη κ<sub>1</sub> υποκατηγορία με υψηλή συγγένεια (470). Αντιθέτως, δεν υπάρχει κανένας τόσο εκλεκτικός αγωνιστής για τις υποκατηγορίες κ<sub>2</sub> και κ<sub>3</sub>. Η υποκατηγορία κ<sub>3</sub> έχει την υψηλή συγγένεια για το οπιοειδές zoylhydrazone naloxoneben αλλά αμελητέα συγγένεια για το U50,488 (471). Δεδομένου ότι ο κλωνοποιημένος κ-υποδοχέας δεσμεύει με υψηλή συγγένεια το U69,593 καθώς επίσης και την δυνορφίνη A, το U50,488, την αιθυλκετοκυκλαζολίνη και την βρεμαζοσίνη, αντιστοιχεί στη υποκατηγορία κ<sub>1</sub> (465). (Πίνακας 10)



**Πίνακας 10.** Σταθερές διάστασης διαφόρων οπιοειδών αγωνιστών και ανταγωνιστών για τους υποδοχείς κάππα όπως μελετήθηκαν με διάφορους ραδιενεργά σημασμένους αγωνιστές (από <http://www.gpcr.org>).

Ραδιενεργός αγωνιστής	[*H](-)EKC K, nM	[*H]U69593 K, nM	[*H]BREMAZOCINE K, nM	[*H] ETORPHINE K, nM	[*H]CI-997 K, nM	[*H]DYNORPHIN A(1-8) K, nM
Σταθερά διάστασης ραδιενεργού αγωνιστή	Kd=0,62-1,2	Kd=0,86-3,94	Kd=0,06-0,98	Kd=0,17-0,97		Kd=5,1
<b>Cyclazocine</b>	<b>5.9</b>	<b>1.1</b>	<b>1.5</b>	<b>0.3</b>		
DADLE	180->10000	1900		>1000		
DAGO	>20000		1000			
Dermenkephalin	>25000					
(L-Met-2)Derm- enkephalin	>25000					
Dermorphin	>10000					
<b>Dihydromorphine</b>				<b>2.5</b>		
<b>Diprenorphine</b>				<b>0.2</b>		
DPDPE	>20000	>30000	12000	>10000	>30000	
DPLPE			>23000			
<b>Dynorphin</b>	<b>0.12</b>					
Dynorphin-(1-9)	185					
<b>Dynorphin-(1-13)</b>	<b>0.98</b>					
<b>Dynorphin-(1-11)</b>			<b>0.125</b>			
<b>Dynorphin A</b>						<b>3.6</b>
<b>Dynorphin A-(1-3)</b>						<b>2.8</b>
<b>Dynorphin A-(1-8)</b>						<b>3.1</b>
<b>Dynorphin A-(1-13)</b>		<b>2.2</b>	<b>33</b>			
<b>Dynorphin A-(1-17)</b>			<b>0.23</b>			
Dynorphin B						7.3
<b>[D-Pro-10]dynorphin -(1-11)</b>			<b>0.032</b>			
EKC	<b>1,2-1,98</b>	<b>1.1</b>	<b>2,6-28,6</b>	<b>0.6</b>		<b>0.63</b>
EKC(+)	1600					
EKC(-)	2,2					
<b>alpha-Endorphin</b>				<b>23</b>		
<b>β-Endorphin</b>		<b>130</b>	<b>3.8</b>	<b>0.4</b>		<b>&gt;1000</b>
D-Ala-enkephalin				1.2		
[Leu-5]-enkephalin				<b>9.4</b>		<b>567</b>
[Met-5]-enkephalin				<b>2.9</b>		<b>456</b>
<b>Etorphine</b>		<b>0.46</b>	<b>0.28</b>	<b>0.1-3</b>		
D(-) Methadone				300		
Morphine	1900	52-190	21	8.9-200		121
<b>Naloxone</b>	<b>1,2-3,5</b>	<b>2,37-91</b>	<b>4,45-6,3</b>	<b>2,5-30</b>	<b>4,48</b>	<b>3,4</b>
<b>Naltrexone</b>		<b>0.47</b>	<b>0.83</b>			
alpha-Neo-endorphin						28.6
Normorphine	C=59			13		
Oxymorphine	725			3.1		
SKF 10047(+)	1600	2050				
SKF 10047(-)	<b>4.7</b>	<b>4.1</b>	<b>4.5</b>			
U50,488			<b>0.74</b>			
U-50488(-)		<b>4.2</b>	<b>1450</b>			
U-50,488H	<b>15</b>		<b>7</b>			
UJ-50488H						<b>51.6</b>
U-62066		<b>1.4</b>	<b>160</b>			
U69593	<b>4.39</b>	<b>0,57-5.4</b>	<b>1,32-3500</b>		<b>0.67</b>	

Όπως προαναφέρθηκε οι υποδοχείς οπιοειδών, όπως και οι υποδοχείς σωματοστατίνης συνδέονται με G-πρωτεΐνες και ενεργοποιούν διάφορα συστήματα δεύτερου αγγελιοφόρου. Συστήματα δεύτερου αγγελιοφόρου που επηρεάζονται από την ενεργοποίηση των υποδοχέων οπιοειδών είναι: (1) η αδενυλική κυκλάση (472), (2) τα κανάλια ασβεστίου (473;474), (3) κανάλια Καλίου (474;475), (4) η φωσφολιπάση C (472) (5) οι κινάσες της 3-φωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K/Akt) Schonbrunn 1999 και (5) οι MAP κινάσες (MAPK/ERK) (476). Επίσης η μορφίνη βρέθηκε ότι επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης Fas, ενός επιφανειακού υποδοχέα που προκαλεί θάνατο του κυττάρου μέσω απόπτωσης από ενεργοποίηση των κασπασών, όταν συνδεθεί με τον αγωνιστή του FasL (477). Βρέθηκε επίσης ότι προάγει την απόπτωση μέσω διαταραχής της ισορροπίας της έκφρασης των πρωτεϊνών Bax και Bcl-2 (478;479). Έχει επίσης περιγραφεί επαγωγή της παραγωγής του μονοξειδίου του αζώτου (NO) που προάγει στη συνέχεια την απόπτωση μέσω της συσσώρευσης p53 (480), ενώ σε άλλα συστήματα, τα οπιοειδή ανασταλούν κατά τρόπο άμεσο τη δραστηριότητα των συνθασών του NO (481).

Αξίζει τέλος να αναφερθεί πως όπως και με τους υποδοχείς σωματοστατίνης, η συνεχής ενεργοποίηση των υποδοχέων οπιοειδών οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση και τον εντοπισμό των υποδοχέων με αποτέλεσμα μείωση της αποδοτικότητας της ενεργοποίησης των G πρωτεϊνών, ένα φαινόμενο που ονομάζεται απευαισθητοποίηση (482).

### **3. Σχέση οπιοειδών με τον καρκίνο**

Οπιοειδή και υποδοχείς οπιοειδών έχουν βρεθεί σε ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπινων όγκων καθώς και σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Μια μεγάλη σειρά από μελέτες έχει δείξει ότι τα οπιοειδή έχουν σημαντική αντιπολλαπλασιαστική δράση σε κύτταρα καρκινικών κυτταρικών σειρών. Τα αλκαλοειδή οπιοειδή, τα ενδογενή οπιοειδή αλλά και τα προερχόμενα από τρόφιμα πεπτίδια οπιοειδή αναστέλλουν με δόσοεξαρτώμενο και αναστρέψιμο τρόπο τον πολλαπλασιασμό κυτταρικών σειρών από καρκίνο μαστού (483-485), προστάτη (445), νεφρού (342), πνεύμονα (486;487) και εγκεφάλου (488). Επίσης μετά από τεχνητή μεταφορά κυττάρων μελανώματος σε

τροκτικά, η επίδραση με οπιοειδή είχε σαν αποτέλεσμα την καταστολή της αύξησης των όγκων καθώς και της ανάπτυξης μεταστάσεων (489;490). Το ενδογενές οπιοειδές μεθειονίνη-εγκεφαλίνη έχει βρεθεί ότι μειώνει την ανάπτυξη καρκινωμάτων εκ πλακωδών κυττάρων της κεφαλής και του λαιμού (491), νευροβλαστώματος (492), νεφρού (493), ινοσαρκώματος (494), παγκρέατος και παχέως εντέρου (440). Ωστόσο οι επιδράσεις αυτές έχει αναφερθεί ότι οφείλονται σε επίδραση του πεπτιδίου με ένα νέο υποδοχέα ο οποίος ονομάστηκε υποδοχέας του οπιοειδούς αυξητικού παράγοντα (Opioid Growth Factor Receptor, OGFR) και ο οποίος δεσμεύει επιλεκτικά την μεθειονίνη-εγκεφαλίνη και όχι άλλα οπιοειδή πεπτίδια ή ανάλογα σωματοστατίνης (495).

Σε αντίθεση με την ανασταλτική επίδραση των οπιοειδών στις παραπάνω αναφορές, υπάρχουν μελέτες που αφορούν κυρίως κύτταρα του ανοσοποιητικού και νευρικού συστήματος στις οποίες έχει βρεθεί επαγωγή του πολλαπλασιασμού από τα οπιοειδή (488;496-498). Φαίνεται ότι η επίδραση των οπιοειδών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι εξαρτώμενη τόσο από τον τύπο του ιστού αλλά και από τον τύπο των υποδοχέων οπιοειδών που φέρει το καρκινικό κύτταρο.

Από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω είναι φανερό ότι τα οπιοειδή, τόσο ενδογενή όσο και εξωγενή, εμπλέκονται σε διάφορα φαινόμενα που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων αλλά ο ρόλος τους δεν έχει μελετηθεί πλήρως. Επιπλέον ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν σχετικά με την επίδραση των οπιοειδών στον πολλαπλασιασμό κυττάρων από καρκίνο του ήπατος και αφορούν κυρίως μελέτες τοξικότητας εξωγενών οπιοειδών (499).

#### **4. Σχέση υποδοχέων οπιοειδών με τους υποδοχείς σωματοστατίνης**

Από όσα αναφέρθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια φαίνεται ότι τα συστήματα των οπιοειδών και της σωματοστατίνης επιδρούν σε παρόμοιες φυσιολογικές λειτουργίες. Είναι επίσης γεγονός πως οι υποδοχείς σωματοστατίνης και οπιοειδών έχουν παρόμοια δομή και έχει προταθεί πως προήλθαν από το ίδιο αρχέγονο γονίδιο (Πίνακας 11.) (246;500).

### Πίνακας 11. Σύγκριση των αλληλουχιών των υποδοχέων σωματοστατίνης και οπιοειδών

.	1	80
sst <sub>1</sub>	MFPNGTASSPSSSPSPSPGSCGEGGSRGPGAGAADGMEEPRNASQNGTLESGQGSAILISFIYSVVCLVGLCGNSMVI	
sst <sub>4</sub>	-----MSAPSTLPPGGEEGLGTAWPSAANASSAPAEAEAVAGPGDARAAG - MVAIQCIYALVCLVGLVGNALVI	
sst <sub>2</sub>	-----HTWLSIPFDLNGSVVSTNTSNQTEPYDLTNAVLTFPIYFVVCIIGLGGNTLVI	
sst <sub>5</sub>	-----MEPLFPASTPSWNASS-----PGA-ASGG-----GDNRTLVPAPSAGARAVLVPLVLLVCAAGLGGNTLVI	
sst <sub>3</sub>	-----SEPENASSAWPPDATLGNVSAAGSPAGLAVSGVLIPLVYLVVVCVGLLGNLVI	
MOR	SNCTDALAYSSCS PAPS Pgs1 SHLDGNLSDPCGP - NRTDLGGRDLSLCPPTGSPSMITAITMALYSIVCVVGLFGNFLVM	
DOR	MEPAPSAGAELOPPLFANAS - DAYPSAFPSAGaaSG - PPGARSASSLAL-----AIAITALYSAVCAVGLLGNVLVM	
KOR	MESP IQIFRGEFGPTCAPSACLPPNSSAwpgWAEPDSNGSAGSEDAQLEPAHISPAPV IITAVYSVVVFGVGLVGNLVM	
.	81	160
sst <sub>1</sub>	YVILRYAKMKTATNIYILNLAIADLMLSLVVPFLVTSTLLRHWPFGALLCRLVLSVDVAVNMFTSIYCLTVLSDVRYAVV	
sst <sub>4</sub>	FVILRYAKMKTATNIYILNLAVADELFMLSVFPVASSAALRHWPFGSVLCRAVLSVDGLNMFTSVFCLTVLSDVRYAVV	
sst <sub>2</sub>	YVILRYAKMKTITNIYILNLAIADLMLGLPFLAMQVALVHWPFGKAI CRVVMVTVDGINQFTSIFCLTVMSIDRYLAVV	
sst <sub>5</sub>	YVILRFAMKKTVTNIYILNLAVADVLYMLGLPFLATQNAASFVFPVLCRLVMTLDGVNQFTSVFCLTVMSVDRYLAVV	
sst <sub>3</sub>	YVILRHTASPSVTNIYILNLALADELFMLGLPFLAAQNALSYWPFGLMCRVMAVDGINQFTSIFCLTVMSVDRYLAVV	
MOR	YVIVRYTKMKTATNIYIFNLALADALATSTLPPQSVNYLMGTWPFGTILCKIVISIDYNNMFTSIFTLCTMSVDRYIACV	
DOR	FGIVRYTKMKTATNIYIFNLALADALATSTLPPQSAKYLMEWPFGBELCKAVLSIDYNNMFTSIFTLTMSVDRYIACV	
KOR	FVIRYTKMKTATNIYIFNLALADALVTTMFPQSTVYLMNSWPFGBVLCCKIVISIDYNNMFTSIFTLTMSVDRYIACV	
.	161	240
sst <sub>1</sub>	HPIKAARYRRPTVAKVNLGVVLSLLVILPIVVFVSRTAANS DGTACNMLMPEPAQRWLVGFLVYTFLLMGFLLPVGAIC	
sst <sub>4</sub>	HPLRAATYRRPSVAKLINLGVWLASLLVTLPIAIFADTRPARGgaVACNLCQWHPHA - WSAVVFVYTFLLGFLLPVLAIG	
sst <sub>2</sub>	HPIKSAKWRPRPTAKMITMAVWVGSLLVILPIMYIAGLRSNQWGRSSCTINWPGESGAWYTGFIYTFILGFLVPLTIIC	
sst <sub>5</sub>	HPLSSARWRPRVAKLASAAAWLSLCSMLPLLVFADV - QEGGT - CNASWPEPVGLWGAFFIYTAVLGFFAPLLVIC	
sst <sub>3</sub>	HPTRSARWRTPVARTVSAAVVVASAVVVLVPPVVFSGV - PRGMSTCHMQWPEAAAWRAGFIYTAALGFFGFLLVIC	
MOR	HPVKALDFRTPRNAKIINVCNWLSSAIGLP - VMFMATTKYRQGSIDCTLTFSSHPTWYENLLKICVFI FAFIMPVLIIT	
DOR	HPVKALDFRTPAKAKLINICIWVLASGVGPIMVMAVTRPR - DGAVVCMQFPSPSWYWDVTKICVLFPAFVVPILIIIT	
KOR	HPVKALDFRTPLKAKIINICIWLLSSVGISAIVLGGTKVREddVIECSLQFPDDDYSWWDLFmiCVFI FAFVIVPLIIIT	
.	241	320
sst <sub>1</sub>	LCYVLIIAKMRMVALKAGWQQRKRSEKIKTLMMVMVMVFCWMPFYVQVLVNVFAEQDDATVSQLSVILGYANSCANP	
sst <sub>4</sub>	LCYLLIVGKMRVAVALRAGWQRRSEKIKTRLVLMVVMVFLCWMPPFYVQVLNVLVTSLDATVNHVSLILSYANSCANP	
sst <sub>2</sub>	LCYLFIIIIKVKSSGIRVGSKRKSEKKVTRMVSIVVAVFIFCWLPPFYivSSVSMASPTPALKGMFdvVLYTYANSCANP	
sst <sub>5</sub>	LCYLLIVVVKRAAGVVRG - CVRRRSEKVTTRMVLVVVLFVAGCWLPPFTVNIvVVALPQEPASAGLfvVILSYANSCANP	
sst <sub>3</sub>	LCYLLIVVVKRSAGRRV - wqRRRSEKVTTRMVAVALFVLCWMPFYVNLINVVVCPeEPAFFG11VVALPYANSCANP	
MOR	VCYGLMILRLKSVRMLSGSKEKDRNLRRITRMVLVVAVFIVCWTPIHIVYI I KALVTIPETTFQTVsiALGYTNSCLNP	
DOR	VCYGLMILRLRSVRLSGSKEKDRSLRRITRMVLVVVGAFFVVCWAPIHIFVIVVTLVDIddPLVvhLCLALGYANSSLNP	
KOR	VCYTLMILRLKSVRLSGSREKDRNLRRITRLVLVVAVFVVCWTPIHIFILVEALGSTSHSTAALSsiALGYTNSLNP	
.	321	391
sst <sub>1</sub>	ILYGFSLDNFKRSFQRILCLSWMDNAEEPVDDYATALKSRAYSVEDFQPENLESggVFRNGTCTSRITTL	
sst <sub>4</sub>	ILYGFSLDNFRRSFQVLCVgAGGAEEELDDYATALKSKGGAGCMCPPLPCQOEALQPEPGRKRIPLTR	
sst <sub>2</sub>	ILYAFSLDNFKKSFQNVLCVVKVSGTDDGERSDSKQDKSRLNETTETQRTLLNGDLQTSI-----	
sst <sub>5</sub>	ILYGFSLDNFRQSFQKVLClgAKDADATEPRPDRIRQQEATPPAHRAAANGLMQTSKL-----	
sst <sub>3</sub>	ILYGFSLYRPFQGFRRVLLRPSRRVRSQEPTEPT - -VGPPEKTEEEDEEEDEEESREGGKGMNGRVSQITQ	
MOR	VLYAFLDENFKRCF - REFCIPTSSNIEQONSTRIRQNTTrsTANTVdnHQLENLEAETAPLP-----	
DOR	VLYAFLDENFKRCF - RQLCRKPCGRPDPSSFSRAREATARERTACTP SDGPGGGAAA-----	
KOR	ILYAFLDENFKRCF - RDFCFPLKMRMERQSTSRVNTVQDPAYLRDIDGMNKPV-----	

Θα ήταν επομένως αναμενόμενο να υπάρχουν κάποιες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα δυο αυτά συστήματα.

Διάφορες μελέτες έχουν περιγράψει τέτοιες αλληλεπιδράσεις. Η χορήγηση σε υψηλές δόσεις β-ενδορφίνης στο γαστρικό επιθήλιο, το οποίο παράγει από μόνο του αυτό το πεπτίδιο, έχει αναφερθεί ότι επάγει την απελευθέρωση SRIF με αποτέλεσμα την δοσοεξαρτώμενη καταστολή της έκκρισης γαστρικού οξέος υποδεικνύοντας ένα μηχανισμό παρακρινούς αλληλεπίδρασης των δύο συστημάτων (501). Επίσης η ενδοεγκεφαλική χορήγηση σωματοστατίνης έχει βρεθεί ότι έχει θερμορυθμιστικές δράσεις μέσω κ (σε υψηλές δόσεις υπερθερμία) και μ (σε χαμηλές δόσεις υποθερμία) υποδοχέων οπιοειδών (502). Η παρεμπόδιση από την SRIF της απελευθέρωσης της

οξυτοκίνης ως απάντηση στην υπογλυκαιμία κατά τη διάρκεια δοκιμασίας ανοχής ινσουλίνης, έχει περιγραφεί ότι αναστέλλεται από την ναλοξόνη, γεγονός που δείχνει είτε δράση της SRIF στους υποδοχείς οπιοειδών είτε αλληλεπίδραση σε κάποιο άλλο επίπεδο (503). Πρόσδεση των οπιοειδών στους ssts και μάλιστα άσκηση της ανασταλτικής δράσης τους μέσω αυτών στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων έχει πρωτοπεριγραφεί στην κυτταρική σειρά από μαστό T47D (446;483-485). Έκτοτε έχει περιγραφεί αυτό το φαινόμενο και με άλλα οπιοειδή πεπτίδια σε άλλα συστήματα (504). Ακόμη, η οκτρεοτίδη έχει περιγραφεί πως έχει αναλγητικές ιδιότητες (505;506), ενώ το επίσης σωματοστατινεργικό πεπτίδιο CTP αναστέλει τους υποδοχείς  $\mu$  (507) και η ρεσεπτορφίνη, ένα πεπτίδιο με ιδιότητες οπιοειδούς, προσδένεται και στους ssts (447). Τέλος, πρόσφατα περιγράφηκε ο ετεροδιμερισμός του  $sst_2$  με τον υποδοχέα  $\mu$  στα ανθρώπινο εμβρυικά κύτταρα νεφρού 293 δίχως να παρατηρηθεί αλλαγή των ιδιοτήτων των υποδοχέων αυτών σε ότι αφορά την πρόσδεση των αγωνιστών αλλά με επιδράσεις στην φωσφορυλίωση, εσωτερικοποίηση και απευαισθητοποίησή τους (508). Από αυτές τις μελέτες φαίνεται πως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των δύο συστημάτων είναι εκτεταμένες και επομένως θα είναι χρήσιμο να μελετώνται ταυτόχρονα σε κάθε σύστημα.

- ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## **A. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Οι στόχοι της παρούσας διατριβής αφορούν τη διερεύνηση:

- Της παρουσίας λειτουργικών υποδοχέων σωματοστατίνης στην κυτταρική σειρά Ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2
- Της επίδρασης της οκτρεοτίδης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2
- Των ενδοκυτταρίων συστημάτων που σχετίζονται με το πιθανό αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της οκτρεοτίδης.
- Της πιθανής παραγωγής σωματοστατινεργικών πεπτιδίων από τα κύτταρα HepG2
- Της επίδρασης των οπιοειδών πεπτιδίων στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2
- Της πιθανής αλληλεπίδρασης των συστημάτων οπιοειδών και σωματοστατίνης στο πειραματικό μας μοντέλο

## **B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **I. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ**

Κυτταρική σειρά HEPG2 (Ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα)

Η κυτταρική σειρά HepG2 απομονώθηκε το 1975 από τον όγκο ενός 15-χρονου αγοριού από την Αργεντινή με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (193). Προέρχεται από ένα καλά διαφοροποιημένο ΗΚΚ και έτσι διατηρεί μια σειρά από χαρακτηριστικά και του φυσιολογικού ηπατοκυττάρου που την κάνουν πολύτιμη για μελέτες ηπατικής βιολογίας (208-213). Παράγουν σύμφωνα με τις υπάρχουσες πληροφορίες άλφα-εμβρυϊκή σφαιρίνη, λευκωματίνη,  $\alpha_2$ -μακροσφαιρίνη,  $\alpha_1$ -αντιτρυψίνη, τρανσφερίνη,  $\alpha_1$ -αντιχυμοτρυψίνη, απτοσφαιρίνη, σερουλοπλασμίνη, πλασμινογόνο, συμπληρώματα (C3, C4), ενεργοποιητή του C3, ιωδογόνο,  $\alpha_1$ -όξινη γλυκοπρωτεΐνη,  $\alpha_2$ -HS γλυκοπρωτεΐνη,  $\alpha$ -λιποπρωτεΐνη, δεσμευτική πρωτεΐνη της ρετινόλης κ.α.π. Ο χρόνος διπλασιασμού τους είναι 50-60 ώρες. Τα κύτταρα δεν περιέχουν το γονιδίωμα του ιού της ηπατίτιδας Β. Επίσης τα κύτταρα HepG2 εκφράζουν mRNA για ιντερφερόνη- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), παράγοντα νέκρωσης όγκων  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), παράγοντα δημιουργίας αποικιών μικροφάγων (macrophage colony stimulating factor, M-CSF), ογκοστατίνη-M, ενδοκυττάριο μόριο πρόσκολλησης-1 (intercellular adhesion molecule, ICAM-1) καθώς και για τις ιντερλευκίνες (IL) 4,5,7,10,11,12 και τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 6 (IL-6R) (509).



## II. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών

#### Υλικά και συσκευές

Κυτταρική σειρά HepG2 ( ACC 180 DSMZ Germany)

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

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

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

Ρυθμιστικό διάλυμα HANKS χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (Gibco -BRL Life Technologies, UK)

Χρωστική Trypan-blue (Seromed Biochrom, Germany )

Φλάσκες καλλιέργειών (Nunc, USA)

DMSO (Sigma, USA)

Ανάστροφο μικροσκόπιο και Μικροσκόπιο ορατού φωτός (Olympus, Japan)

Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή Neubauer

Επωαστικός κλίβανος

#### Διαλύματα

Διάλυμα HANKS δίχως ασβέστιο και μαγνήσιο (pH 7,3-7,4)

#### Μέθοδοι

#### ***Απόψυξη και εγκατάσταση κυτταροκαλλιέργειών***

Το φυαλίδιο με την κυτταρική σειρά εμβαπτίζεται, αμέσως μετά την έξοδό του, από το υγρό άζωτο σε νερό θερμοκρασίας 37<sup>0</sup>C. Τα κύτταρα στη συνέχεια μεταφέρονται σε σωλήνα 50ml που περιέχει 20ml πλήρες θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειών και φυγοκεντρώνται για 10 λεπτά στα 150g. Αφαιρείται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10ml πλήρες θρεπτικό μέσο και τοποθετούνται σε φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας επιφάνειας 80cm<sup>2</sup>.

#### ***Συνθήκες κυτταροκαλλιέργειών***

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37<sup>0</sup>C και σε υγρή ατμόσφαιρα με 5%CO<sub>2</sub>/95% αέρα. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται είναι RPMI 1640 με L-γλουταμίνη και 10% ορό εμβρύου βοός και pH ρυθμισμένο στο 7,4. Αλλαγή θρεπτικού υλικού γίνονταν κάθε 72 ώρες. Η εκτίμηση της

ανάπτυξης των κυττάρων γίνεται με παρατήρησή τους σε ανάστροφο στερεομικροσκόπιο..

### ***Ανακαλλιέργεια κυττάρων***

Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα φτάσουν να παρουσιάζουν πληρότητα στην επιφάνεια της φλάσκας τουλάχιστον 90%. Όταν τηρούν αυτή τη συνθήκη, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και αφού τα κύτταρα ξεπλυθούν με διάλυμα HANKS χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο, προστίθενται 3ml διαλύματος 1x Τρυψίνης/EDTA (Gibco BRL) και μετά από επώασή για 5 λεπτά στους 37<sup>0</sup>C με αποτέλεσμα τα κύτταρα να αποκολλώνται από τον πάτο της φλάσκας. Τα κύτταρα ξεπλένονται από την φλάσκα με θρεπτικό υλικό με ορό το οποίο ταυτόχρονα απενεργοποιεί την τρυψίνη και φυγοκεντρώνται στα 150g για 10 λεπτά στους 25<sup>0</sup>C, το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10ml θρεπτικού υλικού. Ο αριθμός των ζώντων κυττάρων προσδιορίζεται με την βοήθεια μικροσκοπίου ορατού φωτός (μεγέθυνση 40X) και η μέτρησή των κυττάρων γινόταν πάνω σε ειδική πλάκα-κυτταρομετρητή (Chemocytometer-Neubauer, Hauser Scientific) με την χρήση Trypan-blue για την αναγνώριση των νεκρών κυττάρων.

### ***Αποθήκευση αποθέματος κυτταρικής σειράς***

Τα κύτταρα καταψύχονται σε τακτά χρονικά διαστήματα, έτσι ώστε να διατηρούνται σε χαμηλό αριθμό γενεών και τα πειράματα πραγματοποιούνται στον ίδιο περίπου αριθμό γενεών. Για την κατάψυξη κυττάρων τα κύτταρα ανασηκώνονται από την φλάσκα καλλιέργειας με τρυψίνη ώστε να δημιουργηθεί εναιώρημα κυττάρων όπως αναφέρεται και παραπάνω, το οποίο μεταφέρεται σε σωλήνα 50ml και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 150g. Αφαιρείται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε επιθυμητό όγκο ορού εμβρύου βοός στον οποίο έχει προστεθεί DMSO σε τελική αραίωση 10%. Το νέο εναιώρημα τοποθετούνται σε ειδικά σωληνάρια (cryovials) και ακολούθως μέσα σε ειδική συσκευή ψύξης κυτταροκαλλιιεργειών (επιτρέπει την πτώση της θερμοκρασίας κατά 1<sup>0</sup>C ανά λεπτό) στον υπερκαταψύκτη. Το επόμενο πρωί μεταφέρονται και αποθηκεύονται σε ειδικό δοχείο με υγρό άζωτο, όπου μπορούν να παραμείνουν για πολλά χρόνια.

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

### Υλικά – Συσκευές

Κυτταρική σειρά HepG2 ( ACC 180 DSMZ Germany)

Πλάκες καλλιέργειας 24 βοθρίων (Nunc, 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)

Οκτρεοτίδη (Novartis, Basel, Switzerland)

EKC (Sterling-Withorp, USA)

DADLE (Sigma, USA)

DAGO (Sigma, USA)

aS<sub>1</sub>-casomorphin

Diprenorphine (Sterling-Withorp, USA)

Μικροπλάκες ELISA επίπεδου πυθμένα (Corning & Costar, USA)

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 η οποία βασίζεται στην ικανότητα των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων να μεταβολίζουν το άλας του τετραζολίου (510). 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 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 καλλιεργούνται σε πλάκες 24 βοθρίων σε μια αρχική πυκνότητα  $2 \times 10^4$  κυττάρων, με 1,0 ml θρεπτικού υλικού ανά βοθρίο. Όλες οι ουσίες προστίθενται μια ημέρα μετά από την έναρξη της καλλιέργειας των κυττάρων (που θεωρήθηκε η ημέρα 0), προκειμένου να εξασφαλιστεί ομοιόμορφη πρόσκληση των κυττάρων στις πλάκες στην αρχή των πειραμάτων. Τα κύτταρα αφήνονται να πολλαπλασιαστούν για συνολικά 6 ημέρες, με μια αλλαγή του θρεπτικού υλικού και των διαφορετικών ουσιών που εξετάζονται την ημέρα 3. Την ημέρα της μέτρησης αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθεται σε κάθε βοθρίο 0,5 ml διαλύματος MTT σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml και οι πλάκες τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) για 3 ώρες. Κατά τη διάρκεια της επώασης σχηματίζονται μπλε κρύσταλλοι μόνο στα ζωντανά κύτταρα. Μετά το τέλος της επώασης σε κάθε βοθρίο προστίθενται 0,5 ml προπανόλη-1, και αναδεύονται καλά ώστε να διαλυθούν όλοι οι κρύσταλλοι που είχαν σχηματιστεί. 200μl από κάθε βοθρίο μεταφέρονται σε μικροκυβελίδα (πλάκα ELISA) επίπεδου πυθμένα για να πραγματοποιηθεί μέτρηση του χρώματος (OD) 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.

#### Ανάλυση αποτελεσμάτων

Οι τιμές OD από τα δείγματα κυττάρων στα οποία είχε γίνει επίδραση με τις προς μελέτη ουσίες διαιρούνταν με τον μέσο όρο της OD των δειγμάτων από κύτταρα στα οποία δεν είχε γίνει καμμία επίδραση (μάρτυρες-control) κατά τον τύπο:

$$MTT.assay.value = \frac{sample.OD.}{mean.OD.of.control} \times 100$$

Η τιμή που προκύπτει από τον τύπο αντιστοιχεί στο ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων μετά από την επίδραση των υπό μελέτη ουσιών σε σχέση με τα αδιέγερτα κύτταρα.

### 3. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά 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) (511). Βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250 να υπάρχει σε δύο διαφορετικές χρωματικές μορφές, κόκκινη και μπλε. Μετά τη σύνδεσή της με τις πρωτονιομένες αμινομάδες των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας η κόκκινη μορφή μετατρέπεται σε μπλε προκαλώντας μία μετατόπιση στο μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 nm στα 595 nm. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής έχει υψηλό συντελεστή απορρόφησης γεγονός το οποίο παρέχει μεγάλη ευαισθησία κατά τη μέτρηση της πρωτεΐνης. Η σύνδεση πραγματοποιείται πολύ γρήγορα (περίπου σε δύο λεπτά) και υπάρχει πολύ καλή σταθερότητα του χρώματος για περίπου 1 ώρα μετά την προσθήκη της χρωστικής.

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

#### Ανάλυση αποτελεσμάτων

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

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

#### **4. Απομόνωση RNA από τα κύτταρα HepG2**

##### Υλικά και συσκευές

Κυτταρική σειρά HepG2 ( ACC 180 DSMZ Germany)

Πλάκες κυτταροκαλλιέργειών με 6 βοθρία καλλιέργειας (Nunc, USA)

Φαινολικό διάλυμα ομογενοποίησης Trizol (Invitrogen, Carisband CA, USA)

Αποστειρωμένο νερό άνευ RNAασών – RNase Free Water

Φυγόκεντρος

Χλωροφόρμιο (Sigma, USA)

Ισοπροπανόλη (Sigma, USA)

Αιθανόλη (Sigma, USA)

Φωτόμετρο (Hitatsi, Japan)

NaOH (Sigma, USA)

##### Διαλύματα

0,1N NaOH σε RNase Free Water

##### Μέθοδος

Για την λήψη RNA από κύτταρα HepG2, τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό δίχως ορό εμβρύου βοός σε πλάκες με έξι βοθρία καλλιέργειας. Το θρεπτικό υλικό στη συνέχεια αφαιρείται και σε κάθε βοθρίο προστίθεται 1ml του φαινολικού διαλύματος ομογενοποίησης Trizol το οποίο αφήνεται να δράσει για 1-2 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται μια ελαφρά απόξεση των κυττάρων και το ομογενοποιημένο δείγμα τοποθετείται σε αποστειρωμένο μικροσωληνάριο erppendorf στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι να γίνει το επόμενο στάδιο. Τα ομογενοποιημένα σε Trizol δείγματα αποψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15 min. Προστίθεται χλωροφόρμιο υπό στείρες συνθήκες σε αναλογία 0,1ml/ml Trizol και στη συνέχεια το δείγμα υφίσταται ισχυρή ανάδευση (~30 sec) και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για άλλα 5 λεπτά περίπου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση υπό 12000g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία  $4^{\circ}\text{C}$ . Η φυγοκέντρηση βοηθά τα βαρέα συστατικά να καθιζάνουν (πρωτεΐνες, DNA) με τη φαινόλη, ενώ το RNA παραμένει διαλυμένο στο χλωροφόρμιο, το οποίο σχηματίζει άχρωμο υπερκείμενο (άνω φάση) και μεταφέρεται σε νέο αποστειρωμένο μικροσωληνάριο erppendorf. Στο διάλυμα αυτό προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για σύντομο χρονικό διάστημα (~10sec) και αφήνεται να

σχηματίζει ίζημα (15 min, θερμοκρασία δωματίου). Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 12000g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C, μετά από την οποία είναι ορατός ο σχηματισμός ιζήματος. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και ακολουθεί έκπλυση με 1ml κρύας (4°C) αιθανόλης 75% (v/v) σε RNase Free H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 7000g για 8 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C, αφαίρεση του υπερκειμένου και επανάληψη. Μετά από την απομάκρυνση του υπερκειμένου, το σχηματισμένο λευκόφαιο ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε απαγωγό και επαναδιαλύεται σε RNase Free H<sub>2</sub>O.

Ακολουθεί η μέτρηση καθαρότητας του RNA στο δείγμα με τη χρήση φωτομέτρου το οποίο έχει ρυθμιστεί να μετρά σε δύο μήκη κύματος το λόγο 260/280nm. Ο λόγος αυτός προσδιορίζει την περιεκτικότητα του δείγματος σε RNA (260nm) και πρωτεΐνης (280nm) με ιδανική τιμή το λόγο 2. Δύο μl RNA του προς εξέταση δείγματος διαλύεται σε 0.1M NaOH. Η απορρόφηση του δείγματος μετράται και το αποτέλεσμα αντιστοιχίζεται στο μαθηματικό τύπο υπολογισμού του βάρους του RNA:

$$\text{RNA}(\mu\text{g}) = A_{260\text{nm}} \times \Phi \times V$$

Όπου:

$A_{260\text{nm}}$  η απορρόφηση του δείγματος στα 260nm

$\Phi$  ο συντελεστής αραίωσης [= 500 (2μl δείγματος σε 1000μl NaOH)]

$V$  ο όγκος του εναπομείναντος διαλύματος RNA σε ml

## 5. Επίδραση με DNάση, ανάστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

### Υλικά και συσκευές

DNase I (Gibco BRL, Paisley, UK)

Θερμικός κυκλοποιητής

Ολιγονουκλεοτίδια θυμιδίνης 12-18 - Oligo d(T)<sub>12-18</sub> ή Pd(T)<sub>12-18</sub> ομο-ολιγομερές (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)

Ανάστροφη μεταγραφάση – Superscript II™ RNase H<sup>-</sup> (Gibco BRL, Paisley, UK)

Αναστολέας ριβονουκλεασών – RNAsin® (Promega, Madison, Wisconsin, USA)

Δεοξυνουκλεοτίδια dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Roche, Mannheim, Germany)

Πολυμεράση – Taq DNA Polymerase (Roche, Mannheim, Germany)

100 bp DNA Ladder (Gibco BRL, Paisley, UK)

Αποστειρωμένο νερό άνευ ριβονουκλεασών - RNase-free H<sub>2</sub>O (USB, Cleveland Ohio, USA)

Ολιγονουκλεοτίδια έναρξης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης – primers MWG (Ebersberg, Germany)

Αγαρόζη (Sigma, USA)

Tris Base (Sigma, USA)

Boric Acid (Sigma, USA)

EDTA (Sigma, USA)

Bromophenol blue

Ficoll (Type 400)

Ethidium bromide (Sigma, USA)

Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad, USA)

Συσκευή και λογισμικό ανάγνωσης πηκτωμάτων (Molecular Analyst Software, BioRad).

### Διαλύματα

5x TBE (ανά 1L: 54g Tris Base, 27,5g Boric Acid, 20ml 0,5M EDTA, συμπλήρωση με απιονισμένο νερό μέχρι τον όγκο του 1L, pH 8)

Διάλυμα ανάμειξης δείγματος (Loading Buffer) (0,25% Bromophenol blue, 15% Ficoll (Type 400) σε νερό)



Διάλυμα κλίμακας μοριακού βάρους DNA (100bp) (1μl stock 100bp ladder, 7μl 1xTBE, 3μl Loading Buffer)

### Μέθοδοι

#### ***A. Επίδραση με DNase***

Η επεξεργασία με DNase για την αποδόμηση του DNA που εμπεριέχεται στα δείγματα ήταν ένα απαραίτητο στάδιο στην μελέτη των υποδοχέων σωματοστατίνης διότι με εξαίρεση τον sst<sub>2</sub> δεν έχουν ιντρόνια και ο κίνδυνος εσφαλμένων αποτελεσμάτων από επιμόλυνση από γενομικό DNA είναι σημαντικός (243).

Σε προσημειωμένα μικροσωληνάρια όγκου 0,2ml (microeppendorfs) με την ένδειξη (+ =με μεταγραφάση) και (- =χωρίς μεταγραφάση) , εισάγεται όγκος δείγματος που αντιστοιχεί σε 1μg RNA και ο όγκος του συμπληρώνεται στα 8μl με RNase Free H<sub>2</sub>O. Σε κάθε δείγμα (+ και -) προστίθενται αρχικά 1μl 10xDNase I Reaction Buffer και έπειτα 1μl DNase. Τα δείγματα αφήνονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα προστίθεται 1μl διαλύματος 25mM EDTA. Ακολουθεί τοποθέτηση των microeppendorfs στο θερμικό κυκλοποιητή και υφίστανται θερμική επεξεργασία για 10 λεπτά στους 65°C, με τη λήξη της οποίας τοποθετούνται σε πάγο (4°C).

#### ***B. Ανάστροφη Μεταγραφή***

Ακολούθως προστίθενται σε κάθε δείγμα 2μl ολιγονουκλεοτιδίων με 12 έως 18 μόρια Θυμίνης (Pd(T)<sub>12-18</sub>) το οποίο δρα δημιουργώντας πλαίσια έναρξης της διαδικασίας ανάστροφης μεταγραφής (reverse transcription) σε αντίστοιχα πολυαδενυλιωμένα τμήματα RNA του δείγματος. Τα δείγματα επανατοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή και θερμαίνονται στους 70°C για 10 λεπτά για να προκληθεί το ξεδίπλωμα των αλύσων του RNA και καλύτερη εφαρμογή των ολιγονουκλεοτιδίων. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο (4°C) και ακολουθεί η προσθήκη σε κάθε δείγμα: 4μl 5x RT-buffer, 1μl DTT, 1μl dNTPs, 1μl RNAsin. Τέλος, στο δείγμα με την ένδειξη (+) προστίθεται 1μl ενζύμου (reverse transcriptase), ενώ στο δείγμα (-) προστίθεται ίσος όγκος RNase Free H<sub>2</sub>O, ελέγχοντας μ' αυτόν τον τρόπο τυχόν μόλυνση των υπό διερεύνηση δειγμάτων. Τα δείγματα τοποθετούνται στον κυκλοποιητή και ξεκινά η διαδικασία της ανάστροφης μεταγραφής σε θερμοκρασία 42°C για 60 min,

έπειτα στους 95°C για 5 min και τέλος στους 4°C. Τα δείγματα cDNA αποθηκεύονται στη συνέχεια στους -20°C μέχρι την εκτέλεση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

### ***Γ. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)***

Για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε ένα μικρόλιτρο cDNA υποβλήθηκε σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης τελικού όγκου 25μL, στον οποίο περιλαμβάνονταν 1X ρυθμιστικό διάλυμα pcr, 0,2 mM dNTPs, 0,5 mM forward και reverse primers, και 0,05 U/μl Taq DNA πολυμεράση. Η αλληλουχίες των primers, οι θερμοκρασίες ζέσεως (Tm), οι κύκλοι και το μέγεθος προϊόντων για κάθε ζευγάρι primers που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 12. Οι primers για τους ssts, τον KOR και τον MOR επιλέχτηκαν από την τράπεζα δεδομένων NCBI UNISTS. Οι primers για τον DOR σχεδιάστηκε με το λογισμικό primer3 (Steve Rozen, Helen J. Skaletsky (1998) Primer3. [http://www-genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)). Οι primers για τη SRIF και την CST χρησιμοποιήθηκαν όπως έχουν περιγραφεί αλλού (264;512). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: 5 λεπτά στους 94°C, 35 κύκλοι (30 δευτερολέπτων στους 94°C, 30 δευτερόλεπτων στους 56°-60°C και 30 δευτερόλεπτων στους 72°C) που ακολουθούνται από επιμήκυνση του προϊόντος για 7 λεπτά σε 72°C. Επειδή τα γονίδια των ssts ( με εξαίρεση τον sst<sub>2</sub>) δεν περιέχουν ιντρόνια και προκειμένου να ελέγχονται τα υλικά για επιμόλυνση μόλυνση, μια ίδια παράλληλη pcr αντίδραση εκτελείται περιέχοντας αρχικό υλικό στο οποίο δεν είχε γίνει αντίστροφη μεταγραφή (το προαναφερθέν αρνητικό δείγμα(-)).

### ***Δ. Ανίχνευση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.***

Παρασκευάζεται 2% πηκτή αγαρόζης σε 0,5x TBE (2g αγαρόζης σε 100ml για μεσαίου μεγέθους πήκτωμα). Το μείγμα τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων για να επιτευχθεί η ομοιογενής διάλυσή του και προ της έγχυσης στο ειδικό δοχείο πήξεως (με χτένι) προστίθενται 40μl διαλύματος ethidium bromide (1mg/ml). Μετά την πήξη του, αφαιρείται από το πήκτωμα το χτένι, έχοντας σχηματίσει βοθρία / θέσεις όπου θα τοποθετηθούν τα προς διερεύνηση δείγματα, και το σύστημα τοποθετείται στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Σε καθένα εκ των προϊόντων της PCR προστίθεται διάλυμα ανάμειξης δείγματος σε αναλογία 5:1 και 10μl από το καθένα εισέρχεται στο βοθρίο που έχει σχηματιστεί από το χτένι στο πήκτωμα της αγαρόζης. Το gel ηλεκτροφορείται σε

0.5x TBE στα 100V για 45-60min. Η ανίχνευση των δεσμών γονιδιακού σήματος (bands) είναι εφικτή υπό υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Σε αυτό το σημείο το πήκτωμα φωτογραφίζεται ηλεκτρονικά και οι δέσμες αντιστοιχίζονται στο ανάλογο γονίδιο με τη βοήθεια της κλίμακας μοριακού βάρους ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε γενομικό DNA.

**Πίνακας 12.** Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για της μελέτες PCR, οι θερμοκρασίες τύξης του και το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης.

Primer		Primer	Tm	Product size
β-actin	F	GGTGGCTTTTAGGATGGCAAG	62.9	161bp
	R	ACTGGAACGGTGAAGGTGACAG	63.6	
sst <sub>1</sub>	F	CCACCAACATCTACATCCTA	55.3	555bp
	R	CCACCATCATCACCATTAAG	55.3	
sst <sub>2</sub>	F	CATCTTCTGCCTGACAGTC	56.7	509bp
	R	CCACCACAAAGTCAAACAT	52.4	
sst <sub>3</sub>	F	AGAACGCCCTGTCCTACTGG	61.4	533bp
	R	GTTGACGATGTTGAGCACG	56.7	
sst <sub>4</sub>	F	AACCTCGTCGTGACCAG	55.2	207bp
	R	AGCAGTGGCATAAGTAGTCCAG	59.8	
sst <sub>5</sub>	F	GCTTCCAGAAGGTTCTGTGC	59.4	145bp
	R	TTGCTGGTCTGCATAAGCC	56.7	
SRIF	F	GTTTCTGCAGAAGTCCCTGG	59.4	223bp
	R	AATTCTTGCAGCCAGCTTTG	57.3	
CST	F	GCAAATTCGCTCTAAACACAGGA	62.7	173bp
	R	TTGGGAAGGAGGAGAGGAAAGAT	63.6	
MRGX2	F	TGTGGCAAGGAGACCCTGAT	62,9	66bp
	R	TCCTACCAGCCCGACCAG	63,4	
KOR	F	CGTCTCAAGAGCGTCCG	57,6	123bp
	R	TATGTGAATGGGAGTCCAGC	57,3	
DOR	F	ACCAAGATCTGCGTGTTCCT	57,3	210bp
	R	CGATGACGAAGATGTGGATG	57,3	
MOR	F	CATGCCATTCCGACCTTC	56,0	100bp
	R	AGGCACTTTCCTAGAGAATTAGAGC	61,3	

## 6. Μελέτες δέσμευσης για την ανίχνευση υποδοχέων

### 6.1. Ανίχνευση ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα HepG2 και ανίχνευσης πρόσδεσης οπιοειδών στους υποδοχείς σωματοστατίνης.

#### Υλικά και συσκευές

Κυτταρική σειρά HepG2 ( ACC 180 DSMZ Germany)

PBS (Sigma, USA)

Αλβουμίνη ορού βοός (BSA) (Sigma, USA)

Tris-HCL (Sigma, USA)

MgCl (Sigma, USA)

EGTA (Sigma, USA)

PMSF (Sigma, USA)

Βακτρακίνη (Sigma, USA)

Λευπεπτίνη (Sigma, USA)

Ομογενοποιητής Polytron (*Janke & Kynkel GmbH & CG. IKA Lab., Typ T 25*)

Υπερφυγόκεντρος Beckman XL-90 με κεφαλή τύπου 70 Ti ( $r_{av}=65.7$ ).

Σωληνάρια πολυστυρενίου, 12x75mm

[<sup>125</sup>I]Tyr<sup>11</sup> SRIF-14 (*Amersham USA*)

MK-678 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

L-796,778 δώρο από τον Dr J. Epelbaum (Paris, France).

L-817,818 δώρο από τον Dr J. Epelbaum (Paris, France).

Οκτρεοτίδη (Novartis, Basel, Switzerland)

EKC

Υδατόλουτρο (*Hotpack-Shaker*)

Φίλτρα ινών ύαλου, (*Whatman GF/C, 2.5cm, Millipore*)

Συσκευή κενού, 12 οπών (Millipore)

Πολυαιθυλενιμίνη (PEI, *Merck*)

Μετρητής γ-ακτινοβολίας (*LKB-Wallak MiniGamma 1275, απόδοσης 75%*).

#### Διαλύματα

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Sigma, USA)

Ρυθμιστικό διάλυμα-I [50mM Tris-HCl, pH 7.4, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EGTA, 0.1mM PMSF, 200μg/ml βακτηρακίνη και 10μg/ml λευπεπτίνη].

Διάλυμα 0.1% w/v πολυαιθυλενιμίνης

Διάλυμα 1% w/v αλβουμίνης ορού βοός

Διάλυμα 50mM Tris-HCl, pH 7.4

## **Μέθοδοι**

### ***Απομόνωση μεμβρανικών παρασκευασμάτων κυττάρων HepG2***

Κύτταρα HepG2 τα οποία καλλιεργούνταν σε φλάσκες 80cm<sup>2</sup>, ξεπλύνονται δυο φορές με PBS και στη συνέχεια αποκολλούνται με απόξεση από την βάση. Το εναίωρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται στα 150g για 10 λεπτά, απορίπτεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα αποθηκεύονται στους -80<sup>0</sup>C μέχρι να γίνουν τα πειράματα.

Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιούνται σε 10ml ρυθμιστικού διαλύματος-I. Η ομογενοποίηση γίνεται στον πάγο, στις 13000 στροφές το λεπτό και με τη χρήση λεπίδων του τύπου S25-10G.

Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήται για 30 λεπτά σε 45000g και σε θερμοκρασία 4<sup>0</sup>C σε υπερφυγόκεντρο. Το ίζημα ομογενοποιείται για άλλη μια φορά και επαναφυγοκεντρήται, όπως παραπάνω. Το ίζημα, της δεύτερης αυτής φυγοκέντρωσης ομογενοποιείται σε 0.5ml ρυθμιστικό διάλυμα-I. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών των μεμβρανικών αυτών παρασκευασμάτων γίνεται με τη μέθοδο Bradford (511).

### **Μελέτες δέσμησης**

Για τον προσδιορισμό της αναστολής της δέσμησης της [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>11</sup> SRIF-14, σε μεμβρανικά παρασκευάσματα κυττάρων HepG2, από ειδικά ανάλογα για τους διαφορετικούς υπότυπους των υποδοχέων της σωματοστατίνης ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία, σύμφωνα με αυτή των Thermos & Reisine (266) και Liarakis & Thermos (513).

Σε σωληνάρια πολυστυρενίου, 12x75mm, εις διπλούν, προστίθεται [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>11</sup> SRIF-14 (C<sub>final</sub>: 51pM, 2000Ci/mmol, C<sub>final</sub>: Τελική συγκέντρωση ουσίας στο διάλυμα), ρυθμιστικό διάλυμα-I, ή 10<sup>-6</sup>M μη ραδιενεργού αναλόγου σωματοστατίνης και εναίωρημα μεμβρανών (75μg) έτσι ώστε ο τελικός όγκος του υγρού επώασης να είναι

0.25ml. Η μη ειδική δέσμευση (NSB, non specific binding) της [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>11</sup> SRIF-14 προσδιορίζεται παρουσία SRIF-14 (1μM) σύμφωνα με τον τύπο:

$$\%NSB = \frac{Total - Blank}{NSB - Blank} \times 100$$

όπου:

NSB: Μη ειδική δέσμευση της [<sup>125</sup>I] Tyr<sup>11</sup> SRIF-14 παρουσία 1μM SRIF-14 ή SRIF - 28 σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm, counts per min)

TOTAL: Ολική δέσμευση της [<sup>125</sup>I] Tyr<sup>11</sup> SRIF-14 απουσία μη ραδιοσημασμένης ουσίας σε cpm,

Blank: Μη ειδική δέσμευση της [<sup>125</sup>I] Tyr<sup>11</sup> SRIF-14 στα *GF/C* φίλτρα απουσία μεμβρανικών παρασκευασμάτων σε cpm.

Τα μη ραδιενεργά ανάλογα της σωματοστατίνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα παρακάτω: MK-678, (ανάλογο με μεγαλύτερη συγγένεια για τους sst<sub>2</sub> υποδοχείς), L-796,778 (sst<sub>3</sub> ανάλογο) και L-817,818 (ανάλογο με μεγαλύτερη συγγένεια για τους sst<sub>5</sub> υποδοχείς και μικροτερη για τους sst<sub>1</sub>). Επίσης ελέγχθηκε η τυχόν ειδική πρόσδεση της οκτρεοτίδης και του οπιοειδούς EKC στους υποδοχείς σωματοστατίνης.

Το μείγμα επωάζεται σε υδατόλουτρο για 90 λεπτά υπό ήπια ανάδευση (40 strokes/min) και σε θερμοκρασία 25°C. Ο διαχωρισμός της δεσμευμένης με τον υποδοχέα από την ελεύθερη ιωδιωμένη σωματοστατίνη γίνεται με διήθηση σε φίλτρα ινών ύαλου, σε συσκευή Millipore, 12 σπών με τη βοήθεια κενού. Τα φίλτρα είχαν προηγουμένως εμποτιστεί για μια ώρα σε 0.1% w/v πολυαιθυλενιμίνη και 30 λεπτά σε 1% w/v αλβουμίνη ορού βοός στους 4°C. Μετά το διαχωρισμό τα φίλτρα πλένονται τρεις φορές με 5ml, 50mM Tris-HCl, pH 7.4 στους 4°C και μετριοούνται σε μετρητή γ-ακτινοβολίας.

### **Ανάλυση των αποτελεσμάτων**

Τα πειράματα της φαρμακολογικής μελέτης των υποδοχέων σωματοστατίνης (πειράματα δόσης-απάντησης) βασίζονται στην αντίδραση Bylund (514):



όπου:

- [R]: Συγκέντρωση ελεύθερων υποδοχέων  
 [L\*]: Συγκέντρωση ελεύθερης ραδιοσημασμένης ουσίας πριν την αντίδραση  
 [I]: Συγκέντρωση ελεύθερης μη ραδιοσημασμένης 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 μετά την αντίδραση

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών προσδιορίστηκε το επί της εκατό ποσοστό της ειδικής δέσμευσης της ραδιοσημασμένης ουσίας (%SB, percent of specific binding) και κατά συνέπεια το ποσοστό της ειδικής δέσμευσης που αντιστοιχεί στον συγκεκριμένο υπότυπο υποδοχέα σωματοστατίνης για τον οποίο είναι ειδικό το συγκεκριμένο ανάλογο:

$$\%SB = (X - NSB) * 100 / (TOTAL - NSB)$$

- X: Δέσμευση της [<sup>125</sup>I] Tyr<sup>11</sup> SRIF-14 παρουσία μη ραδιοσημασμένης ουσίας σε cpm  
 NSB: Μη ειδική δέσμευση της [<sup>125</sup>I] Tyr<sup>11</sup> SRIF-14 παρουσία 1μM SRIF-14 ή SRIF - 28 σε cpm  
 TOTAL: Ολική δέσμευση της [<sup>125</sup>I] Tyr<sup>11</sup> SRIF-14 απουσία μη ραδιοσημασμένης ουσίας σε cpm,

## 6.2. Ανίχνευση υποδοχέων οπιοειδών στα κύτταρα HepG2

Για να γίνει ανίχνευση των διαφόρων τύπων και υποτύπων των οπιοειδών υποδοχέων σε ολόκληρα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ραδιενεργά ανάλογα για τους διάφορους οπιοειδείς υποδοχείς (515;516), όπως φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

**Πίνακας 13.** Οι οπιοειδείς αγωνιστές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των διαφόρων τύπων και υποτύπων των οπιοειδών υποδοχέων.

Ραδιενεργό ανάλογο	Υποδοχείς που ανιχνεύονται
[ <sup>3</sup> H]-διπρενορφίνη	δ, μ, κ2, κ3
[ <sup>3</sup> H]-U69,593	κ1
[ <sup>3</sup> H]-DPDPE	Δ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι σύμφωνα με τους Hatzoglou et al. (342;483).

### Υλικά-Συσκευές

Κυτταρική σειρά HepG2 ( ACC 180 DSMZ Germany)

Πλάκες καλλιέργειών 24 βοθρίων (Corning & Costar, USA)

Γλυκίνη (Gibco-BRL Life Technologies, UK)

NaOH (Merck, Germany)

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

[<sup>3</sup>H] DPDPE (DuPont NEN, USA)

[<sup>3</sup>H]-U69,593 (Amersham Pharmacia, UK)

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 [<sup>3</sup>H] (Packard, USA)

### Διαλύματα



Διάλυμα οξινοποίησης: Γλυκίνη 50mM pH 3.0

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS

Διάλυμα NaOH 2N

### Μέθοδος

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες 24 βοθρίων με επίπεδο πυθμένα μέχρι να καλυψουν περισσότερο από το 90% της καλλιεργητικής επιφάνειας. Την ημέρα του πειράματος γίνεται έκπλυση των κυττάρων δύο φορές με 2 ml PBS, επώαση με 0,5 ml διάλυμα οξινοποίησης 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 επωάζονται με διαφορετικούς τριτωμένους οπιοειδείς αγωνιστές (τελική συγκέντρωση 5 με 10 nM) και διαφορετικές συγκεντρώσεις του αντίστοιχου μη ραδιενεργού αναλόγου πεπτιδίου ( $10^{-6}$  -  $10^{-12}$  M) σε τελικό όγκο 0,4ml ανά αντίδραση, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Οι συγκεντρώσεις των πεπτιδίων  $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  επελέγησαν δεδομένου ότι τόσο τοπικά, όσο και στην γενική κυκλοφορία δεν έχουν ανιχνευθεί μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τους (342;515;516). Στο τέλος της επώασης, απομακρύνεται το διάλυμα της αντίδρασης και πραγματοποιείται έκπλυση των κυττάρων δύο φορές με 2 ml παγωμένο διάλυμα PBS. Οι δεσμευμένοι στους υποδοχείς, οπιοειδείς αγωνιστές συλλέγονται με 0,5 ml διάλυμα NaOH 2N στο οποίο προστίθενται 3 ml υγρό σπινθηρισμού και μετρήθηκε σε μετρητή β-ακτινοβολίας για 2 λεπτά.

### Ανάλυση αποτελεσμάτων

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων βασίζεται, όπως και στους υποδοχείς σωματοστατίνης στην αντίδραση Bylund (514) και από τα αποτελέσματα των πειραμάτων προσδιορίζεται το επί της εκατό ποσοστό της ειδικής δέσμευσης του ραδιοσημασμένου αναλόγου (%SB, percent of specific binding) παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων του μη ραδιοσημασμένου πεπτιδίου.

Σχεδιάζονται 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%, IC50) και προσδιορίζει τη συγγένεια του πεπτιδίου με τους υποδοχείς.

## 7. Ανοσοϊτοχημικός εντοπισμός των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα HepG2 - Μικροσκοπία συνεστίασης (Confocal Microscopy)

### Υλικά –Συσκευές

Πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων – Chamber Slides (Nunc, USA)

Παραφορμαλδεύδη PFA (Merck, Germany)

Αντισώματα έναντι του καρβοξυ-τελικού άκρου του sst<sub>2A</sub> (Gramsch Laboratories), sst<sub>3</sub>, sst<sub>5</sub> (Dr S. Schultz)

Πεπτίδιο CETQRTLLNGDLQTSI (Gramsch Laboratories, Germany)

Πεπτίδιο CQERPPSRVA (Dr S. Schultz, Germany)

Πεπτίδιο QEATRPRTAAANGLMQTSKL (Dr S. Schultz, Germany)

Αντίσωμα αίγας κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών κουνελιού (*Vector Laboratories, USA*)

Μικροσκόπιο συνεστίασης Confocal laser scanning module (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany)

Tris-HCl (Sigma, USA)

NaCl (Sigma, USA)

παραφορμαλδεύδη (Sigma, USA)

NGS, normal goat serum (Gibco-BRL Life Technologies, UK)

Triton X-100 (Sigma, USA)

### Διαλύματα

Διάλυμα TBS (0.1M Tris-HCl, και 0.9% NaCl, pH 7.4)

4% παραφορμαλδεύδη σε νερό.

Υλικό κάλυψης φθορισμού (fluorescent mounting medium, Vectashield<sup>®</sup>, Vector Laboratories, USA)

### Μέθοδοι

#### ***Μονιμοποίηση των κυττάρων***

Τα κύτταρα HepG2 καλλιεργούνται σε chamber slides όπου αφού αναπτυχθούν σε 50-70% της επιφανείας αλλάζεται το θρεπτικό υλικό και τίθενται σε νέο θρεπτικό υλικό δίχως ορό εμβρύου βοός για 24 ώρες. Το θρεπτικό υλικό στη συνέχεια απομακρύνεται και τα κύτταρα αφήνονται για μια έως μιάμιση ώρα με διάλυμα 4% παραφορμαλδεύδης.

### ***Ανοσοφθορισμός***

Για τη μελέτη της ανοσοδραστικότητας υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα HepG2 (sst<sub>2A</sub>, sst<sub>3</sub>, sst<sub>5</sub>) χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα, ανεπτυγμένα σε κουνέλι, πολυκλωνικά αντισώματα ενάντια:

- στο καρβοξυ- τελικού άκρου του sst<sub>2A</sub> (σε συγκέντρωση 1:1000, *Gramsch Laboratories*),
- στο καρβοξυ- τελικού άκρου των sst<sub>3</sub> και του sst<sub>5</sub> (σε συγκέντρωση 2.5μg/ml, Dr S. Schultz),

Για τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα TBS (0.1M Tris-HCl, και 0.9% NaCl, pH 7.4) και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά σε διάλυμα 0.1M TBS το οποίο περιείχε 3.3% φυσιολογικό ορό αίγας (NGS, normal goat serum) για την αποφυγή της μη ειδικής δέσμησης των αντισωμάτων. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν τρεις φορές με TBS και επώαστηκαν, για 16-18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, με το πρώτο αντίσωμα το οποίο είχε προηγουμένως διαλυθεί σε διάλυμα 0.1M TBS το οποίο περιείχε 0.5% NGS και 0.3% Triton X-100. Μετά από αυτό, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν τρεις φορές με 0.1M TBS και επώαστηκαν για 1.5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με φθορίζον δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με φλουορεσκεΐνη σε συγκέντρωση 1:150. Τα κύτταρα αφού ξεπλύθηκαν με TBS, καλύφθηκαν με υλικό κάλυψης φθορισμού και παρατηρήθηκαν με τη βοήθεια μικροσκοπίου συνεστίασης.

### ***Έλεγχος της ειδικότητας των αντισωμάτων κατά των υποδοχέων σωματοστατίνης***

Η ειδική δέσμηση των αντισωμάτων κατά των σωματοστατινεργικών υποδοχέων sst<sub>2A</sub>, sst<sub>3</sub> και sst<sub>5</sub> ελέγχθηκε με προεπώαση των αντισωμάτων με τα αντίστοιχα αντιγόνα για τρεις ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση τους για τα πειράματα ανοσοφθορισμού. Τα αντιγόνα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συνθετικά πεπτίδια αντίστοιχα του καρβοξυ-τελικού άκρου των υποτύπων των υποδοχέων σωματοστατίνης το οποίο αποτέλεσε και τον επίτοπο στόχο των αντισωμάτων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα πεπτίδια:

- sst<sub>2A</sub> [CETQRTLLNGDLQTSI, αμινοξέα 354–369],
- sst<sub>3</sub> [CQERPPSRVA, αμινοξέα 384–393]
- sst<sub>5</sub> [QEATRPRTAAANGLMQTSKL, αμινοξέα 345–364]

### ***Μικροσκοπία***

Τα παρασκευάσματα των μελετών ανοσοφθορισμού παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο συνεστίασης [συνεστιακό μικροσκόπιο laser, Leica DM RE (*Leica*), (He/Ne laser) με φακό Plan Fluotar x 40/1.00 και ελαιοκαταδυτικό φακό Plan Apo x 63 / 1.32]. Η ρύθμιση της φωτεινότητας και της αντίθεσης των φωτογραφιών έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα *Adobe Photoshop 5.0*.

## **8. Ραδιοανοσοανίχνευση και μέτρηση της εκκρινόμενης ποσότητας του πεπτιδίου κορτιστατίνη από τα κύτταρα HepG2**

### Υλικά

Κυτταρική σειρά HepG2 ( ACC 180 DSMZ Germany)

Πλάκες καλλιέργειών 6 οπών (Corning & Costar, USA)

PBS (Sigma , USA)

Ομογενοποιητής υπερήχων

Οξικό οξύ (Merck, Germany)

Λυοφιλοποιητής

Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma , USA)

NaCl (Sigma , USA)

ζελατίνη (Sigma , USA)

Αζίδιο του νατρίου

Αντι-ορός κουνελιών έναντι της οβαλβουμίνης (δώρο από τον Prof. Sperk, Innsbruck, Austria)

<sup>125</sup>I-Tyr<sup>11</sup>-SRIF-14 (Amersham, Germany)

CST-17 (Bachem, USA)

ξυλάνθρακας (Sigma , USA)

δεξτράνη (Sigma , USA)

### Διαλύματα

Διάλυμα 2N οξικού οξέος

Διάλυμα ραδιοανοσοανίχνευσης (0,15M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 0,1% ζελατίνη και 0,02% αζίδιο του νατρίου)

### Μέθοδος

Τα κύτταρα HepG2 που καλλιεργήθηκαν σε πλάκες έξι βοθρίων και όταν καλύφθηκε η καλλιεργητική επιφάνεια σε ποσοστό >90%, ξεπλύθηκαν δις με PBS και ομογενοποιήθηκαν με υπερήχους σε 0,5ml, 2N οξικού οξέος και τοποθετήθηκαν στους -80<sup>0</sup>C. Μετά από τουλάχιστον 24 ώρες κατάψυξης τα δείγματα υπεβλήθησαν σε φυγοκέντρηση στα 12.000g για 20 λεπτά στους 4<sup>0</sup>C και τα υπερκείμενα λυοφιλοποιήθηκαν και αποθηκεύτηκαν και πάλι στους -80<sup>0</sup>C μέχρι την περαιτέρω χρήση. Μέρος αυτού του υπερκειμένου χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της πρωτεΐνης

του δείγματος. Τα λυοφιλοποιημένα δείγματα ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα ραδιοανοσοανίχνευσης που περιέχει, 0,15M φωσφορικό νάτριο (pH 7.4), 0.15 M χλωριούχο νάτριο, 0,1% ζελατίνη και 0,02% αζίδιο του νατρίου. Ο αντι-ορός κουνελιών, που χρησιμοποιήθηκε στην ραδιοανοσοανίχνευση της CST, αναπτύχθηκε αρχικά έναντι της οβαλβουμίνης που συνδέεται με την SRIF-14 (517) και για τον προσδιορισμό των επιπέδων της CST η τελική συγκέντρωσή του ήταν 1:15,000. Η  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$  (20,000 cpm, 2000 Ci/mmol) χρησιμοποιήθηκε ως ραδιενεργός ανιχνευτής ενώ συνθετική SRIF-14 ή CST-17 σε συγκεντρώσεις από 0,78 έως 200 mg/ml χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Το μίγμα επώαστηκε στους 4<sup>0</sup>C για 24 ώρες, και τα συνδεδεμένα και ελεύθερα πεπτίδια διαχωρίστηκαν με την προσθήκη ενός μίγματος ξυλάνθρακα 2.5% και δεξτράνης T70 0,25% (χωρίς ζελατίνη). Οι τιμές που προκύπτουν από την πρότυπη καμπύλη (που κατασκευάζεται με CST-17) για τα δείγματα ανάγονται σε μg πρωτεΐνης με βάση την αρχική μέτρηση.

## **9. Μελέτη της παραγωγής μεταβολιτών του μονοξειδίου του αζώτου**

### Υλικά και συσκευές

HEPES (Sigma, USA)

FAD (Sigma, USA)

NADPH (Sigma, USA)

Νιτρική αναγωγάση (Nitrate reductase) (Sigma, USA)

LDH (Sigma, USA)

Πυροσταφυλικό οξύ (Sigma, USA)

Sulfanilamide (Sigma, USA)

N-1-naphthyl-ethylen-diamine (Sigma, USA)

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Germany)

NaNO<sub>2</sub> (Sigma, USA)

### Διαλύματα

Διάλυμα Griess (1% Sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthyl-ethylen-diamine, 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, σε απιονισμένο νερό)

Φασματοφωτόμετρο ELx 800 (Bio-Tek Instruments, Vermont, USA)

### Μέθοδος

Η παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου από τα κύτταρα HepG2 μελετήθηκε στο υπερκείμενο των καλλιέργειών από τα πειράματα πολλαπλασιασμού. Το σύνολο (NO<sub>x</sub>) των νιτρικών (NO<sup>-3</sup>) και νιτρωδών (NO<sup>-2</sup>) ιόντων, που αντιπροσωπεύουν τους τελικούς μεταβολίτες του NO, μετρήθηκε με φωτομετρική μέθοδο βασισμένη σε μια τροποποίηση της αντίδρασης Griess (518). Συγκεκριμένα 50 μl δείγματος επωάζονται για 30 λεπτά στους 37<sup>0</sup>C, παρουσία 50 mM HEPES, 5 μM FAD, 0.1 mM NADPH και 0,2 U/ml Νιτρικής αναγωγάσης (Nitrate reductase) σε τελικό όγκο 250μl, έτσι ώστε να μετατραπούν τα νιτρικά ιόντα σε νιτρώδη (που είναι και τα ιόντα που ανίχνευει η αντίδραση Griess). Στην συνέχεια προστίθενται 50 μl διαλύματος 81 U/ml LDH και 50 μl διαλύματος 54 mM πυρουβικού οξέος για την πλήρη οξείδωση του NADPH (η παρουσία NADPH αναστέλλει την αντίδραση Griess) και ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στους 37<sup>0</sup>C. Η τελική προσθήκη 300 μl διαλύματος Griess οδηγεί σε ταχεία ανάπτυξη λαμπερού ιώδους χρώματος. Η απορρόφηση του τελικού προϊόντος της αντίδρασης ανιχνεύεται σε μήκος κύματος 545 ή 550 nm με φασματοφωτόμετρο. Η



τελική συγκέντρωση NOx υπολογίζεται σε κάθε πείραμα με βάση πρότυπη καμπύλη που κατασκευάζεται από διαδοχικές αραιώσεις NaNO<sub>2</sub> (6,25-400 μM NaNO<sub>2</sub>). Από όλα τα δείγματα αφαιρείται τυχόν επίδραση του θρεπτικού υλικού στη μέτρηση και οι μετρήσεις ανάγονται στον αριθμό των κυττάρων όπως αυτός μετράται με την μέθοδο του MTT.

## 10. Στατιστική Ανάλυση

Οι τιμές των αποτελεσμάτων των πειραμάτων εκφράζονται ως η μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα.

Η στατιστική επεξεργασία περιελάμβανε τις μεθόδους: Oneway-ANOVA, Student-t για ανεξάρτητες μεταβλητές, ενώ κατά περίπτωση χρησιμοποιήθηκε και Paired Student t Test. Τιμές που συγκρίθηκαν με τις παραπάνω μεθόδους με  $p < 0,05$  θεωρήθηκε ότι διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα Microsoft<sup>®</sup> Excel version 2002, Microcal<sup>™</sup>Origin<sup>™</sup> version 5.0 και SPSS 11.0.

## C. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. Μελέτης της έκφρασης και παρουσίας υποδοχέων σωματοστατίνης στην κυτταρική σειρά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2

Η αρχική υπόθεση που έγινε περί πιθανής επίδρασης της οκτρεοτίδης μέσω των υποδοχέων ssts σε μια σειρά ΗΚΚ, προϋπέθετε την έκφραση και παραγωγή λειτουργικών υποδοχέων ssts από τα κύτταρα του πειραματικού μας μοντέλου. Για τον λόγο αυτό εκτελέσαμε αρχικά RT-PCR για τους υποδοχείς ssts. Με βάση τα αποτελέσματά της PCR προχωρήσαμε σε περαιτέρω επιβεβαίωση της παρουσίας των πρωτεϊνών των ssts στα κύτταρα HepG2 με ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε συνδυασμό με μικροσκοπία συνεστίασης και στη συνέχεια σε έλεγχο της λειτουργικής τους κατάστασης με μελέτες δέσμευσης.

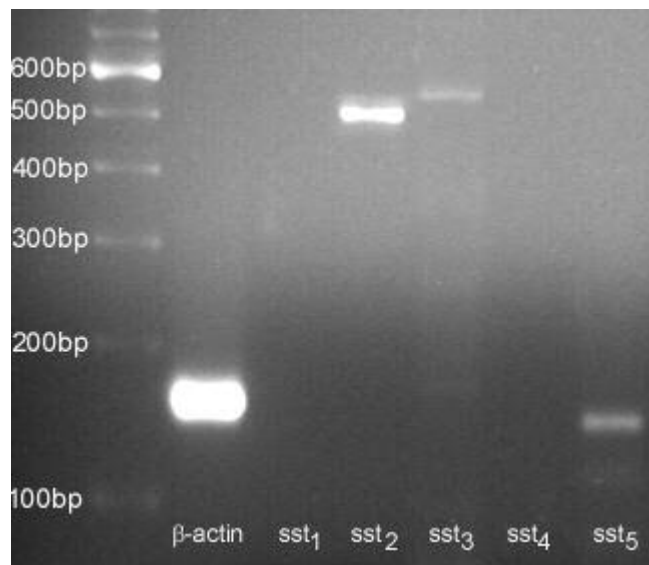
#### 1.1. Ανίχνευση έκφρασης του mRNA των υποδοχέων σωματοστατίνης με PCR.

Η έκφραση του mRNA των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα HepG2 που βρίσκονταν σε ηρεμία και είχαν τεθεί σε στέρηση ορού εμβρύου βοός, έγινε με RT-PCR με ειδικούς primers.

Με εξαίρεση τον sst<sub>2</sub>, οι υποδοχείς σωματοστατίνης δε έχουν ιντρόνια (243). Επομένως ο κίνδυνος εσφαλμένων αποτελεσμάτων λόγω επιμόλυνσης από γενομικό DNA ήταν σημαντικός. Κρίθηκε λοιπόν σκόπιμη η επεξεργασία των δειγμάτων με DNase για την αποδόμηση του DNA που εμπεριέχεται στα δείγματα ως απαραίτητο στάδιο στην μελέτη των υποδοχέων σωματοστατίνης.

Μελετήθηκαν τουλάχιστον 3 διαφορετικά δείγματα που ελήφθησαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και στα οποία έγινε επεξεργασία απομόνωσης RNA και ανάστροφης μεταγραφής ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Τα αποτελέσματα ήταν πανομοιότυπα σε όλα τα πειράματα. Παράλληλα εκτελέστηκε PCR με RNA στο οποίο δεν είχε γίνει ανάστροφη μεταγραφή με σκοπό τον περαιτέρω έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης με γενομικό DNA.

Στα κύτταρα HepG2 σε συνθήκες ηρεμίας και στέρησης ορού, ανευρέθηκε με RT-PCR ότι παράγουν mRNA για τους υποτύπους υποδοχέων σωματοστατίνης *sst*<sub>2</sub>, *sst*<sub>3</sub> και *sst*<sub>5</sub>, ενώ δεν ανιχνεύθηκε η έκφραση των υποτύπων *sst*<sub>1</sub> και *sst*<sub>4</sub> (Εικόνα 6). Σε κανένα από τα δείγματα στα οποία είχε γίνει επεξεργασία με DNάση αλλά δεν είχε γίνει ανάστροφη μεταγραφή, δεν εμφανίστηκε σήμα, επιβεβαιώνοντας την καθαρότητα των δειγμάτων και την απουσία επιμόλυνσης από γενομικό DNA.



**Εικόνα 6.** Έκφραση mRNA των *ssts* στα κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2.

## 1.2. Ανίχνευση των υποδοχέων σωματοστατίνης με ανοσοφθορισμό και μικροσκοπία συνεστίασης.

Επειδή η έκφραση mRNA των υποδοχέων ssts από μόνη της δεν επαρκεί για την επιβεβαίωση της παρουσίας του πρωτεϊνικού προϊόντος που κωδικοποιεί, προχωρήσαμε σε μελέτες ανοσοφθορισμού με σκοπό την ανίχνευση των ίδιων των πρωτεϊνών των ssts, αλλά και την μελέτη της θέσης τους στα κύτταρα. Επιπλέον η PCR δεν μπορούσε να μας παρέχει στοιχεία για τον ειδικό υποτύπο του sst<sub>2</sub> που υπήρχε στο πειραματικό μας μοντέλο, κάτι που μπορεί να το επιτύχει ο ανοσοφθορισμός.

Για τις μελέτες ανίχνευσης με ανοσοφθορισμό των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα HepG2 (sst<sub>2A</sub>, sst<sub>3</sub>, sst<sub>5</sub>) χρησιμοποιήθηκαν ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού έναντι των καρβοξυ-τελικών άκρων του sst<sub>2A</sub>, του sst<sub>3</sub> και του sst<sub>5</sub>. Η ειδική δέσμευση των αντισωμάτων κατά των σωματοστατινεργικών υποδοχέων sst<sub>2A</sub>, sst<sub>3</sub> και sst<sub>5</sub> ελέγχθηκε με προεπώαση των αντισωμάτων με αντιγόνα που αντιστοιχούν στους επιτόπους που είναι στόχοι των αντισωμάτων αυτών. Τα αντιγόνα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συνθετικά πεπτίδια αντίστοιχα του καρβόξυ-τελικού άκρου των υποτύπων των υποδοχέων σωματοστατίνης [sst<sub>2A</sub> (CETQRTLLNGDLQTSI, αμινοξέα 354–369), sst<sub>3</sub> (CQERPPSRVA, αμινοξέα 384–393) και sst<sub>5</sub> (QEATRPRTAAANGLMQTSKL, αμινοξέα 345–364)].

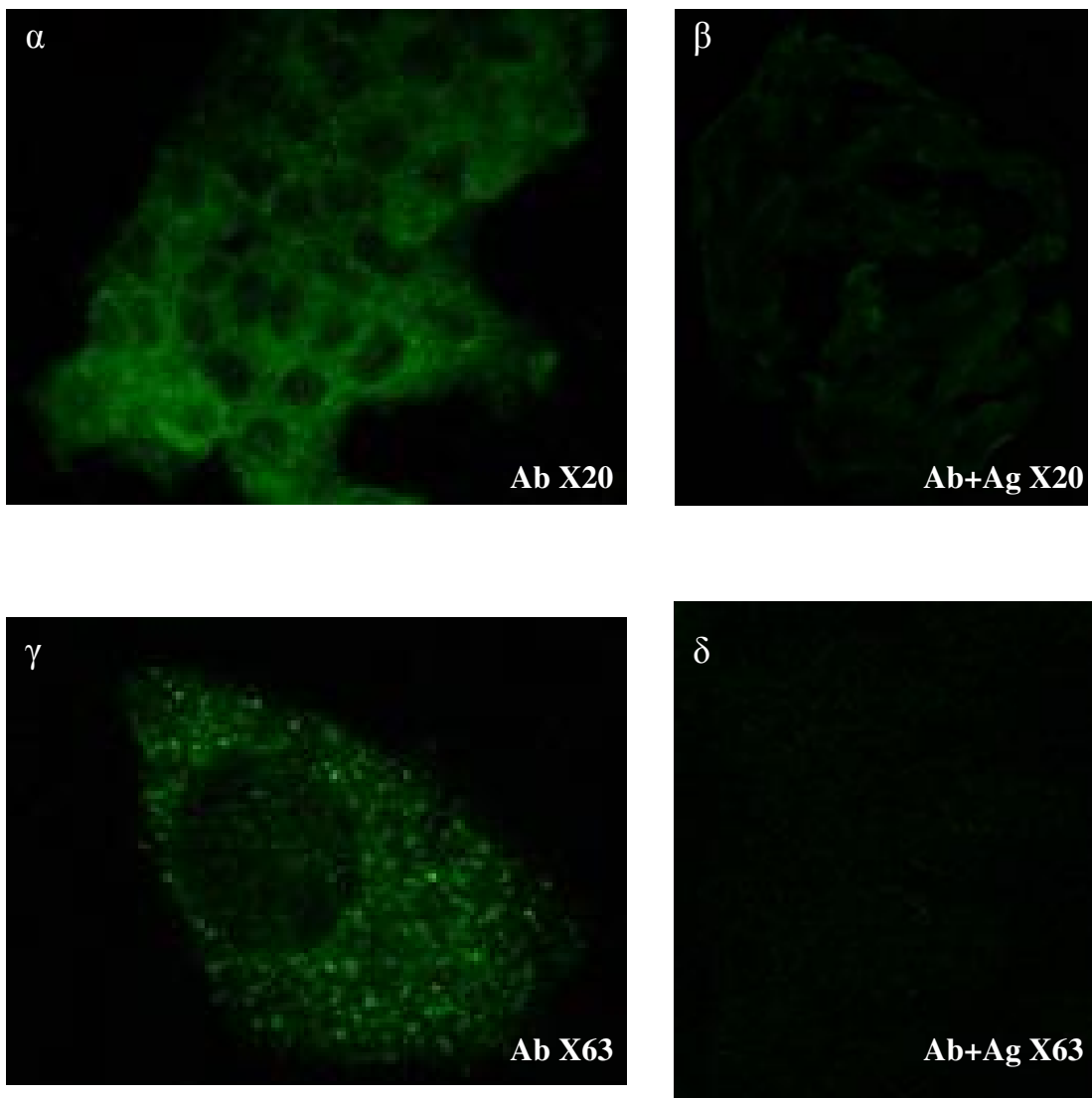
Τα παρασκευάσματα των μελετών ανοσοφθορισμού παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο συνεστίασης με το οποίο και ελήφθησαν οι εικόνες.

Ο ανοσοφθορισμός επιβεβαίωσε την παρουσία sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> και sst<sub>5</sub> στα κύτταρα HepG2, και μάλιστα ο sst<sub>2</sub> αντιστοιχούσε στον υποτύπο sst<sub>2A</sub>. Οι υποδοχείς σωματοστατίνης στα κύτταρα HepG2 βρέθηκαν να εντοπίζονται κυρίως ενδοκυττάρια και αυτό αποτέλεσε έκπληξη, μιας και η αναμενόμενη θέση τους θα ήταν στην κυτταρική μεμβράνη όπου θα μπορούσαν να συνδεθούν με τον αγωνιστή που θα μπορούσε να βρεθεί στο περιβάλλον του κυττάρου. Μάλιστα ο τρόπος κατανομής των τριών υποδοχέων ήταν διαφορετικός για καθένα από αυτούς, υποδηλώνοντας διαφορετικούς μηχανισμούς ρύθμισης της κυκλοφορίας των διαφορετικών υποτύπων.

Το σήμα εξαφανιζόταν σε όλες τις περιπτώσεις, όταν τα αντισώματα προεπωάζονταν με τα αντίστοιχα συνθετικά πεπτίδια.

### 1.2.1. Ανίχνευση υποδοχέα $sst_{2A}$

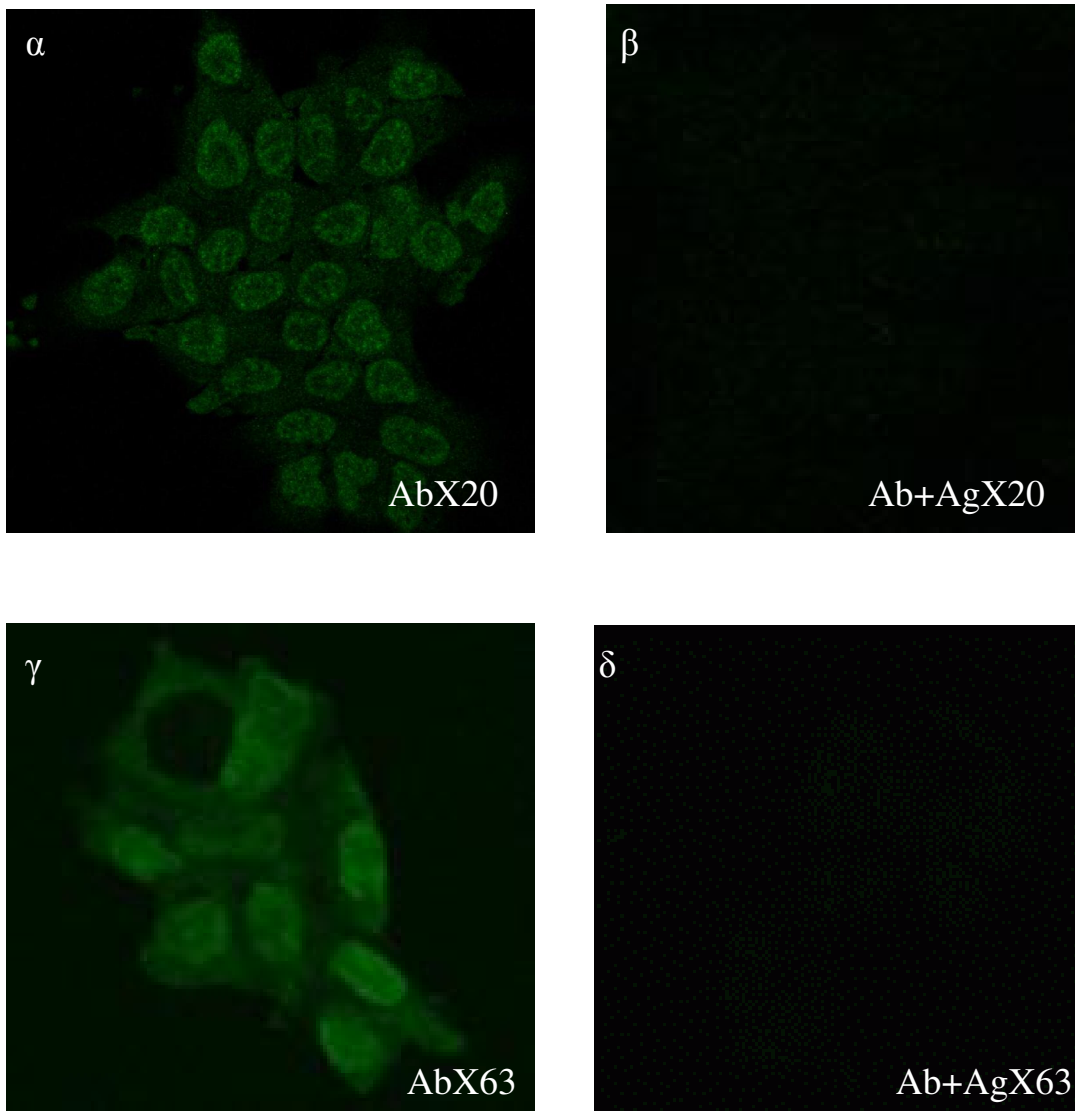
Ο  $sst_2$  βρέθηκε διεσπαρμένος σε όλο το κυτταρόπλασμα υπό μορφή μικρών φθορίζοντων στιγμάτων. Στις εικόνες που ελήφθησαν ήταν επίσης ξεκάθαρη η απουσία χρώσης στην περιοχή του πυρήνα (Εικόνες 7α και 7γ). Το σήμα εξαφανιζόταν όταν το αντίσωμα προεπωάζονταν με το αντίστοιχο συνθετικό πεπτίδιο (Εικόνες 7β και 7δ).



**Εικόνα 7.** Ανίχνευση των υποδοχέων  $sst_{2A}$  με μικροσκοπία συνεστίασης και ανοσοφθορισμό στα κύτταρα HepG2. (α) και (β) μεγέθυνση X20, (γ) και (δ) μεγέθυνση X63.

### 1.2.2. Ανίχνευση υποδοχέα $sst_3$

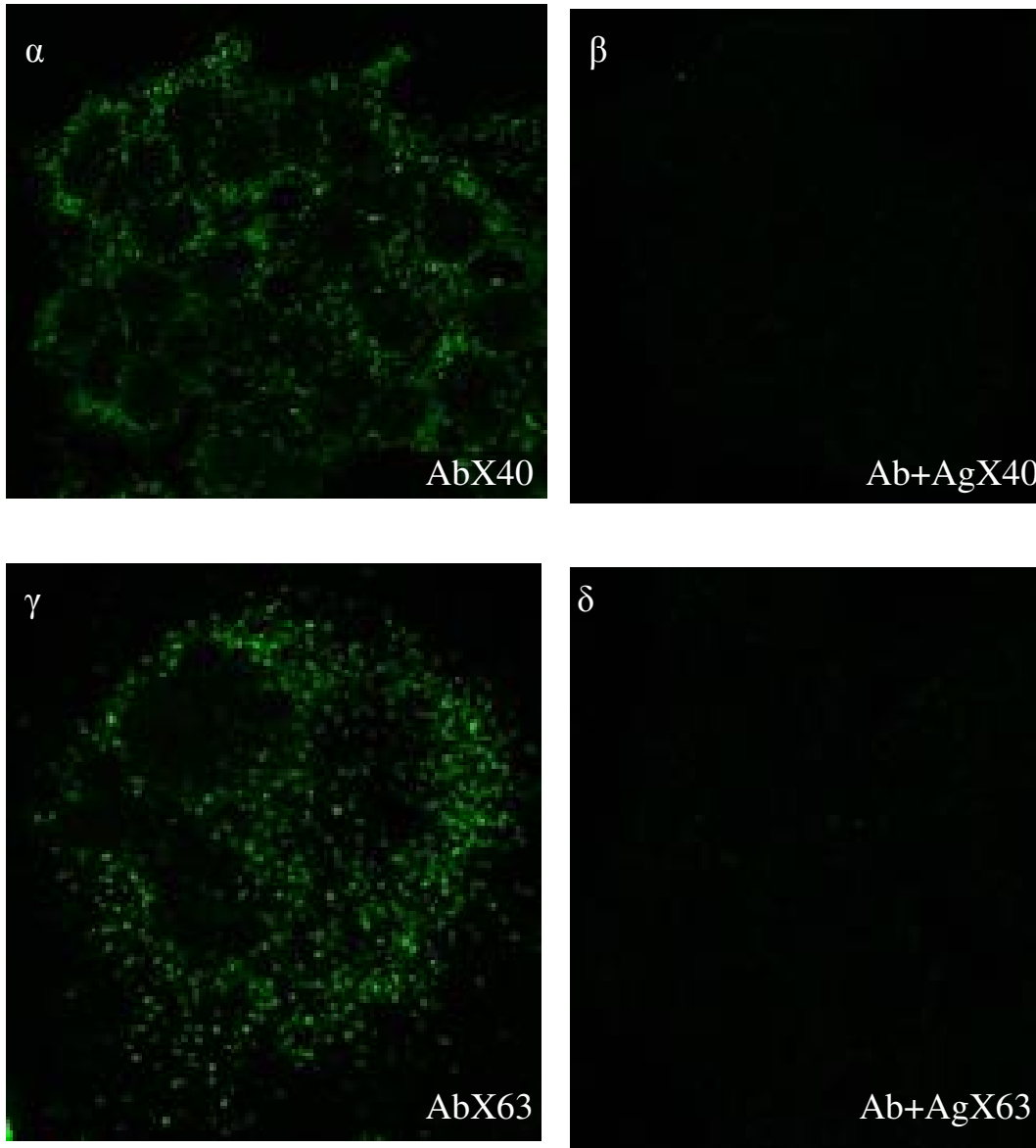
Το σήμα του  $sst_3$  ήταν διάχυτα κυτταροπλασματικό, περισσότερο ομοιογενές από εκείνο του  $sst_2$  (Εικόνες 8α και 8γ). Χαρακτηριστικό αυτού του υποδοχέα ήταν πως η περιπυρηνική χρώση ήταν πιο έντονη. Το σήμα εξαφανιζόταν όταν το αντίσωμα προεπώζονταν με το αντίστοιχο συνθετικό πεπτίδιο (Εικόνες 8β και 8δ).



**Εικόνα 8.** Ανίχνευση των υποδοχέων  $sst_3$  με μικροσκοπία συνεστίασης και ανοσοφθορισμό στα κύτταρα HepG2. (α) και (β) μεγέθυνση X20, (γ) και (δ) μεγέθυνση X63.

### 1.2.3. Ανίχνευση υποδοχέα *sst*<sub>5</sub>

Τέλος, ο *sst*<sub>5</sub> ήταν κατά ένα μεγάλο μέρος κυτταροπλασματικά εντοπισμένος, όπως και ο *sst*<sub>2</sub> (Εικόνες 9α και Α-9γ). Ωστόσο το σήμα είχε την μορφολογία στικτών σωματιδίων συσσώρευσης του αντιγόνου, δίχως να υπάρχει χρώση στην περιοχή του πυρήνα. Το σήμα εξαφανιζόταν όταν το αντίσωμα προεπωάζονταν με το αντίστοιχο συνθετικό πεπτίδιο (Εικόνες 9β και 9δ).



**Εικόνα 9.** Ανίχνευση των υποδοχέων *sst*<sub>5</sub> με μικροσκοπία συνεστίασης και ανοσοφθορισμό στα κύτταρα HepG2. (α) και (β) μεγέθυνση X40, (γ) και (δ) μεγέθυνση X63.



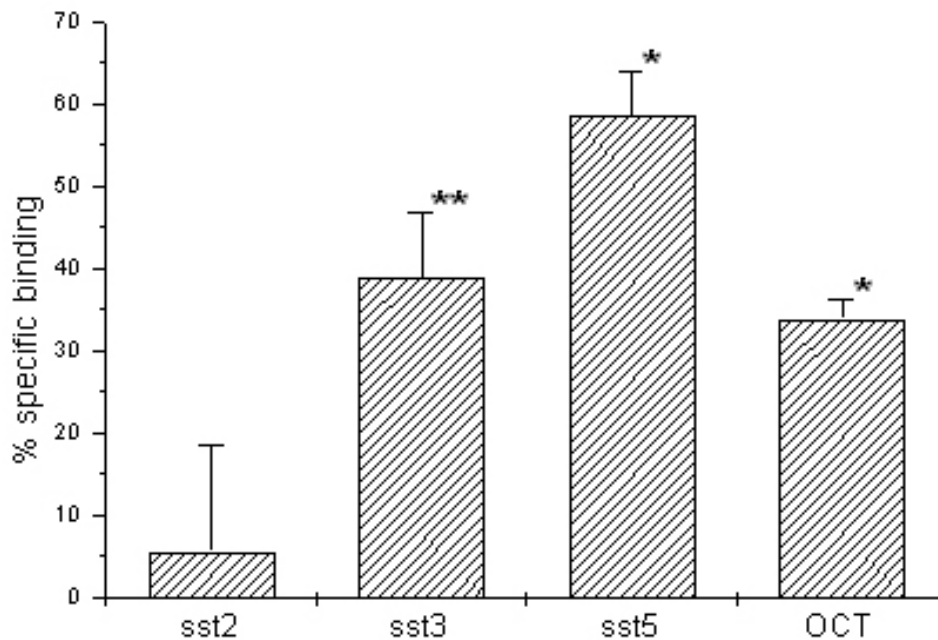
### 1.3. Ανίχνευση λειτουργικών θέσεων σύνδεσης ssts στις μεμβράνες των κυττάρων HepG2 με δοκιμασίες δέσμευσης ραδιενεργού SRIF.

Η κυτταροπλασματική εντόπιση των υποδοχέων δημιούργησε ερωτηματικά ως προς το μηχανισμό μέσω του οποίου η σωματοστατίνη και τα ανάλογα θα μπορούσαν να ενεργοποιούν τους υποδοχείς που φαινόταν να βρίσκονται κυρίως ενδοκυττάρια. Οι εικόνες του ανοσοφθορισμού δεν έδωσαν μια σαφή εικόνα μεμβρανικών ssts. Για να εξετάσουμε αυτό το φαινόμενο προχωρήσαμε σε δοκιμασίες δέσμευσης σε απομονωμένες μεμβράνες από κύτταρα HepG2.

Τα πειράματα αυτά θα μπορούσαν να μας παρέχουν στοιχεία για την ύπαρξη μεμβρανικών ssts καθώς και για τη λειτουργική κατάσταση αυτών. Η ειδική δέσμευση μετρήθηκε μετρώντας την εκτόπιση της  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$  παρουσία SRIF-14 ( $10^{-6}$  M), και αντιστοιχούσε σε  $39\pm 1\%$  της συνολικής σύνδεσης του ραδιενεργού. Τα μη ραδιενεργά ανάλογα της σωματοστατίνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα παρακάτω: MK-678, (ανάλογο με μεγαλύτερη συγγένεια για τους  $\text{sst}_2$  υποδοχείς), L-796,778 ( $\text{sst}_3$  ανάλογο) και L-817,818 (ανάλογο με μεγαλύτερη συγγένεια για τους  $\text{sst}_5$  υποδοχείς και μικροτερη για τους  $\text{sst}_1$ ) προκειμένου να υπολογιστεί το ποσοστό των περιοχών δέσμευσης που αντιστοιχούσε στον κάθε υπότυπο sst στις μεμβράνες των κυττάρων HepG2.

Οι ειδικές θέσεις πρόσδεσης τύπου  $\text{sst}_2$  αντιστοιχούσαν μόνο σε  $5\pm 12\%$  της ειδικής πρόσδεσης ενώ οι τύπου  $\text{sst}_3$  και  $\text{sst}_5$  αντιστοιχούσαν σε  $39\pm 8\%$  και  $59\pm 5\%$  της ειδικής πρόσδεσης στις μεμβράνες των κυττάρων HepG2 (Εικόνα 10). Το άθροισμα της δεσμευτικής ικανότητας σε θέσεις τύπου  $\text{sst}_3$  και  $\text{sst}_5$  αποτελούσαν συνολικά σχεδόν το 100% της ειδικής δέσμευσης της ραδιενεργού SRIF, και από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι ελάχιστοι υποδοχείς του υποτύπου  $\text{sst}_2$  υπάρχουν στις μεμβράνες των κυττάρων HepG2 όταν αυτά βρίσκονται σε ηρεμία και σε στέρηση ορού.

Η οκτρεοτίδη ( $10^{-6}\text{M}$ ) προσδενόταν επίσης σε αυτούς τους υποδοχείς και εμπόδιζε την ειδική πρόσδεση της ραδιενεργού σωματοστατίνης κατά  $34\pm 2\%$ .



**Εικόνα 10.** Δοκιμασίες δέσμευσης ραδιενεργού SRIF σε απομονωμένες μεμβράνες κυττάρων HepG2. Οι ειδικές θέσεις πρόσδεσης τύπου sst<sub>2</sub> αντιστοιχούσαν μόνο σε 5±12% (μή στατιστικά σημαντικό) της ειδικής πρόσδεσης ενώ οι τύπου sst<sub>3</sub> και sst<sub>5</sub> αντιστοιχούσαν σε 39±8% (p<0,05) και 59±5% (p<0,01) της ειδικής πρόσδεσης της ραδιενεργού SRIF στις μεμβράνες των κυττάρων HepG2. Η ειδική πρόσδεση της οκτρεοτίδης στις μεμβρανικές θέσεις ssts των κυττάρων HepG2 ήταν επίσης σημαντική (34.6 2%, p < 0,01). Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν πέντε φορές εις διπλούν. \* p<0:01 \*\* p<0:05 σε σχέση με την μη ειδική πρόσδεση.

### Συμπεράσματα

- Τα κύτταρα HepG2 σε κατάσταση ηρεμίας και στέρησης ορού εκφράζουν mRNA για τους υποδοχείς sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> και sst<sub>5</sub>.
- Ο υποδοχέας sst<sub>2</sub> είναι υποτύπου sst<sub>2A</sub>.
- Οι υποδοχείς σωματοστατίνης στα κύτταρα HepG2 είναι κυρίως ενδοκυττάριοι, με διαφορετικά μοντέλα κατανομής ο καθένας.
- Στην μεμβράνη των κυττάρων υπάρχουν λειτουργικοί υποδοχείς σωματοστατίνης των τύπων sst<sub>3</sub> και sst<sub>5</sub>.

## 2. Επίδραση της οκτρεοτίδης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2.

Το γεγονός ότι η οκτρεοτίδη προσδένεται στους υποδοχείς σωματοστατίνης που φέρουν τα κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2, επέτρεπε την εκτίμηση ότι η οκτρεοτίδη θα είχε κάποιου είδους βιολογικό αποτέλεσμα πάνω σε αυτά τα κύτταρα. Το βιολογικό αποτέλεσμα που μας ενδιέφερε για την *in vitro* επιβεβαίωση των μελετών των Kouroumalis και συν. ήταν η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές που επιτυγχάνονταν με την χορήγηση οκτρεοτίδης σε ασθενείς με ΗΚΚ.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24 πηγαδιών σε μια αρχική πυκνότητα  $2 \times 10^4$  κυττάρων, με 1,0 ml θρεπτικού υλικού ανά πηγαδάκι. Όλες οι ουσίες προστέθηκαν μια ημέρα μετά από την έναρξη της καλλιέργειας των κυττάρων (που θεωρήθηκε η ημέρα 0), προκειμένου να εξασφαλιστεί ομοιόμορφη πρόσκληση των κυττάρων στις πλάκες στην αρχή των πειραμάτων. Τα κύτταρα αφέθηκαν να πολλαπλασιαστούν για συνολικά 6 ημέρες, με μια αλλαγή του θρεπτικού υλικού και της οκτρεοτίδης την ημέρα 3. Μετά από έξι ημέρες επώασης με συγκεντρώσεις οκτρεοτίδης από  $10^{-12}$ M έως  $10^{-6}$ M, που αντιστοιχούσε σε 2-3 διπλασιασμούς των κυττάρων, έγινε μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με την μέθοδο του MTT. Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν τουλάχιστον τρεις φορές σε τριπλέτες. \*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.05$ .

Παρατηρήθηκε μια δόσοεξαρτώμενη αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HepG2 με  $IC_{50}$   $1.25 \times 10^9$ M (Εικόνα 11 και Πίνακας 14). Η οκτρεοτίδη σε συγκεντρώσεις της τάξης  $10^{-8}$ M και  $10^{-7}$ M (συμβατές με τις συγκεντρώσεις που αναμένονται στο αίμα των ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία με οκτρεοτίδη) μείωσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κατά  $54,5 \pm 5,8\%$  ( $p < 0.001$ ) και  $42,3 \pm 1,7\%$  ( $p < 0.001$ ) αντίστοιχα σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου.

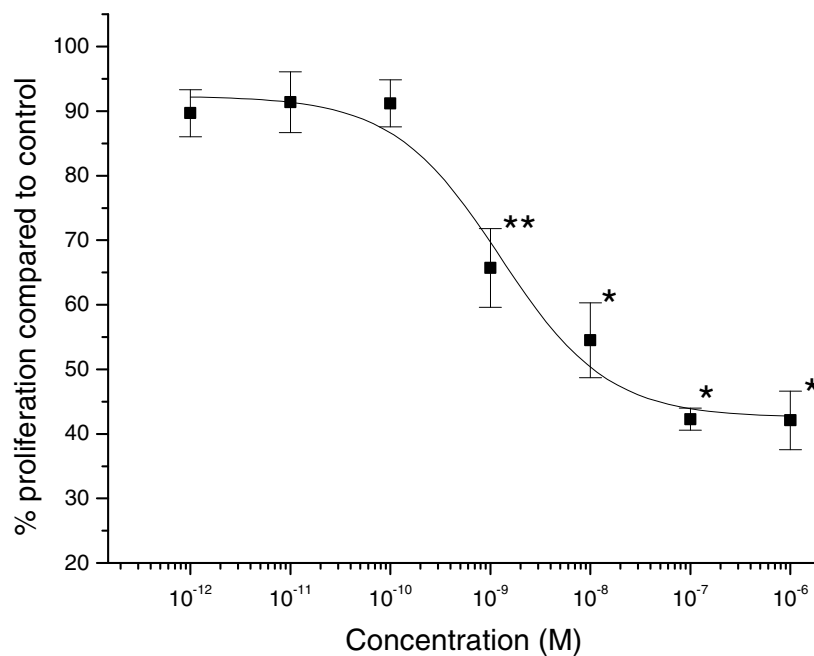
### Συμπέρασμα

- Η οκτρεοτίδη αναστέλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο και σε συγκεντρώσεις που μπορούν να επιτευχθούν στο αίμα ασθενών που λαμβάνουν αγωγή με οκτρεοτίδη για την θεραπεία ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

Πίνακας 14.

Οκτρεοτίδη	Ποσοστό ζώντωνκυττάρων	Standard Error
∅	100	2,08
$10^{-12}$ M	89,67	3,63
$10^{-11}$ M	91,40	4,70
$10^{-10}$ M	91,21	3,65
$10^{-09}$ M	65,73	6,10
$10^{-08}$ M	54,52	5,79
$10^{-07}$ M	42,28	1,71
$10^{-06}$ M	42,11	4,54

Antiproliferative effect of Octreotide on HepG2 cells



**Εικόνα 11.** Αντιπλλασιαστική επίδραση της οκτρεοτίδης στα κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2 ( $IC_{50}$   $1.25 \times 10^9$ M). \*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.05$  σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.

### 3. Μελέτη του ρόλου των Πρωτεϊνικών Φωσφοτυροσινικών Φωσφατασών (PTPs) στην αντιπολλαπλασιαστική δράση της οκτρεοτίδης στα κύτταρα HepG2.

Επόμενο βήμα της μελέτης μας ήταν η αναζήτηση των ενδοκυττάρων μονοπατιών μέσω των οποίων ρυθμιζόταν η αντιπολλαπλασιαστική δράση της οκτρεοτίδης. Έχει αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών Φωσφοτυροσινικών Φωσφατασών (PTPs) είναι ένας από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων η σωματοστατίνη και τα ανάλογά της εκτελούν τα αντιπολλαπλασιαστικά τους αποτελέσματα (345). Το φαινόμενο αυτό έχει περιγραφεί σε διάφορα πειραματικά μοντέλα καρκίνου όπως μαστού (519), προστάτη (520), θυροειδούς (305;308) και παγκρέατος (307;521;522).

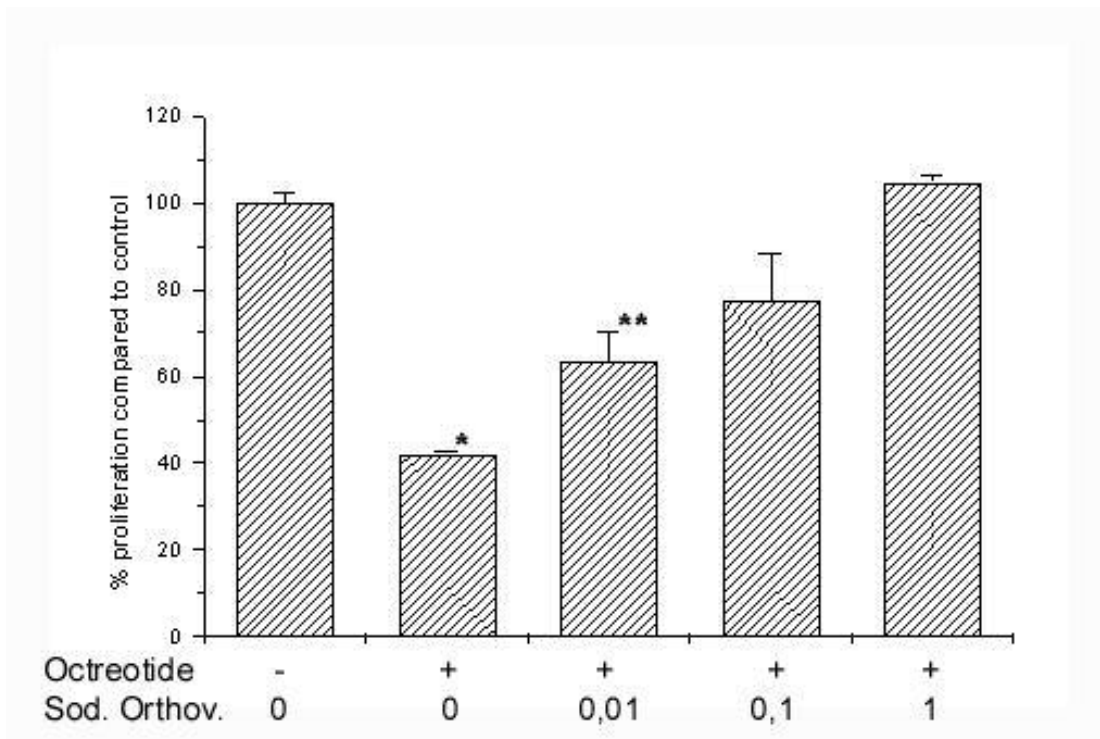
Προκειμένου να ερευνήσουμε εάν οι PTPs περιλαμβάνονται στο ενδοκυττάριο μονοπάτι που ρυθμίζει την αντιπολλαπλασιαστική επίδραση της οκτρεοτίδης στα κύτταρα HepG2, μελετήσαμε εάν ο αποκλεισμός των PTPs θα μπορούσε να αντιστρέψει την αντιπολλαπλασιαστική επίδραση της οκτρεοτίδης.

Πράγματι, το sodium orthovanadate, ένας αναστολέας των PTPs, προκάλεσε μια δόσοεξαρτώμενη μείωση της επίδρασης της οκτρεοτίδης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 (Πίνακας 15 και Εικόνα 12). Η επίδραση της οκτρεοτίδης αντιστράφηκε εντελώς με 1  $\mu\text{M}$  sodium orthovanadate, το οποίο από μόνο του δεν είχε καμία επίδραση στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Πίνακας 15.

Οκτρεοτίδη	Sodium Orthovanadate	Ποσοστό ζώντων κυττάρων	Standard Error
$\emptyset$	$\emptyset$	100	2,08
$10^{-7}$	$\emptyset$	42,10	0,71
$10^{-7}$	0,01 $\mu\text{M}$	63,42	6,83
$10^{-7}$	0,1 $\mu\text{M}$	77,47	11,02
$10^{-7}$	1 $\mu\text{M}$	104,62	1,49





**Εικόνα 12.** Ο μη ειδικός αναστολέας των Φωσφοτυροσινικών Φωσφατασών sodium orthovanadate, ανέστειλε την αντιπολλαπλασιαστική επίδραση της οκτρεοτίδης ( $10^{-7}$ M) με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. \*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  σε σχέση με τα κύτταρα μάρτηρες.

### Συμπέρασμα

- Η αναστολή του μονοπατιού των Πρωτεϊνικών Φωσφοτυροσινικών Φωσφατασών (PTPs) αναστέλει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο το αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της οκτρεοτίδης.

#### **4. Μελέτη της παραγωγής φυσικών σωματοστατινεργικών πεπτιδίων από τα κύτταρα HepG2**

Το γεγονός ότι οι υποδοχείς σωματοστατίνης ανευρέθησαν με ανοσοφθορισμό να βρίσκονται κυρίως ενδοκυττάρια, με διατήρηση όμως θέσεων πρόσδεσης, κυρίως των υποτύπων  $sst_3$  και  $sst_5$  στην κυτταρική μεμβράνη, όπως ανευρέθησαν με της δοκιμασίες δέσμευσης δημιούργησε ένα μεγάλο ερωτηματικό σχετικά με τους υποκείμενους μηχανισμούς που οδηγούσαν σε αυτά τα φαινόμενα.

Στον εγκέφαλο αρουραίων έχει βρεθεί ότι περιοχές με υψηλά επίπεδα τοπικής ενδογενούς σωματοστατίνης περιέχουν υψηλά επίπεδα ενδοκυτταρικών υποδοχέων  $ssts$  σε σχέση με περιοχές που δεν εκφράζουν αυτό το πεπτίδιο (523). Επίσης σε μια άλλη ανοσοϊστοχημική μελέτη, παρατηρήθηκε κυτταροπλασματικός εντοπισμός των υποδοχέων σωματοστατίνης σε ανθρώπινους νευρικούς και νευροενδοκρινικούς όγκους με υψηλό επίπεδο έκφρασης του γονιδίου της σωματοστατίνης, ενώ μεμβρανική εντόπιση παρατηρούνταν σε όγκους που στερούνταν έκφρασης αυτού του mRNA (524). Επομένως, η ενδοκυτταρική κατανομή των υποδοχέων των  $ssts$  στα κύτταρα HepG2 θα μπορούσε να αποδοθεί στην ενδογενή παραγωγή ενός σωματοστατινεργικού πεπτιδίου, διαδικασία που θα υποδήλωνε ένα αυτοκρινές σύστημα ελέγχου της εσωτερικοποίησης των υποδοχέων σωματοστατίνης.

##### **4.1. Μέτρηση της ανοσοδραστικότητας τύπου σωματοστατίνης στα κύτταρα HepG2**

Ειδικά κατεργασμένα και λυοφιλοποιημένα δείγματα κυττάρων HepG2 χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ραδιοανοσοανίχνευσης με την χρήση αντι-ορού κουνελιών ο οποίος είχε αναπτυχθεί για την ανίχνευση της οβαλβουμίνης που συνδέεται με την SRIF-14 (517). Η  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$  χρησιμοποιήθηκε ως ραδιενεργός ανιχνευτής η παρεκτόπιση της οποίας θα σήμαινε την παρουσία σωματοστατινεργικού πεπτιδίου στα δείγματά μας. Η δοκιμασία αυτή απέβει θετική και επομένως θεωρήθηκε ότι τα κύτταρα HepG2 παράγουν κάποιο σωματοστατινεργικό πεπτίδιο.

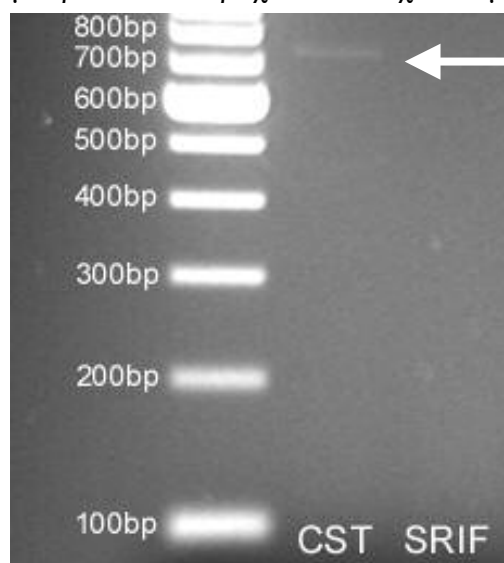
#### 4.2. Ανίχνευση του mRNA των φυσικών σωματοστατινεργικών πεπτιδίων SRIF και CST με PCR

Η έκφραση του mRNA της SRIF και της CST στα κύτταρα HepG2 που βρίσκονταν σε ηρεμία και είχαν τεθεί σε στέρηση ορού εμβρύου βοός, έγινε με RT-PCR με ειδικούς primers.

Μελετήθηκαν τουλάχιστον 3 διαφορετικά δείγματα που ελήφθησαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και στα οποία έγινε επεξεργασία απομόνωσης RNA και ανάστροφης μεταγραφής ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Τα αποτελέσματα ήταν πανομοιότυπα σε όλα τα πειράματα. Παράλληλα εκτελέστηκε PCR με RNA στο οποίο δεν είχε γίνει ανάστροφη μεταγραφή με σκοπό τον περαιτέρω έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης.

Η RT-PCR ανέδειξε την απουσία mRNA σωματοστατίνης σε αυτά τα κύτταρα. Το αποτέλεσμα αυτό μας οδήγησε στο να εξετάσουμε την τυχόν έκφραση κορτιστατίνης, δεδομένου ότι το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες RIA πιθανόν να αναγνώριζε τόσο την σωματοστατίνη όσο και την κορτιστατίνη.

Στα κύτταρα HepG2 ανευρέθη έκφραση mRNA της CST όπως φαίνεται στην Εικόνα 13. Το προϊόν της PCR μεγέθους 701bp αντιστοιχεί στο mRNA της CST μετά την μεταμεταγραφική επεξεργασία του και την αφαίρεση των ιντρονίων (263;525;525), γεγονός που επιβεβαιώνει την έκφραση CST στα κύτταρα HepG2, δεδομένου ότι το προϊόν αυτό δεν θα μπορούσε να παραχθεί από τυχόν επιμόλυνση με γενομικό DNA.

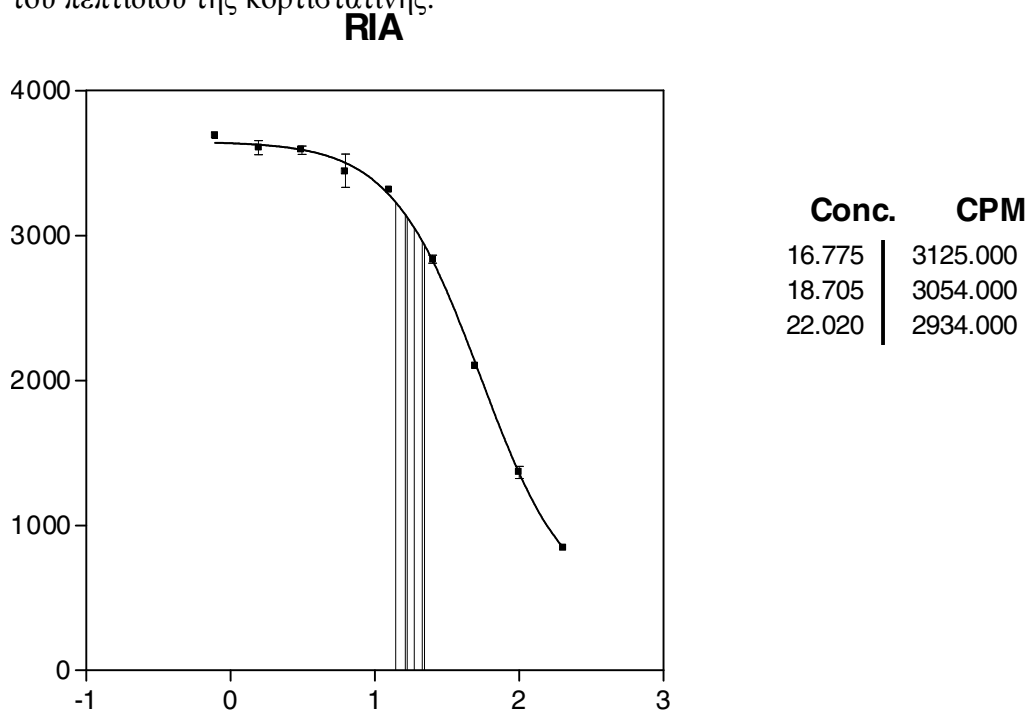


**Εικόνα 13.** Έκφραση CST αλλά όχι SRIF παρατηρήθηκε στα κύτταρα HepG2



### 4.3. Ποσοτικοποίηση της παραγωγής CST από τα κύτταρα HepG2

Το εύρημα της έκφρασης μόνο CST και όχι SRIF, παρουσία σωματοστατινεργικής ανοσοδραστικότητας, υποδήλωνε ότι οι μετρήσεις με ραδιοανσοανίχνευση στην πραγματικότητα μετρούσαν CST και όχι SRIF. Νέες μελέτες RIA (Εικόνα 14) με τη χρήση CST-17 για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης επέτρεψαν την ποσοτικοποίηση της παραγόμενης ποσότητας CST από τα τα κύτταρα HepG2. Έτσι βρέθηκε ότι παράγουν  $1,13 \pm 0,07$  pgr CST/μgr πρωτεΐνης. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη παγκοσμίως μελέτη στην οποία έγινε δυνατή η ποσοτική μέτρηση του πεπτιδίου της κορτιστατίνης.



**Εικόνα 14.** Χαρακτηριστική πρότυπη καμπύλη και μετρήσεις CST-17, σε δείγματα από κύτταρα HepG2. Οι τιμές που προέκυπταν ανάγονταν σε μg ολικής πρωτεΐνης δείγματος.

#### Συμπεράσματα

- Τα κύτταρα HepG2 παράγουν το σωματοστατινεργικό πεπτίδιο κορτιστατίνη αλλά όχι σωματοστατίνη.
- Στην παραγωγή CST μπορεί να αποδοθεί η ενδοκυττάρια κατανομή των υποδοχέων σωματοστατίνης σε αυτά τα κύτταρα.

## **5. Τα κύτταρα HepG2 δεν φέρουν τον υποδοχέα MrgX2**

Η έκφραση και παραγωγή CST από τα κύτταρα HepG2 οδήγησε στο ερώτημα της τυχόν έκφρασης του υποδοχέα MrgX2. Πρόκειται για ένα ορφανό υποδοχέα, που περιγράφηκε πρόσφατα ότι έχει μεγάλη συγγένεια για την πρόσδεση της κορτιστατίνης (262). Δεν ανευρέθει με PCR η έκφραση mRNA του υποδοχέα MrgX2 στα κύτταρα HepG2.

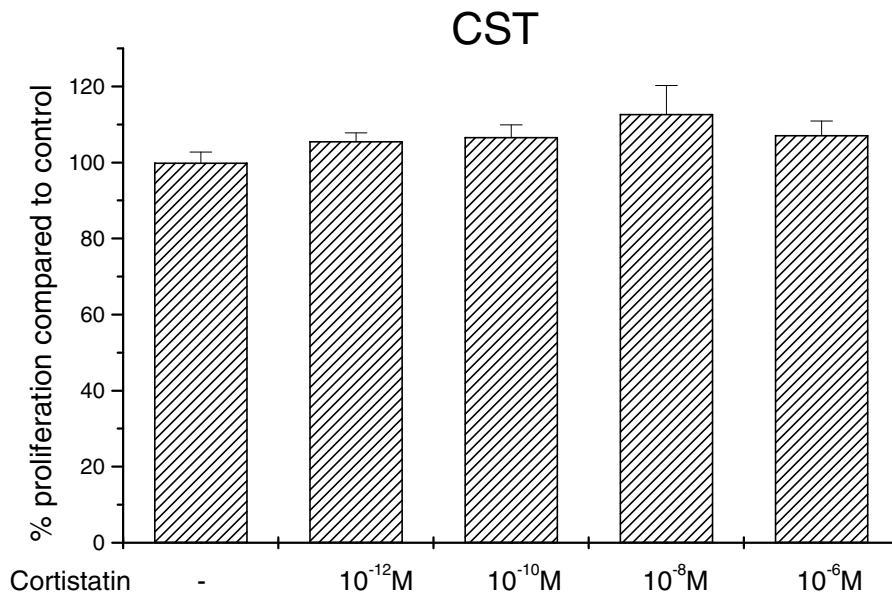
### **Συμπέρασμα**

- Τα κύτταρα δεν εκφράζουν τον υποδοχέα MrgX2

## 6. Ρόλος της κορτιστατίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2

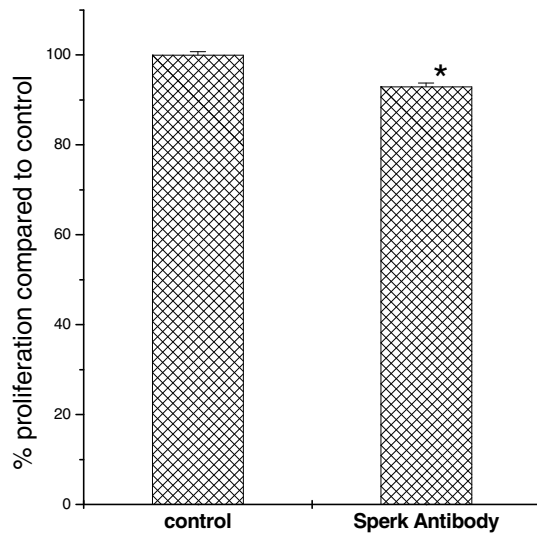
Μελετήσαμε τον ρόλο της CST17 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 τόσο επιδρώντας σε αυτά τα κύτταρα με εξωτερική χορήγηση αυτού του πεπτιδίου όσο και επιδρώντας στα κύτταρα με το αντίσωμα που δεσμεύει την CST και χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της ραδιοανοσοανίχνευσης του πεπτιδίου.

Η χορήγηση CST17 στα κύτταρα δεν είχε κάποια ιδιαίτερη επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 (Εικόνα 15). Μια μικρή αλλά στατιστικά μη σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού παρατηρούνταν σε συγκεντρώσεις  $10^{-8}\text{M}$  CST17 ( $112\pm 7\%$ ).



**Εικόνα 15.** Επίδραση της CST17 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2.

Η επίδραση όμως του αντισώματος του Sperk το οποίο δεσμεύει την CST είχε ως αποτέλεσμα μια στατιστικά σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων HepG2 κατά 7% περίπου ( $93\pm 0,7\%$  σε σχέση με τα control κύτταρα,  $p < 0,05$ ) (Εικόνα 16)



**Εικόνα 16.** Αποτέλεσμα της εξωκυττάριας δέσμευσης της CST που παράγουν τα κύτταρα HepG2Το στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. \*  $p < 0,05$ .

### **Συμπέρασμα**

- Η επιπλέον χορήγηση CST17 στα κύτταρα HepG2 δεν έχει επίδραση στον πολλαπλασιασμό τους.
- Η εξωκυττάρια δέσμευση όμως της CST που παράγουν αυτοκρινώς τα κύτταρα HepG2 οδηγεί σε μείωση του πολλαπλασιασμού τους, υποδεικνύοντας ένα πιθανό επαγωγικό ρόλο αυτού του πεπτιδίου στον πολλαπλασιασμό τους.

## 7. Επίδραση των οπιοειδών στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2

Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση των οπιοειδών στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2. Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν αγωνιστές υψηλής συγγένειας για τους διαφορετικούς οπιοειδείς υποδοχείς σε συγκεντρώσεις  $10^{-12}\text{M} - 10^{-6}\text{M}$ . Ως γενικός οπιοειδής ανταγωνιστής χρησιμοποιήθηκε η διπρενορφίνη σε συγκέντρωση  $10^{-6}\text{M}$ . Σε αυτή την συγκέντρωση, προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η διπρενορφίνη συνδέεται σε όλους τους τύπους των οπιοειδών υποδοχέων (342). Συγκεκριμένα, οι αγωνιστές που χρησιμοποιήθηκαν και οι υποδοχείς με τους οποίους συνδέεται ο καθένας είναι οι ακόλουθοι (515;516):

### Αγωνιστής

Αιθυλκετοκυκλαζοσίνη (EKC)

[D-ala2, D-leu5]-Εγκεφαλίνη (DADLE)

[D-Ala2, N-Me-Phe4, Gly5-ol]-Εγκεφαλίνη (DAGO)

### Υποδοχείς

μ, δ, κ1, κ2

μ, δ

μ

### Ανταγωνιστής

Διπρενορφίνη

μ, δ, κ1, κ2, κ3

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε σε αυτά τα πειράματα και ο οπιοειδής αγωνιστής aS1-casomorphine (aS1) που προέρχεται από την πρωτοταγή δομή της aS1 καζεΐνης (πενταπεπτίδιο με αλληλουχία Tyr-Val-Pro-Phe-Pro που βρίσκεται στο καρβοξυλικό τμήμα της (156-162)) και θα μπορούσε να απελευθερωθεί από τη δράση προτεολυτικών ενζύμων. Η aS1 προσδένεται με μεγάλη συγγένεια με τους υποδοχείς κ αλλά και με τους μ (446).

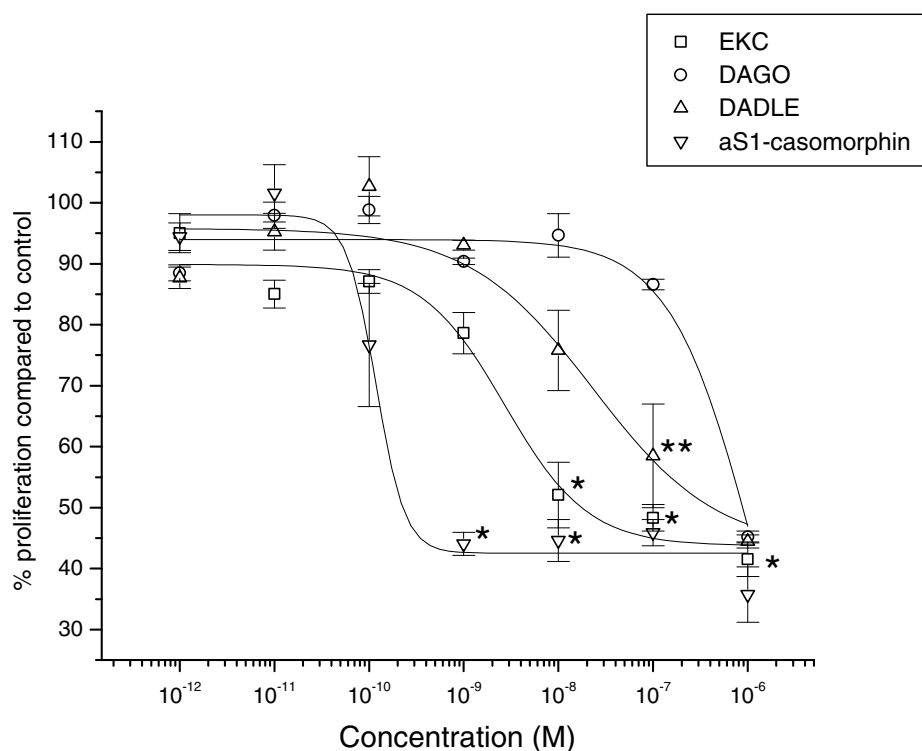
### Μελέτες μόνο με αγωνιστές

Στον πίνακα 16 και στην εικόνα 17 φαίνονται τα αποτελέσματα της επίδρασης. Η aS1 και η EKC ήταν οι οπιοειδείς αγωνιστές που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη στατιστικώς σημαντική καταστολή του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων HepG2. Η EKC και η aS1 ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 με  $IC_{50}$

$2,7 \times 10^{-9}$  και  $1,64 \times 10^{-10}$  αντίστοιχα. Το DADLE ανέστειλε επίσης τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 με  $IC_{50}$   $2,62 \times 10^{-8}$ . Τέλος το DAGO ήταν το πιο αδύναμο οπιοειδές σε σχέση με τα άλλα και ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 αλλά μόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ( $IC_{50}$   $1,2 \times 10^{-6} M$ ).

### Πίνακας 16.

Οπιοειδής αγωνιστής	$IC_{50}$ (nM)	Μέγιστη αναστολή πολλαπλασιασμού
EKC	$2,7 \pm 1,41$	$56,27 \pm 4,03$
DADLE	$26,2 \pm 30,1$	$56,77 \pm 14,8$
DAGO	$1200 \pm 227$	$54,18 \pm 3,08$
aS1	$0,12 \pm 0,14$	$57,47 \pm 3,12$



**Εικόνα 17.** Αντιπολλαπλασιαστική επίδραση των οπιοειδών EKC, DAGO, DADLE και aS1 στα κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2. \*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.05$  σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.

Μελέτες με συνδυασμό οπιοειδούς αγωνιστή και ανταγωνιστή

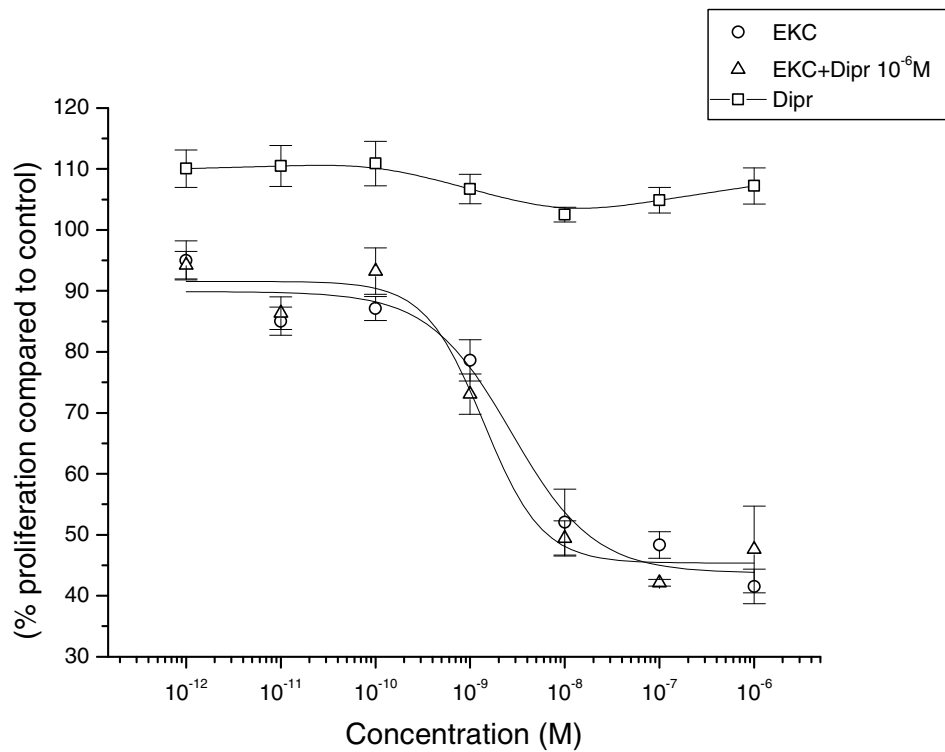
Με σκοπό να μελετήσουμε το αν η δράση των οπιοειδών στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 εκτελούνταν μέσω των υποδοχέων οπιοειδών μελετήσαμε την επίδραση του συνδυασμού της ΕΚC με τον γενικό αναστολέα των οπιοειδών διπρενορφίνη στον πολλαπλασιασμό των κύτταρων αυτών.

Το αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της ΕΚC δεν μπορούσε να ανασταλεί από την διπρενορφίνη Εικόνα 18 και Πίνακας 17. Η διπρενορφίνη ( $10^{-6}$ ) δεν είχε από μόνη της καμία επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2.

Η ΕΚC είναι ένα οπιοειδές πεπτίδιο το έχει την ιδιότητα να προσδένεται στους υποδοχείς  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa_1$  και  $\kappa_2$ . Η διπρενορφίνη προσδένεται σε όλους αυτούς τους υποδοχείς και παρεμποδίζει την δράση των αγωνιστών. Κατά συνέπεια το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να σημαίνει ότι η δράση της ΕΚC δεν σχετιζόταν με την πρόσδεσή της σε υποδοχείς οπιοειδών.

**Πίνακας 17.**

Οπιοειδής αγωνιστής	IC <sub>50</sub> (nM)	Μέγιστη αναστολή πολλαπλασιασμού
ΕΚC	2,7±1,41	56,27±4,03
ΕΚC+Διπρενορφίνη	1,38±0,5	54,64±32,3



**Εικόνα 18.** Η Διπρενορφίνη δεν ανασταλεί το αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της EKC.

### Συμπεράσματα

- Τα οπιοειδή αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2.
- Η EKC και aS1 ήταν τα πιο δραστικά οπιοειδή.
- Η αντιπολλαπλασιαστική δράση της EKC δεν αναστέλλονταν από τον γενικό αναστολέα των οπιοειδών διπρενορφίνη



## **8. Μελέτη της έκφρασης και παρουσίας υποδοχέων οπιοειδών στην κυτταρική σειρά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2**

Η αδυναμία αναστολής της δράσης της ΕΚC στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων από την διπρενορφίνη δημιούργησε το ερώτημα της παρουσίας υποδοχέων οπιοειδών στα κύτταρα HepG2. Αν υπήρχαν υποδοχείς οπιοειδών θα έπρεπε υψηλές δόσεις διπρενορφίνης να μπορούν να αναστείλουν το αποτέλεσμα της ΕΚC δεδομένου ότι υπάρχει σχεδόν πλήρης αλληλοκάλυψη των οπιοειδών υποδοχέων στους οποίους μπορούν να επιδράσουν. Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα μελετήσαμε την τυχόν έκφραση του mRNA των κλωνοποιημένων υποδοχέων οπιοειδών με RT-PCR, καθώς και την ύπαρξη λειτουργικών υποδοχέων οπιοειδών στα κύτταρα αυτά με δοκιμασίες δέσμευσης.

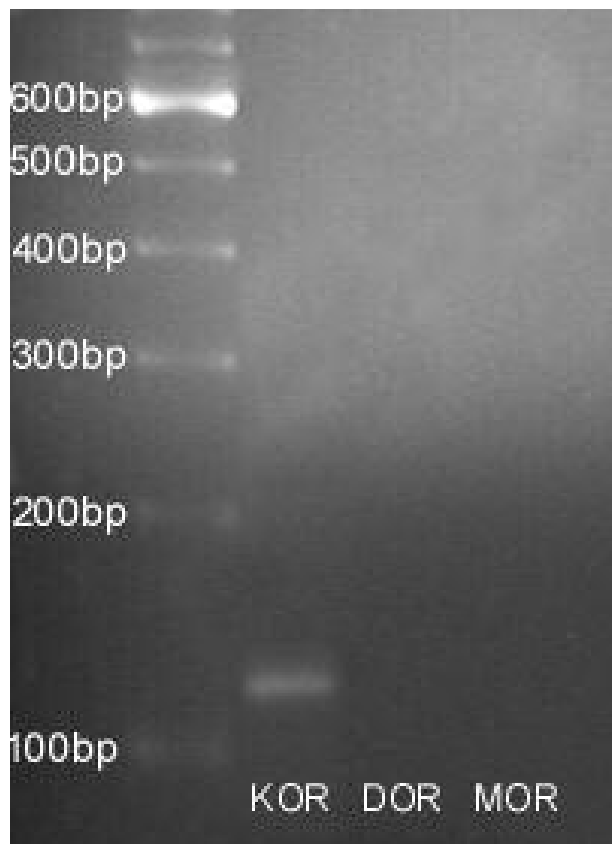
### **8.1. Ανίχνευση έκφρασης του mRNA των υποδοχέων οπιοειδών με RT-PCR.**

Η έκφραση του mRNA των κλωνοποιημένων υποδοχέων οπιοειδών στα κύτταρα HepG2 που βρίσκονταν σε ηρεμία και είχαν τεθεί σε στέρηση ορού εμβρύου βοός, έγινε με RT-PCR με ειδικούς primers (Πίνακας Y-I). Οι primers για τον KOR και τον MOR επιλέχτηκαν από την τράπεζα δεδομένων NCBI UNISTS. Οι primers για τον DOR σχεδιάστηκε με το λογισμικό primer3. Αξίζει να σημειωθεί ότι θεωρείτε ότι ο KOR αντιστοιχεί στον  $\kappa_1$ , ο DOR στον  $\delta_2$  ενώ ο MOR αντιστοιχεί στους  $\mu_1$  και  $\mu_2$ .

Μελετήθηκαν τουλάχιστον 3 διαφορετικά δείγματα που ελήφθησαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και στα οποία έγινε επεξεργασία απομόνωσης RNA και ανάστροφης μεταγραφής ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Τα αποτελέσματα ήταν πανομοιότυπα σε όλα τα πειράματα. Παράλληλα εκτελέστηκε PCR με RNA στο οποίο δεν είχε γίνει ανάστροφη μεταγραφή με σκοπό τον περαιτέρω έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης με γενομικό DNA.

Στα κύτταρα HepG2, ανευρέθηκε με RT-PCR, ότι παράγουν σε συνθήκες ηρεμίας και στέρησης ορού mRNA μόνο για τον KOR υποδοχέα οπιοειδών ενώ δεν ανιχνεύθηκε η έκφραση των υποτύπων DOR και MOR (Εικόνα 19). Σε κανένα από τα δείγματα στα οποία είχε γίνει επεξεργασία με DNάση αλλά δεν είχε γίνει ανάστροφη μεταγραφή, δεν

εμφανίστηκε σήμα, επιβεβαιώνοντας την καθαρότητα των δειγμάτων και την απουσία επιμόλυνσης από γενομικό DNA.



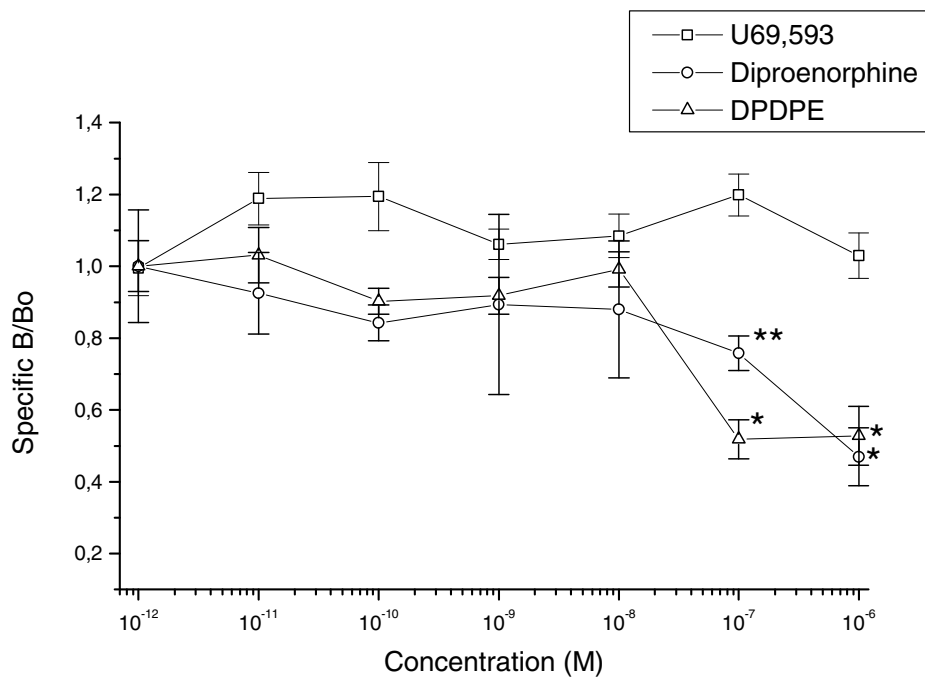
**Εκόνα 19.** Έκφραση των κλωνοποιημένων υποδοχέων οπιοειδών από τα κύτταρα HepG2.

## 8.2. Ανίχνευση των υποδοχέων οπιοειδών με δοκιμασίες δέσμευσης

Η ανίχνευση mRNA του υποδοχέα KOR θα μπορούσε να σημαίνει ότι η ΕΚC δρα μέσω του υποδοχέα  $\kappa_1$  για να ασκήσει το αντιπολλαπλασιαστικό της αποτέλεσμα στα κύτταρα HepG2. Ωστόσο η διπρενορφίνη όφειλε να αναστείλει το φαινόμενο, έστω και μερικώς, διότι έχει και αυτή την ιδιότητα να προσδένεται στον  $\kappa_1$ . Έτσι προχωρήσαμε σε δοκιμασίες δέσμευσης τόσο για να ελέγξουμε το αποτέλεσμα της PCR, όσο και για να μελετήσουμε την τυχόν ύπαρξη υποδοχέων των τάξεων  $\kappa_2$ ,  $\kappa_3$ , και  $\delta_1$  τα γονίδια των οποίων δεν έχουν αναγνωριστεί ακόμα.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων προσδιορίστηκε το επί της εκατό ποσοστό της ειδικής δέσμευσης του ραδιοσημασμένου αναλόγου (%SB, percent of specific binding) παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων του μη ραδιοσημασμένου πεπτιδίου (Εικόνα 20).

Το οπιοειδές U-69,593 δεν συνδέθηκε ειδικά σε καμία από τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν. Δεδομένου ότι πρόκειται για είναι εξαιρετικά ειδικό αγωνιστή του υποδοχέα  $\kappa_1$  η απουσία θέσεων ειδικής πρόσδεσης αυτού του οπιοειδούς δείχνει απουσία του υποδοχέα αυτού, αν και τα κύτταρα εξέφραζαν mRNA για αυτόν. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται σε μεταμεταγραφικές διαδικασίες που δεν επιτρέπουν την παραγωγή της λειτουργικής πρωτεΐνης. Εντούτοις για το DPDPE που είναι ένας  $\delta$ -ειδικός αγωνιστής αναγνωρίστηκαν περιοχές μέτριας προς χαμηλής συγγένειας ( $IC_{50}=4,15 \times 10^{-8}$  M). Τέλος για τη διπρενορφίνη που προσδένεται στους υποδοχείς  $\delta$ ,  $\mu$  αλλά και  $\kappa_2$  και  $\kappa_3$  αναγνωρίστηκαν περιοχές χαμηλής συγγένειας πρόσδεσης ( $IC_{50}=2,17 \times 10^{-6}$  M). Συνολικά τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την πιθανή ύπαρξη λειτουργικών υποδοχέων της τάξης  $\delta$  στα κύτταρα HepG2. Το γεγονός της απουσίας έκφρασης του υποδοχέα  $\delta$  στα κύτταρα HepG2, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο κλωνοποιημένος υποδοχέας εκτιμάται ότι είναι ο  $\delta_2$  υποδηλώνει, ότι τα κύτταρα HepG2 φέρουν υποδοχείς  $\delta_2$ . Με τα υπάρχοντα δεδομένα δεν μπορεί να αποκλειστεί η παρουσία υποδοχέων των υποτύπων  $\kappa_2$  και  $\kappa_3$ .



**Εικόνα 20.** Αποτελέσματα των δοκιμασιών δέσμευσης των οπιοειδών πεπτιδίων Διπρενορφίνη, DPDPE και U69,593 στα κύτταρα HepG2

### Συμπεράσματα

- Τα κύτταρα HepG2 εκφράζουν mRNA για τον υποδοχά KOR, δίχως όμως να ανιχνεύονται με δοκιμασίες δέσμευσης θέσεις πρόδεσης τύπου κ<sub>1</sub>.
- Επίσης φέρουν λειτουργικούς υποδοχείς δ. Απουσία mRNA του DOR που αντιστοιχεί στον υπόδοχά δ<sub>2</sub>, οι υποδοχείς της υποκατηγορίας δ των κυττάρων HepG2 πιθανότατα ανήκουν στην υποκατηγορία δ<sub>1</sub>.
- Δεν μπορεί να αποκλειστεί η παρουσία υποδοχέων των υποτύπων κ<sub>2</sub> και κ<sub>3</sub>.
- Τέλος τα κύτταρα HepG2 δεν εκφράζουν mRNA του υποδοχά μ (για τον οποίο το κλωνοποιημένο γονίδιο κωδικοποιεί και για τους μ<sub>1</sub> και μ<sub>2</sub>). Αν μάλιστα κρίνουμε σε συνδυασμό με το βιολογικό αποτέλεσμα του DAGO, το οποίο παρατηρήθηκε σε συγκεντρώσεις πολύ υψηλότερες από εκείνες στις οποίες θα αναμενόταν αν υπήρχαν ειδικοί υποδοχείς μ, μπορούμε να εκτιμήσουμε ότι στα κύτταρα HepG2 απουσιάζουν οι υποδοχείς μ.

## 9. Μελέτη της αλληλεπίδρασης του οπιοειδούς πεπτιδίου EKC με τους υποδοχείς σωματοστατίνης στα κύτταρα HepG2.

Η αδυναμία αναστολής της δράσης της EKC στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων από την διπρενορφίνη σε συνδυασμό με παρουσία μόνο χαμηλής συγγένειας υποδοχέων οπιοειδών στα κύτταρα HepG2, δημιουργούσε υποψίες περί της δράσης της EKC μέσω των υποδοχέων σωματοστατίνης. Πρόσδεση των οπιοειδών στους ssts και μάλιστα άσκηση της ανασταλτικής δράσης τους μέσω αυτών στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων έχει πρωτοπεριγραφεί στην κυτταρική σειρά από μαστό T47D (446;483-485). Έκτοτε έχει περιγραφεί αυτό το φαινόμενο και με άλλα οπιοειδή πεπτίδια σε άλλα συστήματα (447;504).

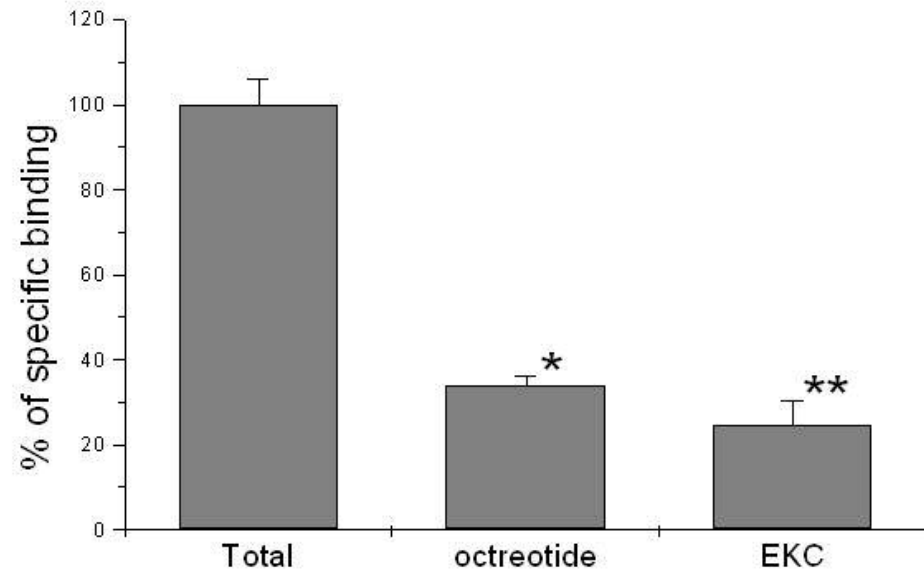
Για να εξετάσουμε αυτό το φαινόμενο προχωρήσαμε σε δοκιμασίες δέσμησης της EKC σε απομονωμένες μεμβράνες από κύτταρα HepG2, ελέγχοντας την ικανότητά της να παρεκτοπίζει την  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$  από τις θέσεις ειδικής δέσμησης αυτής.

Η EKC ( $10^{-6}\text{M}$ ) ανευρέθη ότι προσδένεται ειδικά στους υποδοχείς σωματοστατίνης εμποδίζοντας την ειδική πρόσδεση της ραδιενεργού σωματοστατίνης κατά  $24,56\pm 5,90\%$  (Εικόνα 21). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν συγκρίσιμο με αυτό της οκτρεοτίδης.

Επομένως η EKC θα μπορούσε να ασκεί το αντιπολλαπλασιαστικό της αποτέλεσμα μέσω των υποδοχέων σωματοστατίνης. Με τον τρόπο αυτό ερμηνεύεται και η αδυναμία αναστολής του αποτελέσματός της στα κύτταρα HepG2 από την διπρενορφίνη.

### Συμπέρασμα

- Η EKC προσδένεται ειδικά στους υποδοχείς σωματοστατίνης των κυττάρων HepG2 και πιθανώς ασκεί το αντιπολλαπλασιαστικό της αποτέλεσμα μέσω αυτών.

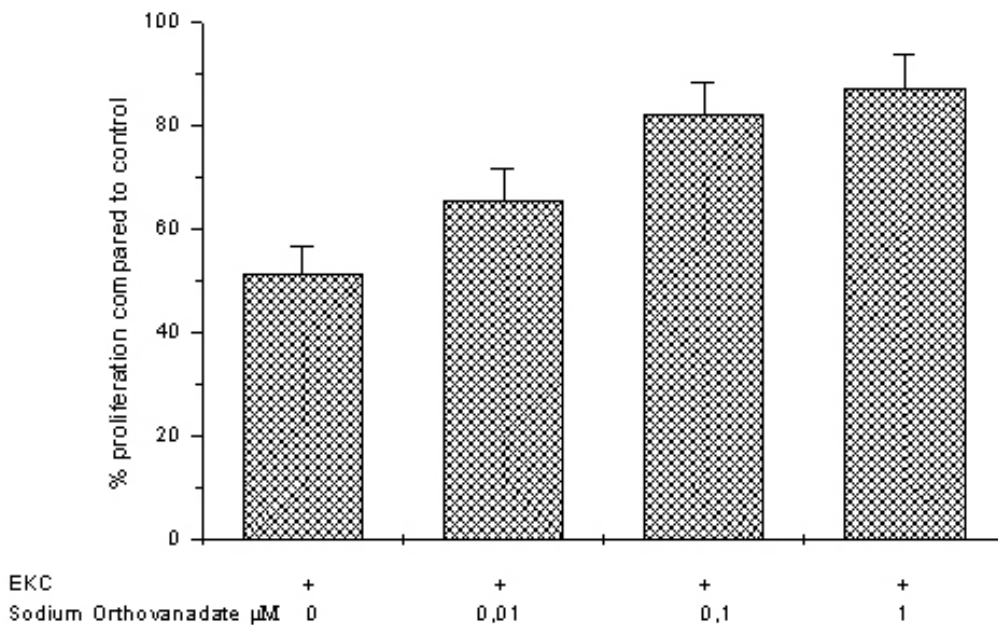


**Εικόνα 21.** Αποτελέσματα των δοκιμασιών δέσμευσης της οκτρεοτίδης και της EKC σε απομονωμένες μεμβράνες κυττάρων HepG2.

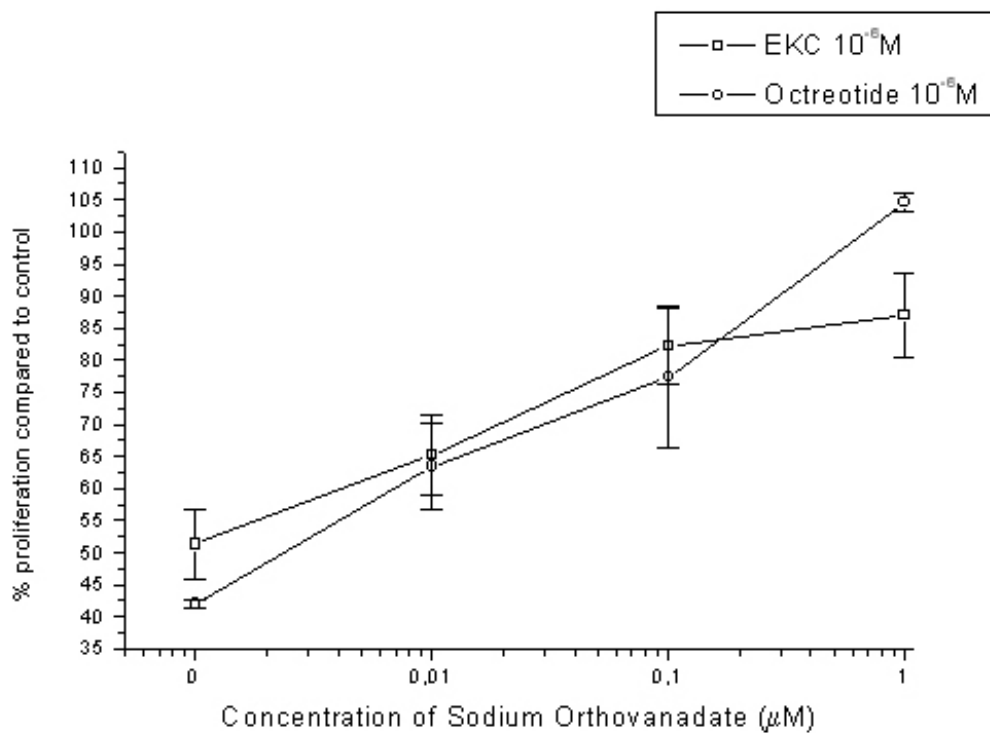
### 10. Μελέτη του ρόλου των Πρωτεϊνικών Φωσφοτυροσινικών Φωσφατασών (PTPs) στην αντιπολλαπλασιαστική δράση της EKC στα κύτταρα HepG2.

Δεδομένου ότι η EKC προσδενόταν στους υποδοχείς σωματοστατίνης, και πιθανόν ασκούσε το αντιπολλαπλασιαστικό της αποτέλεσμα μέσω αυτών θα έπρεπε να χρησιμοποιούσε και τα ίδια ενδοκυττάρια μονοπάτια με την οκτρεοτίδη. Το ίδιο ακριβώς φαινόμενο έχει περιγραφεί με το κυκλικό πενταπεπτίδιο cCD-2 το οποίο πρόκυπτε από την β-κασομορφίνη-5 και το οποίο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό πολλών κυτταρικών σειρών *in vitro*, ανεξάρτητα από τους υποδοχείς οπιοειδών. Το πεπτίδιο αυτό συνδέεται ειδικά με τους υποδοχείς σωματοστατίνης (πιθανόν πιο ειδικά με τον sst<sub>1</sub>) και επάγει την δραστηριότητα των πρωτεϊνικών φωσφοτυροσινικών φωσφατασών και συγκεκριμένα τόσο της SHP-1 όσο και της SHP-2 (504). Επομένως μελετήσαμε την επίδραση της αναστολής του μονοπατιού των πρωτεϊνικών φωσφοτυροσινικών φωσφατασών στο αποτέλεσμα της EKC.

Το sodium orthovanadate προκάλεσε και στην περίπτωση της EKC μια δόσοεξαρτώμενη μείωση της επίδρασής της στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 (Πίνακας A-V και Εικόνα 22). Η αντιστροφή του φαινομένου μάλιστα ήταν ανάλογη με αυτήν που παρατηρήθηκε στην περίπτωση της οκτρεοτίδης (Εικόνα 23)



**Εικόνα 22.** Επίδραση του sodium orthovanadate στο αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της EKC



**Εικόνα 23.** Σύγκριση της επίδρασης του sodium orthovanadate στο αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της οκτρεοτίδης και της EKC

### Συμπέρασμα

- Το αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της EKC αναστέλλεται με την αναστολή των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών όπως και με την οκτρεοτίδη.



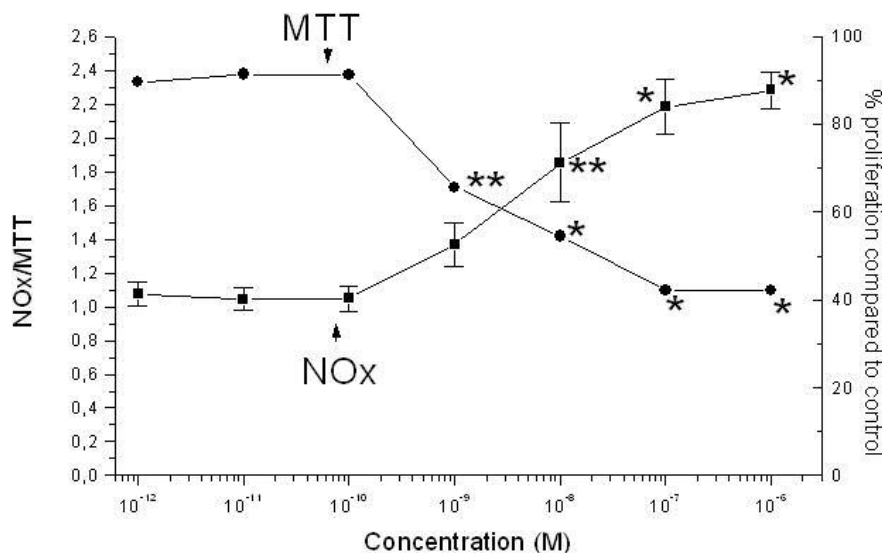
## 11. Επίδραση της οκτρεοτίδης και των οπιουειδών στην παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO)

Στην προσπάθεια διερεύνησης του τρόπου δράσεως της οκτρεοτίδης και των οπιουειδών στα κύτταρα HepG2 και με βάση την σημασία των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών στην αντιπολλαπλασιαστική δράση της οκτρεοτίδης και της EKC μελετήσαμε την επίδραση αυτών των ουσιών στο σύστημα NO/NOS, μέσω της επίδρασής τους στην παραγωγή των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού του NO που είναι τα νιτρικά (NO<sub>2</sub>) και νιτρώδη (NO<sub>3</sub>) ιόντα.

Η παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου από τα κύτταρα HepG2 μελετήθηκε στο υπερκείμενο των καλλιιεργειών από τα πειράματα πολλαπλασιασμού. Το σύνολο (NO<sub>x</sub>) των νιτρικών και νιτρώδων ιόντων, μετρήθηκε με φωτομετρική μέθοδο βασισμένη σε μια τροποποίηση της αντίδρασης Griess (518).

### 11.1. Επίδραση της οκτρεοτίδης στην παραγωγή NO<sub>x</sub>

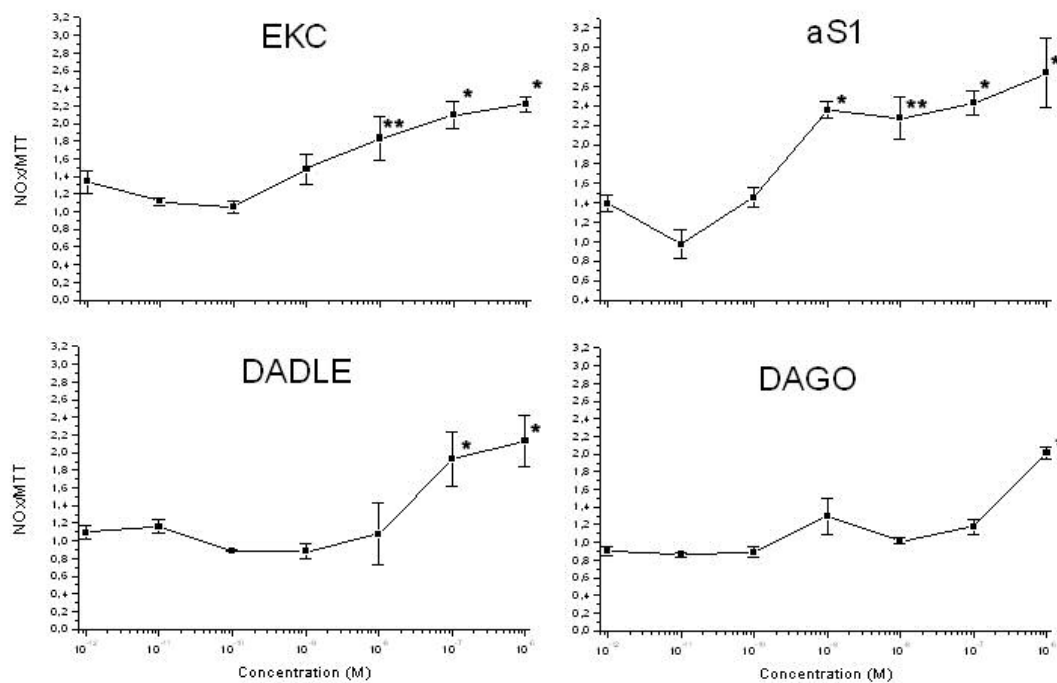
Η οκτρεοτίδη προκάλεσε μια δοσοεξαρτώμενη αύξηση των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού του NO (Εικόνα 24). Η αύξηση αυτή ήταν αντιστρόφως ανάλογη της μείωσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.



**Εικόνα 24.** Επίδραση της οκτρεοτίδης στην παραγωγή NO<sub>x</sub> από τα κύτταρα HepG2, μετά από επίδραση με οκτρεοτίδη. \* p<0,01, \*\* p<0,05.

## 11.2. Επίδραση των οπιοειδών στην παραγωγή NOx

Όλα τα οπιοειδή προκάλεσαν με τη σειρά τους και αυτά δοσοεξαρτώμενη αύξηση των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού του NO (Εικόνα 25). Η αύξηση και σε αυτή την περίπτωση ήταν αντιστρόφως ανάλογη της μείωσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.



**Εικόνα 25.** Επίδραση των οπιοειδών στην παραγωγή των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού του NO.

### Συμπέρασμα

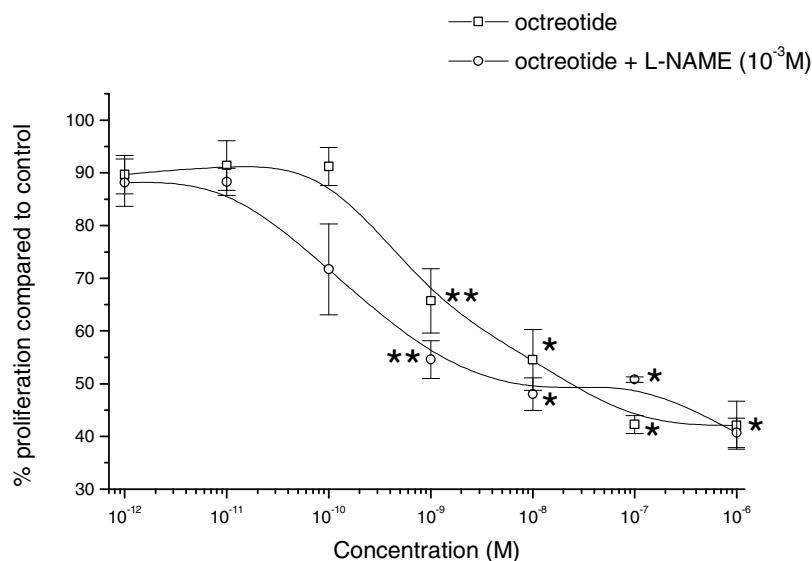
- Η οκτρεοτίδη και τα οπιοειδή αυξάνουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου από τα κύτταρα HepG2.

## 12. Επίδραση της αναστολής του NO στο αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της οκτρεοτίδης και της EKC.

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, έχει περιγραφεί πως η επαγωγή του NO δεν είναι απαραίτητη για την πρόκληση απόπτωσης σε ένα σύστημα στο οποίο είχε παρατηρηθεί αύξηση του μονοξειδίου του αζώτου και απόπτωση (526). Επομένως και στο πειραματικό μας μοντέλο θα μπορούσε αυτή η αύξηση των NOx να ήταν ένα επιφανόμενο και να μην είχε σχέση με τον πραγματικό μηχανισμό πρόκλησης της αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HepG2. Για να διερευνήσουμε αυτή την πιθανότητα επαναλάβαμε τα πειράματα επίδρασης της οκτρεοτίδης και της EKC με συνεπίδραση με τον αναστολέα των συνθασών του μονοξειδίου του αζώτου L-NAME.

### 12.1. Επίδραση του L-NAME στο αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της οκτρεοτίδης.

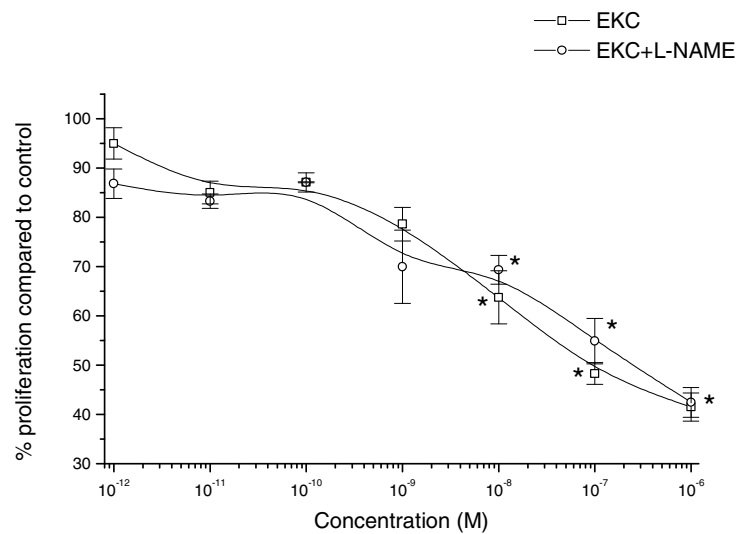
Καλλιέργεια των κυττάρων HepG2 με οκτρεοτίδη και μια υψηλή συγκέντρωση L-NAME ( $10^{-3}M$ ) η οποία αναστέλλει τις συνθασές του μονοξειδίου δεν είχε επίδραση στην ικανότητα της οκτρεοτίδης να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών (Εικόνα 26).



**Εικόνα 26.** Ο αναστολέας των NOS L-NAME δεν ανασταλεί το αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της οκτρεοτίδης.

## 12.2. Επίδραση του L-NAME στο αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της ΕΚC.

Όπως με την οκτρεοτίδη, έτσι και με την ΕΚC η συνκαλλιέργεια με L-NAME ( $10^{-3}$  M) δεν είχε επίδραση στην ικανότητα της να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2(Εικόνα 27).



**Εικόνα 27.** Ο αναστολέας των NOS L-NAME δεν ανασταλεί το αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της ΕΚC.

### Συμπέρασμα

- Η αύξηση των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού του NO που ανευρέθηκαν μετά από επίδραση με οκτρεοτίση ή ΕΚC στα κύτταρα HepG2, πιθανόν να μην σχετίζεται με τους ενδοκυττάριους μηχανισμούς που ρυθμίζουν το αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα των ουσιών αυτών.

## D. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου του σωματοστατινεργικού και του οπιοειδούς συστήματος στην ανάπτυξη και τον έλεγχο των νεοπλασματικών όγκων του ήπατος, η διασταύρωση *in vitro* των αποτελεσμάτων της *in vivo* μελέτης των Κουρούμαλη και συν. (113) για την εφαρμογή θεραπείας με οκτρεοτίδη στο ΗΚΚ και η μελέτη των ενδοκυττάρων μηχανισμών που τυχόν διέπουν το αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της οκτρεοτίδης και των οπιοειδών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η καλά διαφοροποιημένη κυτταρική σειρά ΗΚΚ HepG2. Δεδομένου ότι τα μέγιστα αποτελέσματα της θεραπείας με οκτρεοτίδη παρατηρούνται σε ασθενείς με προσδόκιμο επιβίωσης μεγαλύτερο από 6 μήνες (117;527) και επομένως λιγότερο επιθετικούς όγκους, η κυτταρική αυτή σειρά εκτιμήθηκε ότι θα αποτελούσε ένα καλό μοντέλο μελέτης.

Πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές είναι πλούσιες σε *ssts* και μάλιστα συχνά εκφράζουν mRNA για περισσότερες της μίας υποκατηγορίες *ssts* (246;281;323;342;344;465). Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός ανθρωπίνων όγκων, είτε καλοήθεις είτε κακοήθεις, έχει βρεθεί ότι φέρει έναν ή και περισσότερους *ssts* (246;247;281;319;343-352). Ο υποδοχέας που ανευρίσκεται συνήθως στις καρκινικές κυτταρικές σειρές και στους ανθρώπινους και ζωικούς όγκους είναι ο *sst*<sub>2</sub>. Έκφραση mRNA του *sst*<sub>1</sub> παρατηρείται λιγότερο συχνά και ακολουθείται από τον *sst*<sub>3</sub> και τον *sst*<sub>4</sub>. Η έκφραση *sst*<sub>5</sub> φαίνεται πως είναι όγκο-εξαρτώμενη, όντας θετική σε μερικούς όγκους, π.χ. μαστός, αλλά απύσα σε άλλους, π.χ. όγκους των νησιδίων του παγκρέατος (243;281;323).

### 1. Μελέτη της έκφρασης και παρουσίας υποδοχέων σωματοστατίνης και σωματοστατινεργικών πεπτιδίων στην κυτταρική σειρά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2

Ειδικά για το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και τις κυτταρικές σειρές ΗΚΚ τα έως τώρα, λίγα δεδομένα δείχνουν ότι υπάρχει έκφραση *ssts* αλλά όχι σε όλους τους όγκους

(113;115;355). Επομένως η αρχική υπόθεσή μας περί πιθανής επίδρασης της οκτρεοτίδης μέσω των υποδοχέων ssts στην κυτταρική σειρά HKK HepG2, προϋπέθετε την έκφραση και παραγωγή λειτουργικών υποδοχέων ssts από τα κύτταρα του πειραματικού μας μοντέλου.

Στα κύτταρα HepG2 ανευρέθηκε με RT-PCR, ότι παράγουν mRNA για τους υποτύπους υποδοχέων σωματοστατίνης  $sst_2$ ,  $sst_3$  και  $sst_5$ , ενώ δεν ανιχνεύθηκε η έκφραση των υποτύπων  $sst_1$  και  $sst_4$  (Εικόνα A-1). Οι Raderer και συν. έχουν περιγράψει με Northern Blot παρουσία των υποδοχέων  $sst_2$ ,  $sst_3$  και  $sst_4$  στα κύτταρα HepG2 (114). Ωστόσο στη μελέτη αυτή δεν γινόταν παρουσίαση κάποιας εικόνας με αυτό το αποτέλεσμα καθώς επίσης δεν αναφέρονταν οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Είναι ενδιαφέρον ότι οι υποδοχείς σωματοστατίνης που βρήκαμε ότι εκφράζονται στα κύτταρα HepG2 ανήκουν όλοι στην κατηγορία SRIF-1, ενώ υποδοχείς της κατηγορίας SRIF-2 δεν ανευρέθησαν.

Για την επιβεβαίωση της παρουσίας των πρωτεϊνών των ssts στα κύτταρα HepG2, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού. Με την μέθοδο αυτή ήταν επιπλέον δυνατή η μελέτη της θέσης των ssts στα κύτταρα, καθώς επίσης και ο εντοπισμός του υποτύπου του  $sst_2$  ( $sst_{2A}$  ή  $sst_{2B}$ ) που υπήρχε στο πειραματικό μας μοντέλο.

Ο ανοσοφθορισμός επιβεβαίωσε την παρουσία  $sst_2$ ,  $sst_3$  και  $sst_5$  στα κύτταρα HepG2 ενώ ο  $sst_2$  αντιστοιχούσε στον υποτύπο  $sst_{2A}$ . Ενδιαφέρον ήταν το γεγονός ότι οι υποδοχείς σωματοστατίνης στα κύτταρα HepG2 ήταν εντοπισμένοι κυρίως ενδοκυττάρια, δεδομένου ότι η αναμενόμενη θέση τους είναι στην κυτταρική μεμβράνη όπου μπορούν να συνδεθούν με τους αγωνιστές. Μάλιστα ο τρόπος κατανομής των τριών υποδοχέων ήταν διαφορετικός για καθένα από αυτούς, υποδηλώνοντας διαφορετικούς μηχανισμούς ρύθμισης της κυκλοφορίας των διαφορετικών υποτύπων. Το σήμα εξαφανιζόταν σε όλες τις περιπτώσεις, όταν τα αντισώματα προεπωάζονταν με τα αντίστοιχα συνθετικά πεπτίδια, επιβεβαιώνοντας την ειδικότητα του σήματος.

Ο  $sst_2$  βρέθηκε διεσπαρμένος σε όλο το κυτταρόπλασμα υπό μορφή μικρών φθοριζόντων στιγμάτων τα οποία δεν κάλυπταν την περιοχή του πυρήνα. Το σήμα του  $sst_3$  ήταν διάχυτα κυτταροπλασματικό, πίο ομοιογενώς από εκείνο του  $sst_2$  αλλά με

συνοδό έντονη περιπυρηνική χρώση. Τέλος, ο  $sst_5$  ήταν κατά ένα μεγάλο μέρος κυτταροπλασματικά εντοπισμένος, όπως και ο  $sst_2$ , ωστόσο το σήμα είχε την μορφολογία στικτών σωματιδίων συσσώρευσης του αντιγόνου, δίχως να υπάρχει χρώση στην περιοχή του πυρήνα.

Επειδή η κυτταροπλασματική εντόπιση των υποδοχέων δημιουργούσε ερωτηματικά ως προς το μηχανισμό μέσω του οποίου η σωματοστατίνη και τα ανάλογα θα μπορούσαν να ενεργοποιούν αυτούς τους υποδοχείς και οι εικόνες του ανοσοφθορισμού δεν έδωσαν σαφή εικόνα μεμβρανικών  $ssts$  προχωρήσαμε σε δοκιμασίες δέσμησης σε απομονωμένες μεμβράνες από κύτταρα HepG2. Η ειδική δέσμηση της  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$  ήταν σημαντική. Οι ειδικές θέσεις πρόσδεσης τύπου  $sst_2$  ήταν ελάχιστες ενώ οι τύπου  $sst_3$  και  $sst_5$  αντιστοιχούσαν μαζί σχεδόν στο 100% της ειδικής πρόσδεσης στις μεμβράνες των κυττάρων. Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι ελάχιστοι υποδοχείς του υποτύπου  $sst_2$  υπάρχουν στις μεμβράνες των κυττάρων HepG2 όταν αυτά βρίσκονται σε στέρηση ορού.

Τα αποτελέσματά αυτά που χαρακτηρίζονται από εικόνες ανοσοφθορισμού με προϊούσα ενδοκυτταρική κατανομή των  $ssts$  και ταυτόχρονη ανίχνευση με μελέτες δέσμησης κυρίως των  $sst_3$  και  $sst_5$  στην κυτταρική μεμβράνη, είναι συμβατά με προηγούμενες περιγραφές για ενδοκυττάρωση των  $ssts$  μετά από την έκθεση στους σωματοστατινεργικούς αγωνιστές. Οι Csaba και συν. έδειξαν με μία σειρά μελετών στις οποίες χρησιμοποίησαν συνδυασμούς μικροσκοπίας συνεστίασης και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, ότι η έκθεση των κυττάρων εγκεφάλου στην οκτρεοτίδη προκαλεί σημαντικές και εντυπωσιακές αλλαγές στη κατανομή του  $sst_2$  στο κύτταρο. Οι  $sst_2$  που σε συνθήκες ηρεμίας εντοπίζονταν μόνο στην κυτταρική μεμβράνη, μετά από διέγερση με οκτρεοτίδη μετακινούνταν σε μεγάλο ποσοστό ενδοκυττάρια, και κατανέμονταν ομοιόμορφα σε όλο το κυτταρόπλασμα. Ταυτόχρονα οι υποδοχείς  $sst_2$  που παρέμεναν στην κυτταρική μεμβράνη ήταν σπάνιοι (319).

Οι Kreuzer και συν. μελέτησαν τα κρίσιμα βήματα της επαγόμενης από αγωνιστές ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα  $sst_3$  του αρουραίου μετά από τεχνητή έκφρασή του σε κύτταρα RIN-1046-38 (528). Η διέγερση με SRIF-14 οδηγούσε σε μια ταχεία

εσωτερικοποίηση των  $sst_3$  υποδοχέων, οι οποίοι μετά από 30 λεπτά ανευρίσκονταν στη περιπυρηνική περιοχή, όπως και στα κύτταρα HepG2, διαδικασία που γινόταν μέσω καλυμμένων με κλαθρίνη κυστιδίων. Ανέφεραν επίσης ότι ενώ παρατηρήθηκε μια σημαντική απώλεια μεμβρανικών περιοχών πρόσδεσης για τη σωματοστατίνη μετά από την έκθεση στον αγωνιστή, τα κύτταρα διατηρούσαν ένα σημαντικό ποσοστό των αρχικών θέσεων πρόσδεσης.

Τέλος οι Stroh και συν. μελέτησαν τους ενδοκυττάριους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την κατανομή των υποδοχέων  $sst_5$  σε ένα μοντέλο κυττάρων COS-7 στα οποία είχε μεταφερθεί το γονίδιο αυτού του υποδοχέα (529). Οι ανοσοϊστοχημικές μελέτες αποκάλυψαν ότι στα κύτταρα HepG2 οι υποδοχείς  $sst_5$  ήταν παρόντες τόσο στην επιφάνεια των κυττάρων όσο και σε μια σημαντική ενδοκυττάρια «αποθήκη». Όταν αυτά τα κύτταρα διεγέρθηκαν με σωματοστατίνη συνδεδεμένη με μια φθορίζουσα ουσία, άρχισε βαθμιαία μετακίνηση των  $sst_5$  προς την περι-πυρηνική περιοχή υπό μορφή «θερμών στιγμάτων». Παράλληλες μελέτες ανοσοφθορισμού των υποδοχέων  $sst_5$  έδειξαν ταυτόχρονη μείωση της κεντρικής κυτταροπλασματικής αποθήκης, με μια ενδιάμεση φάση διάχυτης στικτής κατανομής και μια τελική φάση περιφερικής κατανομής. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αν και τα συμπλέγματα  $sst_5$ -SRIF εσωτερικοποιούνται, οι υποδοχείς  $sst_5$  είναι ρυθμισμένοι κατά τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρείται υψηλή πυκνότητα επιφανειακών περιοχών σύνδεσης μέσω της ανακύκλωσης των εσωτερικοποιημένων υποδοχέων και της στρατολόγησης των εφεδρικών υποδοχέων από την ενδοκυττάρια αποθήκη. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε παρατεταμένη επαγωγή του αριθμού των υποδοχέων  $sst_5$  στην μεμβράνη. Αυτοί οι μηχανισμοί έχουν σοβαρές επιπτώσεις στη λειτουργία των υποδοχέων, δεδομένου ότι η διαδικασία της εσωτερικοποίησης και της ανακύκλωσης υποδοχέων στη μεμβράνη μπορεί να προστατεύσει αποτελεσματικά τον υποδοχέα από τη μακροπρόθεσμη απευαισθητοποίηση.

Τα φαινόμενα που χαρακτηρίζουν την κατάσταση των υποδοχέων σωματοστατίνης στα αδιέγερτα κύτταρα HepG2, θα μπορούσαν να ερμηνευθούν με την ενδοκυττάρια παραγωγή ενός σωματοστατινεργικού πεπτιδίου το οποίο εκκρίνεται και προκαλεί με αυτοκρινή τρόπο την εσωτερικοποίηση των  $sst_5$ . Στην βιβλιογραφία



υπάρχουν ανάλογα παραδείγματα. Στον εγκέφαλο αρουραίων έχει βρεθεί ότι περιοχές με υψηλά επίπεδα τοπικής ενδογενούς σωματοστατίνης περιέχουν υψηλά επίπεδα ενδοκυτταρικών υποδοχέων ssts σε σχέση με περιοχές που δεν εκφράζουν αυτό το πεπτίδιο (523). Επίσης σε άλλη ανοσοϊστοχημική μελέτη, παρατηρήθηκε κυτταροπλασματικός εντοπισμός των υποδοχέων σωματοστατίνης σε ανθρώπινους νευρικούς και νευροενδοκρινικούς όγκους με υψηλό επίπεδο έκφρασης του γονιδίου της σωματοστατίνης, ενώ μεμβρανική εντόπιση παρατηρούνταν σε όγκους που στερούνταν έκφρασης αυτού του mRNA (524).

Η παραγωγή λοιπόν κάποιου σωματοστατινεργικού πεπτιδίου θα μπορούσε να αποτελεί μια λογική εξήγηση των ευρημάτων μας. Η ανεύρεση ανοσοδραστικότητας τύπου σωματοστατίνης στα κύτταρα HepG2 με τον αντι-ορό κατά της οβαλβουμίνης που συνδέεται με την SRIF-14 (517) απέβη θετική και επομένως θεωρήθηκε ότι τα κύτταρα HepG2 παράγουν κάποιο σωματοστατινεργικό πεπτίδιο. Το πεπτίδιο αυτό επιβεβαιώθηκε με RT-PCR ότι ήταν η CST και όχι η SRIF. Επομένως οι μελέτες ανίχνευσης ανοσοδραστικότητας τύπου σωματοστατίνης με το αντίσωμα των Sperk και συν. μετρούσαν κορτιστατίνη, γεγονός που μας επέτρεψε να ποσοτικοποιήσουμε την ποσότητα της παραγόμενης CST από τα κύτταρα HepG2. Αρχικά δεδομένα σχετικά με την πιθανότητα αυτός ο αντι-ορός να μπορεί να ανιχνεύει και την CST14, υπήρχαν από άλλα προηγούμενα πειράματα (Θερμού και συν. αδημοσίευτα αποτελέσματα). Ωστόσο, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη στην οποία (α) ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε η ικανότητα του αντι-ορού των Sperk και συν. να αναγνωρίζει την ανθρώπινη CST17 και (β) έγινε δυνατή η ποσοτική μέτρηση του πεπτιδίου της ανθρώπινης CST17. Ωστόσο μόνο σε πειραματικά μοντέλα στα οποία έχει επιβεβαιωθεί η απουσία έκφρασης του mRNA της SRIF μπορεί να γίνει μια τέτοια μέτρηση. Επίσης πρόκειται για την πρώτη μελέτη που παρουσιάζει στοιχεία ότι η κορτιστατίνη πιθανόν να επάγει αυτοκρινώς την εσωτερικοποίηση των υποδοχέων σωματοστατίνης, ενώ μέχρι σήμερα είχε αναφερθεί εσωτερικοποίηση μόνο του sst<sub>4</sub> αλλά όχι των άλλων ssts από την κορτιστατίνη (530).

Η CST είναι ένα νευροπεπτίδιο με σημαντική δομική ομοιότητα με την SRIF που ανακαλύφθηκε το 1996 (257;258). Είναι προϊόν ενός γονιδίου διαφορετικό από αυτό που παράγει την SRIF, αλλά αρκετά παρόμοιας δομής ώστε να προταθεί ότι είναι προϊόν

κάποιου πρώιμου γονιδιακού διπλασιασμού (259). Η ανθρώπινη CST17 έχει υψηλή συγγένεια για όλες τις υποκατηγορίες των υποδοχέων σωματοστατίνης δίχως να εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για κάποιον από αυτούς (260;261). Το mRNA της CST έχει ανιχνευθεί στον εγκέφαλο του ανθρώπου, του αρουραίου και του ποντικού (257;258;260) καθώς και στο ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα (263;264). Μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε παρουσία έκφρασης CST σε ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπινων ιστών, μεταξύ αυτών και το ήπαρ (253) αλλά οι συγγραφείς αναφέρουν ότι τα αποτελέσματά τους μπορεί να έχουν επηρεαστεί από την εκτεταμένη παρουσία κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στους περιφερικούς ανθρώπινους ιστούς. Ωστόσο αναφέρουν ότι σε ιστούς με σχετικά μικρή διήθηση από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα επινεφρίδια, ο θυροειδής και το ήπαρ η αυξημένη παρουσία mRNA της CST μπορεί να αποδοθεί στην έκφραση από άλλα κύτταρα αυτών των ιστών. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι η CST ανευρίσκεται σε όλο το ανθρώπινο σώμα και έτσι ενδεχομένως μπορεί να διαδραματίζει έναν ευρύτερο ρόλο στη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Για την περίπτωση του ήπατος αξίζει να αναφερθεί πως στα κύτταρα του Kupffer, τα οποία ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα, έχει ανευρεθεί έκφραση CST (Κουρούμαλης και συν. αδημοσίευτες πληροφορίες).

Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι πιθανός φυσικός υποδοχέας της CST είναι ο μέχρι πρότινος ορφανός υποδοχέας MrgX-2 (262). Ο υποδοχέας αυτός δεν ανευρέθη στα κύτταρα HepG2.

Συνοψίζοντας, τα κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2, φέρουν υποδοχείς σωματοστατίνης των υποτύπων sst2A, sst3 και sst5. Οι υποδοχείς αυτοί κατανέμονται κυρίως ενδοκυττάρια, ενώ στη μεμβράνη ανευρίσκονται κυρίως υποδοχείς των υποτύπων sst3 και sst5. Τα κύτταρα HepG2 παράγουν επίσης το σωματοστατινεργικό νευροπεπτίδιο κορτιστατίνη το οποίο πιθανώς προκαλεί την εσωτερικοποίηση των ssts μέσω αυτοκρινούς μηχανισμού.

## 2. Επίδραση της οκτρεοτίδης και της κορτιστατίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2.

### 2.1. Οκτρεοτίδη

Στα κύτταρα HepG2 πέρα από το γεγονός ότι φέρουν υποδοχείς σωματοστατίνης, οι μελέτες δέσμευσης έδειξαν ότι η οκτρεοτίδη προσδένεται ειδικά στους υποδοχείς αυτούς και εκτοπίζει την ραδιενεργό SRIF. Ωστόσο η οκτρεοτίδη όφειλε να εκτοπίσει στην συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε σε αυτά τα πειράματα το σύνολο της [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>11</sup> SRIF-14. Αντ' αυτού παρεκτόπισε μόνο το 34% αυτής, εύρημα το οποίο δεν μπορεί να ερμηνευθεί με τα δεδομένα που έχουμε. Ωστόσο η παρουσία της αυτοκρινούς δράσης της CST σε αυτά τα κύτταρα μπορεί να προκαλεί δυναμικές αλλαγές στην κατάσταση και την συγγένεια των υποδοχέων σωματοστατίνης, αλλά απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να αποδειχθεί αυτό.

Η οκτρεοτίδη έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην θεραπεία του ΗΚΚ (113;115;527). Προσδένεται σε όλους τους υποδοχείς σωματοστατίνης που εκφράζονται από τα κύτταρα HepG2 (243), και έχει μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής από την SRIF στα καλλιεργητικά υλικά (531). Η οκτρεοτίδη ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, και μάλιστα σε συγκεντρώσεις συμβατές με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για τις *in vivo* μελέτες θεραπείας στο ΗΚΚ.

Η μη ύπαρξη ειδικών αναστολέων των υποδοχέων σωματοστατίνης δεν επέτρεψε την ανίχνευση του ποιος ή ποιοι εκ των υποδοχέων, που εκφράζουν τα κύτταρα HepG2 ρυθμίζουν το αποτέλεσμα της οκτρεοτίδης. Τα αντιπολλαπλασιαστικά αποτελέσματα της οκτρεοτίδης θεωρείται ότι ρυθμίζονται μέσω του sst<sub>2</sub> (345) και του sst<sub>5</sub> (532), ενώ ο sst<sub>3</sub>, ο οποίος επίσης μπορεί να διεγερθεί από την οκτρεοτίδη, έχει συσχετιστεί με επαγωγή της απόπτωσης (354). Στην περίπτωση που η δράση της οκτρεοτίδης γίνεται μέσω του sst<sub>2</sub>, υπάρχει πρόβλημα σχετικά με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων μας ελλείψει ενός σημαντικού ποσού υποδοχέων του τύπου του sst<sub>2</sub> στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων HepG2. Είναι όμως δυνατό η οκτρεοτίδη να εσωτερικοποιείται και αυτή είτε μαζί με τους sst<sub>2</sub>, είτε μόνη της, όπως αναφέρθηκε σε άλλα συστήματα από τους Dournaud και συν (523) και Hornick και συν. (533) αντίστοιχα. Στην περίπτωση του

υποδοχέα  $sst_5$  είναι πιθανό να μην είναι απαραίτητο να ενεργοποιηθούν όλοι οι υποδοχείς από τον αγωνιστή για να μπορέσει να επιτευχθεί μια βιολογική επίδραση ενώ υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν την ύπαρξη εξαρτώμενων από τον αγωνιστή τροποποιήσεων των υποδοχέων που οδηγούν σε διαφορετικού επιπέδου ενεργοποίηση ανάλογα με τον αγωνιστή (534). Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει την απόκλιση της  $IC_{50}$  της αντιπολλαπλασιαστικής επίδρασης της οκτρεοτίδης στα κύτταρα HepG2 (1,25nM) και της  $IC_{50}$  της συγγένειας της οκτρεοτίδης για τον  $sst_5$ . Τέλος η επίδραση μέσω των  $sst_3$  για την άσκηση της δράσης της οκτρεοτίδης δεν μπορεί να αποκλειστεί στο σύστημά μας δεδομένης και της σημαντικής παρουσίας τους στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων HepG2. Επίσης η αυτοκρινής παραγωγή CST μπορεί να επηρεάζει την συγγένεια των  $ssts$  για την οκτρεοτίδη. Μια άλλη ερμηνεία για την αντιπολλαπλασιαστική δράση της οκτρεοτίδης θα μπορούσε να είναι η ενεργοποίηση ενός άλλου γνωστού ή ακόμα μη αναγνωρισμένου υποδοχέα. Εντούτοις, θα ήταν πρόωρο να γίνει μια τέτοια εκτίμηση με βάση τα ευρήματα της παρούσας μελέτης.

Επόμενο βήμα της μελέτης μας ήταν η αναζήτηση των ενδοκυττάρων μονοπατιών μέσω των οποίων ρυθμιζόταν η αντιπολλαπλασιαστική δράση της οκτρεοτίδης. Έχει αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών Φωσφοτυροσινικών Φωσφατασών (PTPs) είναι ένας από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων η σωματοστατίνη και τα ανάλογά της επιτυγχάνουν τα αντιπολλαπλασιαστικά τους αποτελέσματά (345). Το φαινόμενο αυτό έχει περιγραφεί σε διάφορα πειραματικά μοντέλα καρκίνου όπως μαστού (519), προστάτη (520), θυροειδούς (305;308) και παγκρέατος (307;521;522).

Η αναστολή του αντιπολλαπλασιαστικού αποτελέσματος της οκτρεοτίδης από τον μη ειδικό αναστολέα των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών sodium orthovanadate επιβεβαιώθηκε και στο δικό μας σύστημα, καταδεικνύοντας τον κεντρικό ρόλο αυτού του ενδοκυττάρου μονοπατιού στην αντικαρκινική δράση της σωματοστατίνης και των αναλόγων της. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά ενός πιθανού ενδοκυττάρου μονοπατιού διαβίβασης της δράσης της οκτρεοτίδης στο ΗΚΚ. Επομένως, η ανάπτυξη νέων αναλόγων σωματοστατίνης με ικανότητα ισχυρής διέγερσης των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών μπορεί να οδηγήσει σε πιο αποτελεσματικές θεραπείες για τους διάφορους

τύπους καρκίνου που φαίνεται να ανταποκρίνονται στα ανάλογα σωματοστατίνης μέσω αυτού του μονοπατιού.

Παράλληλα με τον τρόπο δράσης της οκτρεοτίδης, που περιλαμβάνει ενεργοποίηση των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών, μελετήθηκε η πιθανή αλληλεπίδρασή της με το σύστημα της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NO). Τα τελευταία χρόνια το σύστημα του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και των ενζύμων που το συνθέτουν (συνθάσες της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου, NOS), έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες (535). Η ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου (NO) είναι μία μικρή και αρκετά ασταθής ρίζα που παράγεται από διάφορα κύτταρα και σε διάφορα είδη οργανισμών. Το πολύ μικρό μέγεθος και η διαχυτικότητα της, της επιτρέπουν να κινείται με μεγάλη ευκολία μακριά από τον χώρο παραγωγής της με αποτέλεσμα να αποτελεί ένα νέο είδος αγγειοφόρου που δρα ανεξάρτητα από κανάλια και ειδικούς μεταφορείς (536). Έχει βρεθεί ότι δρα ως κυτταρικός διαβιβαστής, νευροδιαβιβαστής και ενδοκυττάριο δεύτερο μήνυμα (537;538). Παρουσιάζει ευρύ φάσμα φυσιολογικών λειτουργιών συμμετέχοντας στη νευροδιαβίβαση, την πήξη του αίματος, τη ρύθμιση της πίεσης καθώς και στην ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να μπορεί να καταστρέψει καρκινικά κύτταρα και ενδοκυττάρια παράσιτα (539;540). Υψηλές συγκεντρώσεις NO μπορεί να έχουν είτε ευεργετικό (αντιμικροβιακή δράση), είτε καταστροφικό αποτέλεσμα, που να οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (541). Ο ρόλος του NO στον καρκίνο είναι περίπλοκος (535). Μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο (535;541-543), ενώ παράλληλα έχει βρεθεί ότι η παραγωγή της από τα καρκινικά κύτταρα ενισχύει την αγγειογένεση και το μεταστατικό δυναμικό ενός όγκου (535;539;540;544-546), γεγονός που πιθανώς σχετίζεται με την συγκέντρωσή του στο περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων (535;545;547).

Αρκετές μελέτες αναφέρουν σε διάφορα συστήματα αλληλεπίδραση μεταξύ του συστήματος της σωματοστατίνης με το σύστημα του NO. Επίσης έχει βρεθεί πως η ενεργοποίηση των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών από την σωματοστατίνη και τα ανάλογά της οδηγεί σε επαγωγή της παραγωγής του NO (548;549), το οποίο πιθανώς να ρυθμίζει το αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμά τους (548). Έχει ωστόσο αναφερθεί πως

η επαγωγή της απόπτωσης από συνδυασμό προφλεγμονωδών κυτταροκινών σε μια κυτταρική σειρά παχέως εντέρου συνοδεύεται μεν από αύξηση του NO, δίχως όμως η αύξηση αυτή να είναι απαραίτητη για το αποπτωτικό αποτέλεσμα (526).

Στην προσπάθεια διερεύνησης του τρόπου δράσεως της οκτρεοτίδης στα κύτταρα HepG2 και με βάση την σημασία των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών στην αντιπολλαπλασιαστική δράση της οκτρεοτίδης μελετήσαμε την επίδραση της στο σύστημα NO/NOS, μέσω της επίδρασής στην παραγωγή των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού του NO που είναι τα νιτρικά (NO<sub>2</sub>) και νιτρώδη (NO<sub>3</sub>) ιόντα. Η οκτρεοτίδη προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη αύξηση των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού του NO η οποία ήταν αντιστρόφως ανάλογη της μείωσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ωστόσο η καλλιέργεια των κυττάρων HepG2 με οκτρεοτίδη και υψηλή συγκέντρωση L-NAME, ουσία η οποία αναστέλλει μη αναστρέψιμα τις συνθάσες του μονοξειδίου του αζώτου δεν είχε επίδραση στην ικανότητα της οκτρεοτίδης να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών. Κατά συνέπεια επρόκειτο για ένα επιφανόμενο το οποίο είναι ανεξάρτητο από την αντιπολλαπλασιαστική δράση της οκτρεοτίδης.

Συνοψίζοντας η οκτρεοτίδη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, σε συγκεντρώσεις ανάλογες με αυτές που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά σε ασθενείς με ΗΚΚ και το αποτέλεσμα αυτό εξαρτάται από την ενεργοποίηση των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών. Η αύξηση των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού του NO, που παρατηρείται από την επίδραση της οκτρεοτίδης δεν είναι απαραίτητη για το αντιπολλαπλασιαστικό της αποτέλεσμα.

## **2.2. Κορτιστατίνη**

Ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν σχετικά με τον ρόλο της κορτιστατίνης στον καρκίνο. Έχει αναφερθεί ότι η CST-14 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων θύμου (393).

Στα κύτταρα HepG2 η χορήγηση CST17 δεν είχε κάποια ιδιαίτερη επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2. Η επίδραση όμως του αντισώματος του Sperk το οποίο δεσμεύει την CST είχε ως αποτέλεσμα μια στατιστικά σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων HepG2 κατά 7% περίπου, ένα αποτέλεσμα εντελώς αντίθετο με αυτό που θα αναμένονταν με βάση την επίδραση της οκτρεοτίδης και το γεγονός ότι η CST έχει αναφερθεί ότι προσδένεται σε όλους του υποδοχείς σωματοστατίνη με την ίδια συγγένεια (281;282).

Σε πολλές περιπτώσεις έχει περιγραφεί αντίθετη δράση της CST και της SRIF. Η χορήγηση κορτιστατίνης μειώνει τη νευρωνική ηλεκτρική δραστηριότητα αλλά, αντίθετα από τη σωματοστατίνη, προκαλεί χαμηλής συχνότητας κύματα στον εγκεφαλικό φλοιό και ανταγωνίζεται τα διεγερτικά αποτελέσματα της ακετυλοχολίνης στον ιππόκαμπο και το φλοιό (258). Η χορήγηση είτε CST είτε SRIF στον ιππόκαμπο αρουραίων βρέθηκε ότι επιδεινώνει τη σταθεροποίηση της μνήμης με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και διευκολύνει την εξάλειψη μαθημένης συμπεριφοράς. Ωστόσο η CST ήταν πιο ισχυρή από την SRIF και επιπλέον η CST προκαλούσε το αποτέλεσμά της μέσω αύξησης της cAMP ενώ η SRIF μέσω μείωσής της (383). Οι διαφορές στα αποτελέσματα της SRIF και της CST δεν μας επιτρέπουν να καταλήξουμε σε σαφή συμπεράσματα σχετικά με την παρουσία ενός ειδικού υποδοχέα της CST. Μπορούν όμως να εξηγηθούν με βάση τη συγγένεια της CST για τους υποδοχείς σωματοστατίνης, η οποία θα μπορούσε να τροποποιηθεί με κάποιον από τους μηχανισμούς που έχουν περιγραφεί πρόσφατα όπως τις πρωτεΐνες τροποποίησης της δράσης υποδοχέων, τον ομο/ετερο-διμερισμό των G-πρωτεϊνών ή των υποδοχέων σωματοστατίνης ή τη διαφορετική δυνατότητα των υποδοχέων για ενδοκυττάρωση (259).

Ο ακριβής ρόλος της CST στο σύστημά μας δεν είναι σαφής, όπως δεν είναι σαφές και το αν είναι προϊόν του φυσιολογικού ηπατοκυττάρου που διατηρήθηκε στα κύτταρα HepG2, ή η παραγωγή του σχετίζεται με την εμφάνιση του HKK. Από τα αποτελέσματά μας όμως δημιουργείται έντονα η υπόνοια ότι παίζει κάποιον επαγωγικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2, δράση αντίθετη από εκείνη της οκτρεοτίδης.

### 3. Μελέτη της επίδρασης των οπιοειδών στην κυτταρική σειρά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2

Ένας μεγάλος αριθμός ανθρώπινων όγκων καθώς και διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές παράγουν οπιοειδή και φέρουν υποδοχείς οπιοειδών. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα οπιοειδή αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό ή οδηγούν σε απόπτωση κύτταρα πολλών καρκινικών κυτταρικών σειρών και μεταμοσχεύσιμων όγκων (342;440;445;483-494).

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

Στη μελέτη μας λοιπόν ερευνήθηκε και η τυχόν επίδραση των οπιοειδών στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2. Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν αγωνιστές υψηλής συγγένειας για τους διαφορετικούς οπιοειδείς υποδοχείς και συγκεκριμένα η Αιθυλκετοκυκλοζοσίνη (EKC,  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa 1$  και  $\kappa 2$  αγωνιστής), η [D-ala2, D-leu5]-Εγκεφαλίνη (DADLE,  $\mu$  και  $\delta$  αγωνιστής) και η [D-Ala2, N-Me-Phe4, Gly5-ol]-Εγκεφαλίνη (DAGO,  $\mu$  αγωνιστής). Ως γενικός οπιοειδής ανταγωνιστής χρησιμοποιήθηκε η διπρενορφίνη η οποία συνδέεται σε όλους τους τύπους των οπιοειδών υποδοχέων (342). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε ο οπιοειδής αγωνιστής as1-casomorphine (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro, aS1) που προέρχεται από την ακολουθία της ανθρώπινης καζεΐνης, ο οποίος προσδένεται με μεγάλη συγγένεια στους υποδοχείς  $\kappa$  αλλά και στους  $\mu$ .

Η aS1 και η EKC ήταν οι οπιοειδείς αγωνιστές που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη στατιστικώς σημαντική καταστολή του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων HepG2. Όλα τα οπιοειδή που μελετήθηκαν ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 με μέγιστη αναστολή 54-57%. Ωστόσο η EKC και η aS1 ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 με χαμηλά  $IC_{50}$  ( $2,7 \times 10^{-9} M$  και  $1,64 \times 10^{-10} M$



αντίστοιχα). Το DADLE ανέστειλε επίσης τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 αλλά με μεγαλύτερο  $IC_{50}$  ( $2,62 \times 10^{-8}$ ). Τέλος το DAGO ήταν το πιο αδύναμο οπιοειδές σε σχέση με τα άλλα και ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 αλλά μόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ( $IC_{50} 1,2 \times 10^{-6} M$ ).

Τα τελευταία χρόνια εκτός από τα αλκαλοειδή οπιοειδή υπάρχουν αναφορές ότι πεπτίδια προερχόμενα από τις καζεΐνες του αγελαδινού γάλακτος (550-553) και την ανθρώπινη β καζεΐνη (554) αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (342;483). Το ήπαρ αποτελεί όργανο κλειδί για την διοχέτευση στην κυκλοφορία των ουσιών που προκύπτουν από την διάσπαση των τροφών και απορροφώνται από το έντερο. Η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HepG2 από την aS1-καζομορφίνη, η οποία μάλιστα ήταν ο πιο ισχυρός αναστολέας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αποτελεί ένα σημαντικό εύρημα με πιθανή προέκταση τον πιθανό προστατευτικό ρόλο του γάλακτος και των παραγώγων του στην πρόκληση του ΗΚΚ, το οποίο όμως χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Αξίζει πάντως να αναφερθεί πως σε μια πολυπαραγοντική μελέτη τροφικών παραγόντων μόνο η κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων σχετίζονταν με μειωμένη συχνότητα εμφάνισης ΗΚΚ (555).

Όπως προαναφέρθηκε, ένας τρόπος τεκμηρίωσης της οπιοειδούς δράσεως είναι η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρουσία περίσσειας ανταγωνιστών. Το αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της EKC δεν μπορούσε να ανασταλεί από την διπρενορφίνη η οποία από μόνη της δεν είχε καμία επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2. Δεδομένου ότι υπάρχει πλήρης αλληλοκάλυψη των υποδοχέων στους οποίους προσδέονται και τα δυο πεπτίδια η δράση της EKC δεν φαίνεται να σχετιζόταν με την πρόσδεσή της σε υποδοχείς οπιοειδών. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η δράση της πιθανώς πραγματοποιείται μέσω άλλων υποδοχέων από αυτούς των οπιοειδών.

Η αδυναμία αναστολής της δράσης της EKC στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων από την διπρενορφίνη δημιούργησε το ερώτημα της παρουσίας υποδοχέων οπιοειδών στα κύτταρα HepG2.

Για αυτό το λόγο μελετήθηκε τόσο η έκφραση του mRNA των κλωνοποιημένων υποδοχέων όσο και η παρουσία λειτουργικών θέσεων δέσμησης οπιοειδών. Σε ότι αφορά τα πειράματα ανίχνευσης του mRNA των κλωνοποιημένων υποδοχέων αξίζει να σημειωθεί ότι ο KOR θεωρείται ότι αντιστοιχεί στον  $\kappa_1$ , ο DOR στον  $\delta_2$  ενώ ο MOR αντιστοιχεί στους  $\mu_1$  και  $\mu_2$ . Τα κύτταρα HepG2, ανευρέθηκε με RT-PCR, ότι παράγουν σε συνθήκες ηρεμίας και στέρησης ορού mRNA μόνο για τον KOR υποδοχέα οπιοειδών ενώ δεν ανιχνεύθηκε η έκφραση των υποτύπων DOR και MOR.

Η ανίχνευση mRNA του υποδοχέα KOR θα μπορούσε να σημαίνει ότι η ΕΚC δρα μέσω του υποδοχέα  $\kappa_1$  για να ασκήσει το αντιπολλαπλασιαστικό της αποτέλεσμα στα κύτταρα HepG2. Ωστόσο η διπρενορφίνη όφειλε να αναστείλει το φαινόμενο, έστω και μερικώς, διότι έχει και αυτή την ιδιότητα να προσδένεται στον  $\kappa_1$ . Έτσι προχωρήσαμε σε δοκιμασίες δέσμησης τόσο για να ελέγξουμε το αποτέλεσμα της PCR, όσο και για να μελετήσουμε την τυχόν ύπαρξη υποδοχέων των τάξεων  $\kappa_2$ ,  $\kappa_3$ , και  $\delta_1$  τα γονίδια των οποίων δεν έχουν αναγνωριστεί ακόμα. Το οπιοειδές U-69,593 δεν συνδέθηκε ειδικά σε καμία από τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν. Δεδομένου ότι πρόκειται για εξαιρετικά ειδικό αγωνιστή του υποδοχέα  $\kappa_1$  η απουσία θέσεων ειδικής πρόσδεσης αυτού του οπιοειδούς δείχνει απουσία του υποδοχέα αυτού, αν και τα κύτταρα εξέφραζαν mRNA για αυτόν. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται σε μεταμεταγραφικές διαδικασίες που δεν επιτρέπουν την παραγωγή της λειτουργικής πρωτεΐνης. Εντούτοις για το DPDPE που είναι δ-ειδικός αγωνιστής αναγνωρίστηκαν περιοχές μέτριας προς χαμηλής συγγένειας ενώ για τη διπρενορφίνη αναγνωρίστηκαν περιοχές χαμηλής συγγένειας πρόσδεσης. Συνολικά τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την πιθανή ύπαρξη κάποιας μορφής λειτουργικών υποδοχέων της τάξης  $\delta$  στα κύτταρα HepG2. Το γεγονός της απουσίας έκφρασης του υποδοχέα DOR στα κύτταρα HepG2, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο κλωνοποιημένος υποδοχέας εκτιμάται ότι είναι ο  $\delta_2$  υποδηλώνει, ότι τα κύτταρα HepG2 φέρουν υποδοχείς  $\delta_1$ . Τέλος με τα υπάρχοντα δεδομένα δεν μπορεί να αποκλειστεί η παρουσία υποδοχέων των υποτύπων  $\kappa_2$  και  $\kappa_3$  στα κύτταρα HepG2.

Τα συστήματα των οπιοειδών και της σωματοστατίνης επιδρούν σε παρόμοιες φυσιολογικές λειτουργίες και οι υποδοχείς σωματοστατίνης και οπιοειδών έχουν

παρόμοια δομή και έχει προταθεί πως προήλθαν από το ίδιο αρχέγονο γονίδιο (246;500). Διάφορες μελέτες έχουν περιγράψει αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε αυτά τα συστήματα (446;447;483-485;501-507). Πρόσδεση των οπιοειδών στους ssts και μάλιστα άσκηση της ανασταλτικής δράσης τους μέσω αυτών στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων έχει πρωτοπεριγραφεί στην κυτταρική σειρά από μαστό T47D (446;483-485). Έκτοτε έχει περιγραφεί αυτό το φαινόμενο και με άλλα οπιοειδή πεπτίδια σε άλλα πειραματικά μοντέλα. Από αυτές τις μελέτες φαίνεται πως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των δύο συστημάτων είναι εκτεταμένες και επομένως θα είναι χρήσιμο να μελετώνται ταυτόχρονα.

Για να εξεταστεί λοιπόν η πιθανότητα ρύθμισης της δράσης της EKC μέσω των υποδοχέων σωματοστατίνης, έγιναν δοκιμασίες δέσμευσης της EKC σε απομονωμένες μεμβράνες από κύτταρα HepG2, ελέγχοντας την ικανότητά της να εκτοπίζει την <sup>125</sup>I-Tyr<sup>11</sup>-SRIF-14 από τις θέσεις ειδικής δέσμευσης. Η EKC ανευρέθη ότι προσδένεται ειδικά στους υποδοχείς σωματοστατίνης, εμποδίζοντας την ειδική πρόσδεση της ραδιενεργού σωματοστατίνης και μάλιστα το αποτέλεσμα αυτό ήταν συγκρίσιμο με αυτό της οκτρεοτίδης. Επομένως η EKC θα μπορούσε να ασκεί το αντιπολλαπλασιαστικό της αποτέλεσμα μέσω των υποδοχέων σωματοστατίνης. Με τον τρόπο αυτό ερμηνεύεται και η αδυναμία αναστολής του αποτελέσματός της στα κύτταρα HepG2 από την διπρενορφίνη.

Δεδομένου ότι η EKC προσδενόταν στους υποδοχείς σωματοστατίνης, και πιθανόν ασκούσε το αντιπολλαπλασιαστικό της αποτέλεσμα μέσω αυτών θα έπρεπε να χρησιμοποιούσε και τα ίδια ενδοκυττάρια μονοπάτια με την οκτρεοτίδη. Το ίδιο ακριβώς φαινόμενο έχει περιγραφεί με το κυκλικό πενταπεπτίδιο cCD-2 το οποίο πρόκυπτε από την β-κασομορφίνη-5 και το οποίο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό πολλών κυτταρικών σειρών *in vitro*, ανεξάρτητα από τους υποδοχείς οπιοειδών. Το πεπτίδιο αυτό συνδέεται ειδικά με τους υποδοχείς σωματοστατίνης (πιθανόν πιο ειδικά με τον sst<sub>1</sub>) και επάγει την δραστηριότητα των πρωτεϊνικών φωσφοτυροσινικών φωσφατασών και συγκεκριμένα τόσο της SHP-1 όσο και της SHP-2 (504). Για αυτό το λόγο μελετήθηκε την επίδραση της αναστολής του μονοπατιού των πρωτεϊνικών φωσφοτυροσινικών φωσφατασών στο αποτέλεσμα της EKC. Το sodium orthovanadate προκάλεσε και στην περίπτωση της

EKC δόσοεξαρτώμενη μείωση της επίδρασής της στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 και η αντιστροφή του φαινομένου μάλιστα ήταν ανάλογη με αυτήν που παρατηρήθηκε στην περίπτωση της οκτρεοτίδης.

Ένα επιπλέον μονοπάτι που μελετήθηκε για τον τρόπο δράσης των οπιοειδών ήταν αυτό του NO. Μία σειρά από μελέτες αναφέρουν αλληλεπίδραση μεταξύ του συστήματος των οπιοειδών και αυτό του NO σε διάφορα όργανα. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι παράγοντες που σχετίζονται με το NO αναστέλλουν τη δράση της μορφίνης στην στεροειδογένεση (556) ενώ αναστολείς της συνθάσης του NO (NOS) αναστρέφουν τη δράση των οπιοειδών ανταγωνιστών (557) μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Επιπλέον, το NO και η L-αργινίνη ελαττώνουν την αποτελεσματικότητα της μορφίνης (558;559) μέσω τροποποίησης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του cGMP χωρίς να επηρεάζει τη δέσμευση της στους υποδοχείς (560). Αντίθετα έχει βρεθεί ότι η μορφίνη προκαλεί άμεσα έκκριση NO στον καρδιακό κόλπο (561) ενώ στο αγγειακό ενδοθήλιο βρέθηκε ότι ο μ οπιοειδής υποδοχέας δρα τουλάχιστον μερικώς μετά από σύζευξη με τις NOS (562;563). Παράγοντες που προκαλούν απελευθέρωση του NO εμποδίζουν την δημιουργία εθισμού στα οπιοειδή (564;565) και έχουν χρησιμοποιηθεί πειραματικά ως αγωγή στο σύνδρομο στέρησης των οπιοειδών. Μ οπιοειδείς υποδοχείς συνεντοπίζονται στο νευρικό σύστημα αρουραίου με την ανοσοδραστικότητα συνθάσης του NO (566). Τέλος, ο U-50488H, ένας κάππα οπιοειδής αγωνιστής αναστέλλει τη δραστηριότητα της nNOS in vitro (560). Επίσης έχει περιγραφεί άμεση ανασταλτική επίδραση των οπιοειδών στην NOS (481).

Όλα τα οπιοειδή προκάλεσαν δόσοεξαρτώμενη αύξηση των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού του NO. Η αύξηση και σε αυτή την περίπτωση ήταν αντιστρόφως ανάλογη της μείωσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, έχει περιγραφεί πως η επαγωγή του NO δεν είναι απαραίτητη για την πρόκληση απόπτωσης σε ένα σύστημα στο οποίο είχε παρατηρηθεί αύξηση του μονοξειδίου του αζώτου και απόπτωση (526). Όπως με την οκτρεοτίδη, έτσι και με την EKC η συνκαλλιέργεια με L-NAME ( $10^{-3}$ M) δεν είχε επίδραση στην ικανότητα της να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2.

Συνοψίζοντας, τα συνθετικά οπιοειδή και η aS1-κασομορφίνη αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν υποδοχείς KOR, δίχως να έχουν όμως ανιχνεύσιμες περιοχές δέσμευσης τύπου κ<sub>1</sub>. Δεν αποκλείεται όμως να έχουν υποδοχείς δ<sub>1</sub> ή ακόμα κ<sub>2</sub> και κ<sub>3</sub>. Η επίδραση της EKC στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 δεν εξαρτάται από υποδοχείς οπιοειδών αλλά πιθανόν ρυθμίζεται μέσω πρόσδεσης της και ενεργοποίησης των ssts. Επίσης εξαρτάται από τις φωσφοτυροσινικές φωσφατάσες όπως και η οκτρεοτίδη. Τέλος τα οπιοειδή αυξάνουν την παραγωγή τελικών προϊόντων του μεταβολισμού του NO. Ωστόσο στην περίπτωση της EKC, όπως και με την οκτρεοτίδη, πρόκειται για φαινόμενο το οποίο δεν είναι απαραίτητο για την πρόκληση του αντιπολλαπλασιαστικού αποτελέσματος.

#### 4. Επίλογος και μελλοντικές προοπτικές

Τα κύτταρα HepG2 αποτέλεσαν ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον μοντέλο μελέτης τόσο της δράσης της οκτρεοτίδης στο ΗΚΚ, όσο και της βιολογίας του συτήματος των υποδοχέων σωματοστατίνης.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σύμφωνα με εκείνα της *in vivo* μελέτης της θεραπευτικής χρήσης της οκτρεοτίδης στο ΗΚΚ ενώ επιπλέον χαρακτηρίστηκε και το μονοπάτι των φωσφοτυροσινικών φωσφατάσων ως το ενδοκυττάριο σύστημα κλειδί για την πρόκληση του αντιπολλαπλασιαστικού αποτελέσματος της οκτρεοτίδης.

Η παραγωγή CST από τα κύτταρα αυτά και ο πιθανός ρόλος της στην αυτοκρινή ρύθμιση της κυκλοφορίας των υποδοχέων σωματοστατίνης αποτέλεσε ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον εύρημα με σαφής προεκτάσεις για τον ρόλο του φυσικού αυτού πεπτιδίου στην βιολογία των υποδοχέων ssts. Επιπλέον έγινε δυνατή για πρώτη φορά η ποσοτικοποίηση της παραγωγής της CST17.

Τέλος τα οπιοειδή, αυτά τα τόσο συγγενή προς το συστημα της σωματοστατίνης πεπτίδια, βρέθηκαν να έχουν αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα στα κύτταρα HepG2 και μάλιστα η EKC βρέθηκε ότι πιθανότατα δρα μέσω πρόσδεσης στους υποδοχείς

σωματοστατίνης και ενεργοποίησης του συστήματος των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών.

Μια μελέτη είναι πλήρης όταν απαντάει στα ερωτήματα τα οποία έχει θέσει αρχικά ενώ ταυτόχρονα δημιουργεί ερεθίσματα για περαιτέρω έρευνα. Μελλοντικές μελέτες που θα μπορούσαν να γίνουν επί τη βάση των αποτελεσμάτων της παρούσας είναι:

1. Μελέτες πολλαπλασιασμού με ανάλογα SRIF ειδικά για κάθε υποτύπο sst.
2. Μελέτες πολλαπλασιασμού με συνδιασμούς οκτρεοτίδης με αναστολείς των ssts που έχουν περιγραφεί πρόσφατα.
3. Δοκιμή νέων αναλόγων (π.χ. SOM230).
4. Ποσοτικοποίηση της ενεργοποίησης των PTPs από τα διάφορα ανάλογα.
5. Μελέτες παραγόντων που τροποποιούν την έκφραση και την ενδοκυττάρια κυκλοφορία των ssts στο ΗΚΚ.
6. Μελέτες επίδρασης της οκτρεοτίδης ή άλλων αναλόγων σωματοστατίνης στον πολλαπλασιασμό άλλων κυτταρικών σειρών ΗΚΚ.
7. Ανίχνευση των παραγόντων που επηρεάζουν την παραγωγή CST από τα κύτταρα HepG2.
8. Μελέτη της έκφρασης και παραγωγής CST από τους διάφορους τύπους κυττάρων του φυσιολογικού ήπατος.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) είναι ένα νεόπλασμα η επίπτωση του οποίου αυξάνεται παγκοσμίως. Αντιπροσωπεύει πάνω από το 5% όλων των καρκίνων και ο κατ'εκτίμηση ετήσιος αριθμός των περιπτώσεων υπερβαίνει τις 500.000. Εάν το ΗΚΚ εντοπίζεται σε αρχικά στάδια, οι ασθενείς πρέπει να προγραμματιστούν για οποιαδήποτε από τις διαθέσιμες επιλογές που μπορούν να παρέχουν ένα υψηλό ποσοστό ίασης. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό δεν έχουν περιγραφεί γενικά αποδεκτές θεραπείες με καλά αποτελέσματα και οι ασθενείς πρέπει να συμπεριλαμβάνονται σε ερευνητικά πρωτόκολλα, κατά προτίμηση τυφλές τυχαιοποιημένες μελέτες, που στοχεύουν να προσδιορίσουν νέες θεραπείες που μπορεί τελικά να οδηγήσουν σε μια βελτίωση της επιβίωσης. Πρόσφατα μια ελεγχόμενη τυχαιοποιημένη μελέτη για την εφαρμογή του αναλόγου της σωματοστατίνης οκτρεοτίδη για την θεραπεία του ανεγχείρητου ΗΚΚ έχει καταδείξει ένα σημαντικό όφελος επιβίωσης για τους θεραπευθέντες ασθενείς. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής παρέχουν στοιχεία σχετικά με τον ρόλο των συστημάτων της σωματοστατίνης και των των οπιοειδών στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

Στα κύτταρα HepG2 βρέθηκε με RT-PCR ότι παράγουν mRNA για τους υποτύπους υποδοχέων σωματοστατίνης  $sst_2$ ,  $sst_3$  και  $sst_5$ . Ανοσοϊστοχημικές μελέτες επιβεβαίωσαν την παρουσία  $sst_2$ ,  $sst_3$  και  $sst_5$  στα κύτταρα HepG2, και μάλιστα βρέθηκε ότι ο  $sst_2$  αντιστοιχούσε στον υποτύπο  $sst_{2A}$ . Οι υποδοχείς σωματοστατίνης στα κύτταρα HepG2 βρέθηκαν να εντοπίζονται κυρίως ενδοκυττάρια και ο τρόπος κατανομής των τριών υποδοχέων ήταν διαφορετικός για καθένα από αυτούς, υποδηλώνοντας διαφορετικούς μηχανισμούς ρύθμισης της κυκλοφορίας των διαφορετικών υποτύπων. Δοκιμασίες δέσμευσης επέτρεψαν τον χαρακτηρισμό λειτουργικών υποδοχέων στην μεμβράνη των κυττάρων HepG2 που ανήκαν όμως κυρίως στους υποτύπους  $sst_3$  και  $sst_5$  ενώ ανιχνεύθηκαν ελάχιστοι υποδοχείς του υποτύπου  $sst_2$ .

Η οκτρεοτίδη προσδενόταν ειδικά στους υποδοχείς  $sst_3$  των κυττάρων HepG2. Επιπλέον η οκτρεοτίδη βρέθηκε ότι αναστέλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο και σε συγκεντρώσεις που μπορούν να επιτευχθούν

στο αίμα ασθενών που λαμβάνουν αγωγή με οκτρεοτίδη για την θεραπεία ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Η αναστολή του μονοπατιού των Πρωτεϊνικών Φωσφοτυροσινικών Φωσφατασών (PTPs) αντέστρεψε με δοσοεξαρτώμενο τρόπο το αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της οκτρεοτίδης.

Η ενδοκυττάρια θέση των υποδοχέων ssts οδήγησε στην υποψία παραγωγής κάποιου σωματοστατινεργικού πεπτιδίου από τα κύτταρα HepG2 το οποίο ρύθμιζε την θέση τους με αυτοκρινή τρόπο. Τα κύτταρα HepG2 βρέθηκε ότι εκφράζουν και παράγουν το σωματοστατινεργικό πεπτίδιο κορτιστατίνη αλλά όχι σωματοστατίνη Η επιπλέον χορήγηση CST17 στα κύτταρα HepG2 δεν έχει επίδραση στον πολλαπλασιασμό τους ενώ η εξωκυττάρια δέσμευσή της οδηγούσε σε μείωση του.

Τα οπιοειδή EKC,  $\alpha$ S1-casomorphin, DADLE και DAGO βρέθηκε ότι επίσης αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2. Η EKC και  $\alpha$ S1-casomorphin ήταν τα πιο δραστικά οπιοειδή. Επίσης η αντιπολλαπλασιαστική δράση της EKC δεν αναστέλλονταν από τον γενικό αναστολέα των οπιοειδών διπρενορφίνη.

Τα κύτταρα HepG2 βρέθηκαν να εκφράζουν mRNA μόνο για τον κλωνοποιημένο υποδοχέα KOR ( $\kappa_1$ ) ενώ δεν ανιχνεύθηκαν οι DOR ( $\delta_2$ ) και MOR ( $\mu_1$  και  $\mu_2$ ). Ωστόσο δεν ανιχνεύθηκαν θέσεις πρόδεσης τύπου  $\kappa_1$  αλλά λειτουργικοί υποδοχείς που πιθανότατα ανήκουν στην υποκατηγορία  $\delta_1$  ενώ δεν μπορεί να αποκλειστεί η παρουσία υποδοχέων των υποτύπων  $\kappa_2$  και  $\kappa_3$ .

Η αδυναμία αναστολής της δράσης της EKC στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων από την διπρενορφίνη σε συνδυασμό με παρουσία μόνο χαμηλής συγγένειας υποδοχέων οπιοειδών στα κύτταρα HepG2, δημιουργούσε υποψίες περί της δράσης της EKC μέσω των υποδοχέων σωματοστατίνης. Η EKC ανευρέθη ότι προσδένεται ειδικά στους υποδοχείς σωματοστατίνης και πιθανώς ασκεί το αντιπολλαπλασιαστικό της αποτέλεσμα μέσω αυτών ενώ η αναστολή των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών αντέστρεφε τη δράση της στα κύτταρα HepG2.

Ακόμα, η οκτρεοτίδη και τα οπιοειδή βρέθηκε ότι αυξάνουν την παραγωγή των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού του μονοξειδίου του αζώτου από τα κύτταρα



HepG2 αλλά η αύξηση αυτή δεν σχετιζόταν με το αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα των ουσιών αυτών.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σύμφωνα με εκείνα της *in vivo* μελέτης της θεραπευτικής χρήσης της οκτρεοτίδης στο ΗΚΚ ενώ επιπλέον χαρακτηρίστηκε και το μονοπάτι των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών ως το ενδοκυττάριο σύστημα κλειδί για την πρόκληση του αντιπολλαπλασιαστικού αποτελέσματος της οκτρεοτίδης. Η παραγωγή CST από τα κύτταρα αυτά και ο πιθανός ρόλος της στην αυτοκρινή ρύθμιση της κυκλοφορίας των υποδοχέων σωματοστατίνης αποτελεί ένα ενδιαφέρον εύρημα με σαφείς προεκτάσεις για τον ρόλο του φυσικού αυτού πεπτιδίου στην βιολογία των υποδοχέων *ssts*. Επιπλέον έγινε δυνατή για πρώτη φορά η ποσοτικοποίηση της παραγωγής της CST17. Τέλος τα οπιοειδή, αυτά τα τόσο συγγενή προς το σύστημα της σωματοστατίνης πεπτίδια, βρέθηκαν να έχουν αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα στα κύτταρα HepG2 και μάλιστα η ΕΚC βρέθηκε ότι πιθανότατα δρα μέσω πρόσδεσης στους υποδοχείς σωματοστατίνης και ενεργοποίησης του συστήματος των φωσφοτυροσινικών φωσφατασών.

## SUMMARY

Hepatocellular carcinoma (HCC) represents more than 5% of all cancers and the estimated annual number of cases exceeds 500,000. It is also estimated to be the seventh most common cancer in men and the ninth in women. Patients with HCC tumours that are inoperable have an unfavourable natural course despite various therapeutic modalities. Such patients should be included in prospective investigations aiming to identify therapies that ultimately may lead to a survival improvement. Recently, a randomized controlled trial of octreotide in the treatment of advanced HCC has shown a significant survival benefit in the treated patients. The results of the present thesis provide data in regard to the role of the somatostatin and opioid systems in hepatocellular carcinoma.

HepG2 cells were found to express mRNA for the subtypes *sst*<sub>2</sub>, *sst*<sub>3</sub> and *sst*<sub>5</sub> of the somatostatin receptors (sst). Immunocytochemistry verified the presence of these receptors on HepG2 cells and *sst*<sub>2</sub> was found to be of the *sst*<sub>2A</sub> variant.

Ssts were found to be located mainly intracellularly in HepG2 cells and the pattern of distribution of the three subtypes was unique and characteristic for each one of them, implying different mechanisms of regulation of each subtype. Binding assays led to the characterization of functional receptors in the membranes of HepG2 cells that belong mainly in the *sst*<sub>3</sub> and *sst*<sub>5</sub> subtypes while minimal *sst*<sub>2</sub> binding sites were detected.

Octreotide was found to bind specifically to the ssts present on HepG2 cells membranes. Furthermore octreotide was found to inhibit the proliferation of HepG2 cells in a dose dependent manner and in concentrations that can be achieved in the blood of patients receiving octeotide for the treatment of HCC. Inhibition of the Protein Tyrosine Phosphatases pathway (PTPs) blocked the antiproliferative effect of octreotide in a dose-dependent manner.

The mainly intracellular localization of ssts in HepG2 cells led to the suspicion that this cell line produces a somatostatinergic peptide which regulates ssts in an autocrine manner. HepG2 cells were found to express and produce cortistatin (CST) but not somatostatin (SRIF). Incubation of HepG2 cells with additional CST did not have an

effect in their proliferation while extracellular binding of CST with the use of a specific antibody led to a significant inhibition of cellular proliferation.

The opioids EKC, aS1-casomorphin, DADLE and DAGO were also found to inhibit the proliferation of HepG2 cells. EKC and aS1-casomorphin were the most effective opioid agonists. The antiproliferative effect of EKC could not be blocked by the general opioid inhibitor diproenorphine.

HepG2 cells were found to express mRNA for the cloned receptor KOR ( $\kappa_1$ ) while no DOR ( $\delta_2$ ) or MOR ( $\mu_1$  and  $\mu_2$ ) mRNA transcripts were detected. However no  $\kappa_1$  functional binding sites were detected on HepG2 cells. Furthermore probable  $\delta_1$  binding sites were detected but the presence  $\kappa_2$  and  $\kappa_3$  binding sites cannot be excluded.

The inability of diproenorphine to block the antiproliferative effect of EKC in combination with presence of only low affinity opioid receptors in HepG2 cells, led us to the study of possible interaction of EKC with ssts. EKC was found to bind specifically on the ssts present on HepG2 cells. It is therefore possible that EKC exerts its antiproliferative effect via these receptors. Inhibition of PTPs, like in the case of octreotide, blocked EKC's effect on cellular proliferation.

Octreotide and opioids were found to induce the production of nitric oxide metabolites from HepG2 cells, but this induction was not related to the antiproliferative effect of these substances.

In conclusion the results of the present study are in accordance with those of the in vivo trial of octreotide for the treatment of HCC. They also characterize PTPs as a key intracellular pathway for the regulation of octreotide's antiproliferative effect. CST production and its possible role in the autocrine regulation of ssts in HepG2 cells, is an interesting result that gives further insight on the role of this natural peptide on the biology of ssts. Moreover in this study we report for the first time a method for the quantification of CST production. Finally opioids were found to have antiproliferative effects on HepG2 cells and in particular EKC which was also found to act via binding to ssts and activating the PTPs pathway.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bosch FX, Ribes J, Borrás J. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 271-85.
2. El Serag HB. Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: S72-S78.
3. El Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999; 340: 745-50.
4. Bosch FX, Ribes J. Epidemiology of liver cancer in Europe. *Can J Gastroenterol* 2000; 14: 621-30.
5. Zaman SN, Melia WM, Johnson RD, Portmann BC, Johnson PJ, Williams R. Risk factors in development of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: prospective study of 613 patients. *Lancet* 1985; 1: 1357-60.
6. Kew MC. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 2002; 181-182: 35-8.
7. McGlynn KA, Tsao L, Hsing AW, Devesa SS, Fraumeni JF, Jr. International trends and patterns of primary liver cancer. *Int J Cancer* 2001; 94: 290-6.
8. Poynard T, Aubert A, Lazizi Y, Bedossa P, Hamelin B, Terris B, Naveau S, Dubreuil P, Pillot J, Chaput JC. Independent risk factors for hepatocellular carcinoma in French drinkers. *Hepatology* 1991; 13: 896-901.
9. Colombo M, de Franchis R, Del Ninno E, Sangiovanni A, De Fazio C, Tommasini M, Donato MF, Piva A, Di C, V, Dioguardi N. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1991; 325: 675-80.
10. Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, Nakao M, Yabuuchi T, Kitamura T, Nakanishi K, Fujimoto I, Inoue A, Yamazaki H. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* 1993; 328: 1797-801.
11. Fattovich G, Giustina G, Schalm SW, Hadziyannis S, Sanchez-Tapias J, Almasio P, Christensen E, Krogsgaard K, Degos F, Carneiro dM. Occurrence of hepatocellular carcinoma and decompensation in western European patients with cirrhosis type B. The EUROHEP Study Group on Hepatitis B Virus and Cirrhosis. *Hepatology* 1995; 21: 77-82.
12. Yeh FS, Yu MC, Mo CC, Luo S, Tong MJ, Henderson BE. Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in southern Guangxi, China. *Cancer Res* 1989; 49: 2506-9.
13. Liaw YF, Tai DI, Chu CM, Lin DY, Sheen IS, Chen TJ, Pao CC. Early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic type B hepatitis. A prospective study. *Gastroenterology* 1986; 90: 263-7.
14. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981; 2: 1129-33.
15. Sakuma K, Saitoh N, Kasai M, Jitsukawa H, Yoshino I, Yamaguchi M, Nobutomo K, Yamumi M, Tsuda F, Komazawa T. Relative risks of death due to liver disease among Japanese male adults having various statuses for hepatitis B s and e antigen/antibody in serum: a prospective study. *Hepatology* 1988; 8: 1642-6.
16. Bruno S, Silini E, Crosignani A, Borzio F, Leandro G, Bono F, Asti M, Rossi S, Larghi A, Cerino A, Podda M, Mondelli MU. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* 1997; 25: 754-8.
17. Degos F, Christidis C, Ganne-Carrie N, Farmachidi JP, Degott C, Guettier C, Trinchet JC, Beaugrand M, Chevret S. Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death. *Gut* 2000; 47: 131-6.
18. Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, Stremmel W, Trampisch HJ, Strohmeyer G. Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 1985; 313: 1256-62.
19. Jones DE, Metcalf JV, Collier JD, Bassendine MF, James OF. Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis and its impact on outcomes. *Hepatology* 1997; 26: 1138-42.
20. Mori M, Hara M, Wada I, Hara T, Yamamoto K, Honda M, Naramoto J. Prospective study of hepatitis B and C viral infections, cigarette smoking, alcohol consumption, and other factors associated with hepatocellular carcinoma risk in Japan. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 131-9.

21. Oral contraceptives and liver cancer. Results of the Multicentre International Liver Tumor Study (MILTS). *Contraception* 1997; 56: 275-84.
22. Okuda K, Obata H, Nakajima Y, Ohtsuki T, Okazaki N, Ohnishi K. Prognosis of primary hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1984; 4: 3S-6S.
23. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology* 1998; 28: 751-5.
24. Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 329-38.
25. Kudo M, Chung H, Osaki Y. Prognostic staging system for hepatocellular carcinoma (CLIP score): its value and limitations, and a proposal for a new staging system, the Japan Integrated Staging Score (JIS score). *J Gastroenterol* 2003; 38: 207-15.
26. Farinati F, Rinaldi M, Gianni S, Naccarato R. How should patients with hepatocellular carcinoma be staged? Validation of a new prognostic system. *Cancer* 2000; 89: 2266-73.
27. Levy I, Sherman M. Staging of hepatocellular carcinoma: assessment of the CLIP, Okuda, and Child-Pugh staging systems in a cohort of 257 patients in Toronto. *Gut* 2002; 50: 881-5.
28. Ueno S, Tanabe G, Sako K, Hiwaki T, Hokotate H, Fukukura Y, Baba Y, Imamura Y, Aikou T. Discrimination value of the new western prognostic system (CLIP score) for hepatocellular carcinoma in 662 Japanese patients. *Cancer of the Liver Italian Program. Hepatology* 2001; 34: 529-34.
29. Sugano S, Miyoshi K, Suzuki T, Kawafune T, Kubota M. Intrahepatic arteriovenous shunting due to hepatocellular carcinoma and cirrhosis, and its change by transcatheter arterial embolization. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 184-8.
30. Kew MC, Dos Santos HA, Sherlock S. Diagnosis of primary cancer of the liver. *Br Med J* 1971; 4: 408-11.
31. Bruix J, Castells A, Calvet X, Feu F, Bru C, Sole M, Bruguera M, Rodes J. Diarrhea as a presenting symptom of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 681-5.
32. Kew MC. Tumors of the liver. In: *Hepatology: A textbook of liver disease*. Philadelphia: WB Saunders, AS, 1996;1513.
33. Gregory B, Ho VC. Cutaneous manifestations of gastrointestinal disorders. Part I. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26: 153-66.
34. Lai EC, Ng IO, Ng MM, Lok AS, Tam PC, Fan ST, Choi TK, Wong J. Long-term results of resection for large hepatocellular carcinoma: a multivariate analysis of clinicopathological features. *Hepatology* 1990; 11: 815-8.
35. Gogel BM, Goldstein RM, Kuhn JA, McCarty TM, Donahoe A, Glastad K. Diagnostic evaluation of hepatocellular carcinoma in a cirrhotic liver. *Oncology (Huntingt)* 2000; 14: 15-20.
36. Borzio M, Fargion S, Borzio F, Fracanzani AL, Croce AM, Stroffolini T, Oldani S, Cotichini R, Roncalli M. Impact of large regenerative, low grade and high grade dysplastic nodules in hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol* 2003; 39: 208-14.
37. Collier J, Sherman M. Screening for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 27: 273-8.
38. Wu JT. Serum alpha-fetoprotein and its lectin reactivity in liver diseases: a review. *Ann Clin Lab Sci* 1990; 20: 98-105.
39. Lok AS, Lai CL. alpha-Fetoprotein monitoring in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection: role in the early detection of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1989; 9: 110-5.
40. Chen DS, Sung JL, Sheu JC, Lai MY, How SW, Hsu HC, Lee CS, Wei TC. Serum alpha-fetoprotein in the early stage of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1984; 86: 1404-9.
41. Fasani P, Sangiovanni A, De Fazio C, Borzio M, Bruno S, Ronchi G, Del Ninno E, Colombo M. High prevalence of multinodular hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis attributable to multiple risk factors. *Hepatology* 1999; 29: 1704-7.
42. Gupta S, Bent S, Kohlwes J. Test characteristics of alpha-fetoprotein for detecting hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C. A systematic review and critical analysis. *Ann Intern Med* 2003; 139: 46-50.
43. John TG, Garden OJ. Needle track seeding of primary and secondary liver carcinoma after percutaneous liver biopsy. *HPB Surg* 1993; 6: 199-203.

44. Durand F , Regimbeau JM, Belghiti J, Sauvanet A, Vilgrain V, Terris B, Moutardier V, Farges O, Valla D. Assessment of the benefits and risks of percutaneous biopsy before surgical resection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2001; 35: 254-8.
45. Robbins S, Kumar V. *Basic Pathology*. Philadelphia: WB Saunders, 1987;598.
46. Serfaty L, Aumaitre H, Chazouilleres O, Bonnand AM, Rosmorduc O, Poupon RE, Poupon R. Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 1998; 27 : 1435-40.
47. Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, Solinas A, Mura D, Brouwer JT, Thomas H, Njapoum C, Casarin C, Bonetti P, Fuschi P, Basho J, Tocco A, Bhalla A, Galassini R, Noventa F, Schalm SW, Realdi G. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997; 112: 463-72.
48. Bonis PA , Tong MJ, Blatt LM, Conrad A, Griffith JL. A predictive model for the development of hepatocellular carcinoma, liver failure, or liver transplantation for patients presenting to clinic with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1605-12.
49. Larcos G , Sorokopud H, Berry G, Farrell GC. Sonographic screening for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis or cirrhosis: an evaluation. *AJR Am J Roentgenol* 1998; 171: 433-5.
50. Saab S, Ly D, Nieto J, Kanwal F, Lu D, Raman S, Amado R, Nuesse B, Durazo F, Han S, Farmer DG, Ghobrial RM, Yersiz H, Chen P, Schweigel K, Goldstein LI, Tong M, Busuttil RW. Hepatocellular carcinoma screening in patients waiting for liver transplantation: a decision analytic model. *Liver Transpl* 2003; 9: 672-81.
51. Sherman M, Peltekian KM, Lee C. Screening for hepatocellular carcinoma in chronic carriers of hepatitis B virus: incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in a North American urban population. *Hepatology* 1995; 22: 432-8.
52. Pateron D, Ganne N, Trinchet JC, Aourousseau MH, Mal F, Meicler C, Coderc E, Reboullet P, Beaugrand M. Prospective study of screening for hepatocellular carcinoma in Caucasian patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1994; 20: 65-71.
53. Yuen MF, Cheng CC, Lauder IJ, Lam SK, Ooi CG, Lai CL. Early detection of hepatocellular carcinoma increases the chance of treatment: Hong Kong experience. *Hepatology* 2000; 31: 330-5.
54. Oka H, Tamori A, Kuroki T, Kobayashi K, Yamamoto S. Prospective study of alpha-fetoprotein in cirrhotic patients monitored for development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994; 19: 61-6.
55. Llovet JM, Bruix J, Gores GJ. Surgical resection versus transplantation for early hepatocellular carcinoma: clues for the best strategy. *Hepatology* 2000; 31: 1019-21.
56. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodes J. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. *European Association for the Study of the Liver. J Hepatol* 2001; 35: 421-30.
57. Vauthey JN, Marsh RW, Davis GL. Treatment of unresectable hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1995; 333: 877.
58. Vauthey JN, Klimstra D, Franceschi D, Tao Y, Fortner J, Blumgart L, Brennan M. Factors affecting long-term outcome after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 1995; 169: 28-34.
59. Bruix J, Castells A, Bosch J, Feu F, Fuster J, Garcia-Pagan JC, Visa J, Bru C , Rodes J. Surgical resection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: prognostic value of preoperative portal pressure. *Gastroenterology* 1996; 111: 1018-22.
60. Sugioka A, Tsuzuki T, Kanai T. Postresection prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Surgery* 1993; 113: 612-8.
61. Primary liver cancer in Japan. Clinicopathologic features and results of surgical treatment. *Liver Cancer Study Group of Japan. Ann Surg* 1990; 211: 277-87.
62. Lai CL, Ng RP, Lok AS. The diagnostic value of the ratio of serum gamma-glutamyl transpeptidase to alkaline phosphatase in alcoholic liver disease. *Scand J Gastroenterol* 1982; 17: 41-7.
63. Choi TK, Edward CS, Fan ST, Francis PT, Wong J. Results of surgical resection for hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1990; 37: 172-5.

64. Paquet KJ, Koussouris P, Mercado MA, Kalk JF, Muting D, Rambach W. Limited hepatic resection for selected cirrhotic patients with hepatocellular or cholangiocellular carcinoma: a prospective study. *Br J Surg* 1991; 78: 459-62.
65. Franco D, Capussotti L, Smadja C, Bouzari H, Meakins J, Kemeny F, Grange D, Dellepiane M. Resection of hepatocellular carcinomas. Results in 72 European patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 1990; 98: 733-8.
66. Pereira SP, Williams R. Limits to liver transplantation in the UK. *Gut* 1998; 42: 883-5.
67. Bismuth H, Majno P, Adam R. Hepatocellular carcinoma: from ethanol injection to liver transplantation. *Acta Gastroenterol Belg* 1999; 62: 330-41.
68. Bismuth H, Majno PE, Adam R. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 311-22.
69. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 693-9.
70. Wall WJ. Liver transplantation for hepatic and biliary malignancy. *Semin Liver Dis* 2000; 20: 425-36.
71. Prieto M, Berenguer M, Rayon JM, Cordoba J, Arguello L, Carrasco D, Garcia-Herola A, Olaso V, De Juan M, Gobernado M, Mir J, Berenguer J. High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: relationship with rejection episodes. *Hepatology* 1999; 29: 250-6.
72. Feray C, Caccamo L, Alexander GJ, Ducot B, Gugenheim J, Casanovas T, Loinaz C, Gigou M, Burra P, Barkholt L, Esteban R, Bizollon T, Lerut J, Minello-Franza A, Bernard PH, Nachbaur K, Botta-Fridlund D, Bismuth H, Schalm SW, Samuel D. European collaborative study on factors influencing outcome after liver transplantation for hepatitis C. European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP) Group. *Gastroenterology* 1999; 117: 619-25.
73. Livraghi T, Festi D, Monti F, Salmi A, Vettori C. US-guided percutaneous alcohol injection of small hepatic and abdominal tumors. *Radiology* 1986; 161: 309-12.
74. Shiina S, Tagawa K, Niwa Y, Unuma T, Komatsu Y, Yoshiura K, Hamada E, Takahashi M, Shiratori Y, Terano A. Percutaneous ethanol injection therapy for hepatocellular carcinoma: results in 146 patients. *AJR Am J Roentgenol* 1993; 160: 1023-8.
75. Livraghi T, Giorgio A, Marin G, Salmi A, de S, I, Bolondi L, Pompili M, Brunello F, Lazzaroni S, Torzilli G. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. *Radiology* 1995; 197: 101-8.
76. Vilana R, Bruix J, Bru C, Ayuso C, Sole M, Rodes J. Tumor size determines the efficacy of percutaneous ethanol injection for the treatment of small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1992; 16: 353-7.
77. Ishii H, Okada S, Nose H, Okusaka T, Yoshimori M, Takayama T, Kosuge T, Yamasaki S, Sakamoto M, Hirohashi S. Local recurrence of hepatocellular carcinoma after percutaneous ethanol injection. *Cancer* 1996; 77: 1792-6.
78. Castellano L, Calandra M, Del Vecchio BC, de S, I. Predictive factors of survival and intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma in cirrhosis after percutaneous ethanol injection: analysis of 71 patients. *J Hepatol* 1997; 27: 862-70.
79. Goldberg SN, Gazelle GS, Solbiati L, Livraghi T, Tanabe KK, Hahn PF, Mueller PR. Ablation of liver tumors using percutaneous RF therapy. *AJR Am J Roentgenol* 1998; 170: 1023-8.
80. Sato M, Watanabe Y, Ueda S, Sato N, Iseki S, Tachibana M, Akehi S, Kimura S. Two long-term survivors after microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma: a case report. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 1035-9.
81. Sato M, Watanabe Y, Ueda S, Iseki S, Abe Y, Sato N, Kimura S, Okubo K, Onji M. Microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1996; 110: 1507-14.
82. Wong WS, Patel SC, Cruz FS, Gala KV, Turner AF. Cryosurgery as a treatment for advanced stage hepatocellular carcinoma: results, complications, and alcohol ablation. *Cancer* 1998; 82: 1268-78.
83. Giorgio A, Tarantino L, de Stefano G, Farella N, Catalano O, Cusati B, Del Viscovo L, Alaia A, Caturelli E. Interstitial laser photocoagulation under ultrasound guidance of liver tumors: results in 104 treated patients. *Eur J Ultrasound* 2000; 11: 181-8.

84. Livraghi T, Goldberg SN, Lazzaroni S, Meloni F, Solbiati L, Gazelle GS. Small hepatocellular carcinoma: treatment with radio-frequency ablation versus ethanol injection. *Radiology* 1999; 210: 655-61.
85. Castells A, Bruix J, Bru C, Fuster J, Vilana R, Navasa M, Ayuso C, Boix L, Visa J, Rodes J. Treatment of small hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: a cohort study comparing surgical resection and percutaneous ethanol injection. *Hepatology* 1993; 18: 1121-6.
86. Soini Y, Virkajarvi N, Raunio H, Paakko P. Expression of P-glycoprotein in hepatocellular carcinoma: a potential marker of prognosis. *J Clin Pathol* 1996; 49: 470-3.
87. Sheu JC, Huang GT, Lee PH, Chung JC, Chou HC, Lai MY, Wang JT, Lee HS, Shih LN, Yang PM, . Mutation of p53 gene in hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Res* 1992; 52: 6098-100.
88. Huang CC , Wu MC, Xu GW, Li DZ, Cheng H, Tu ZX, Jiang HQ, Gu JR. Overexpression of the MDR1 gene and P-glycoprotein in human hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 262-4.
89. Caruso ML, Valentini AM. Overexpression of p53 in a large series of patients with hepatocellular carcinoma: a clinicopathological correlation. *Anticancer Res* 1999; 19: 3853-6.
90. Olweny CL, Toya T, Katongole-Mbidde E, Mugerwa J, Kyalwazi SK, Cohen H. Treatment of hepatocellular carcinoma with adriamycin. Preliminary communication. *Cancer* 1975; 36: 1250-7.
91. Chlebowski RT, Brzechwa-Adjukiewicz A, Cowden A, Block JB, Tong M, Chan KK. Doxorubicin (75 mg/m<sup>2</sup>) for hepatocellular carcinoma: clinical and pharmacokinetic results. *Cancer Treat Rep* 1984; 68: 487-91.
92. Lai CL, Wu PC, Chan GC, Lok AS, Lin HJ. Doxorubicin versus no antitumor therapy in inoperable hepatocellular carcinoma. A prospective randomized trial. *Cancer* 1988; 62: 479-83.
93. Porta C, Moroni M, Nastasi G, Arcangeli G. 5-Fluorouracil and d,l-leucovorin calcium are active to treat unresectable hepatocellular carcinoma patients: preliminary results of a phase II study. *Oncology* 1995; 52: 487-91.
94. Ellis PA , Norman A, Hill A, O'Brien ME, Nicolson M, Hickish T, Cunningham D. Epirubicin, cisplatin and infusional 5-fluorouracil (5-FU) (ECF) in hepatobiliary tumours. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 1594-8.
95. Taieb J, Bonyhay L, Golli L, Ducreux M, Boleslawski E, Tigaud JM, de Baere T, Mansourbakht T, Delgado MA, Hannoun L, Poynard T, Boige V. Gemcitabine plus oxaliplatin for patients with advanced hepatocellular carcinoma using two different schedules. *Cancer* 2003; 98: 2664-70.
96. Yang TS, Lin YC, Chen JS, Wang HM, Wang CH. Phase II study of gemcitabine in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 750-6.
97. Aguayo A , Patt YZ. Nonsurgical treatment of hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol* 2001; 28: 503-13.
98. Lai CL, Lau JY, Wu PC, Ngan H, Chung HT, Mitchell SJ, Corbett TJ, Chow AW, Lin HJ. Recombinant interferon-alpha in inoperable hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial. *Hepatology* 1993; 17: 389-94.
99. Llovet JM, Sala M, Castells L, Suarez Y, Vilana R, Bianchi L, Ayuso C, Vargas V, Rodes J, Bruix J. Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 31: 54-8.
100. Leung TW, Patt YZ, Lau WY, Ho SK, Yu SC, Chan AT, Mok TS, Yeo W, Liew CT, Leung NW, Tang AM, Johnson PJ. Complete pathological remission is possible with systemic combination chemotherapy for inoperable hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1676-81.
101. Leung TW, Tang AM, Zee B, Yu SC, Lai PB, Lau WY, Johnson PJ. Factors predicting response and survival in 149 patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated by combination cisplatin, interferon-alpha, doxorubicin and 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer* 2002; 94: 421-7.
102. Kardinal CG, Moertel CG, Wieand HS, Schutt AJ, O'Connell MJ, Wright K, Wiesenfeld M, Tschetter LK, Krook JE. Combined doxorubicin and alpha-interferon therapy of advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1993; 71: 2187-90.
103. Patt YZ , Hassan MM, Lozano RD, Brown TD, Vauthey JN, Curley SA, Ellis LM. Phase II trial of systemic continuous fluorouracil and subcutaneous recombinant interferon Alfa-2b for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2003; 21: 421-7.



104. Castells A, Bruix J, Bru C, Ayuso C, Roca M, Boix L, Vilana R, Rodes J. Treatment of hepatocellular carcinoma with tamoxifen: a double-blind placebo-controlled trial in 120 patients. *Gastroenterology* 1995; 109: 917-22.
105. Tamoxifen in treatment of hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. CLIP Group (Cancer of the Liver Italian Programme). *Lancet* 1998; 352: 17-20.
106. Cheng AL, Yeh KH, Fine RL, Chuang SE, Yang CH, Wang LH, Chen DS. Biochemical modulation of doxorubicin by high-dose tamoxifen in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 1955-60.
107. Cheng AL, Chen YC, Yeh KH, Chuang SE, Chen BR, Chen DS. Chronic oral etoposide and tamoxifen in the treatment of far-advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 872-7.
108. Raderer M, Pidlich J, Muller C, Pfeffel F, Kornek GV, Hejna M, Scheithauer W. A phase I/II trial of epirubicin and high dose tamoxifen as a potential modulator of multidrug resistance in advanced hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2366-8.
109. Villa E, Ferretti I, Grottola A, Buttafoco P, Buono MG, Giannini F, Manno M, Bertani H, Dugani A, Manenti F. Hormonal therapy with megestrol in inoperable hepatocellular carcinoma characterized by variant oestrogen receptors. *Br J Cancer* 2001; 84: 881-5.
110. Farinati F, Gianni S, De Giorgio M, Fiorentini S. Megestrol treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2001; 85: 1606-8.
111. Rabinowitz I, Telepak R, Lee FC. Octreotide scans are positive in a subset of patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Nucl Med* 2002; 27: 499-502.
112. Reubi JC, Zimmermann A, Jonas S, Waser B, Neuhaus P, Laderach U, Wiedenmann B. Regulatory peptide receptors in human hepatocellular carcinomas. *Gut* 1999; 45: 766-74.
113. Kouroumalis E, Skordilis P, Thermos K, Vasilaki A, Moschandrea J, Manousos ON. Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomised controlled study. *Gut* 1998; 42: 442-7.
114. Raderer M, Hejna MH, Muller C, Kornek GV, Kurtaran A, Virgolini I, Fiebieger W, Hamilton G, Scheithauer W. Treatment of hepatocellular cancer with the long acting somatostatin analog lanreotide in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2000; 16: 1197-201.
115. Dimitroulopoulos D, Xinopoulos D, Tsamakidis K, Zisimopoulos A, Andriotis E, Markidou S, Panagiotakos D, Chrysohou C, Bazinis A, Paraskevas E. The role of sandostatin LAR in treating patients with advanced hepatocellular cancer. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 1245-50.
116. Yuen MF, Poon RT, Lai CL, Fan ST, Lo CM, Wong KW, Wong WM, Wong BC. A randomized placebo-controlled study of long-acting octreotide for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002; 36: 687-91.
117. Kouroumalis E, Samonakis D, Skordilis P. Octreotide treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003; 37: 477.
118. Pan DY, Qiao JG, Chen JW, Huo YC, Zhou YK, Shi HA. Tamoxifen combined with octreotide or regular chemotherapeutic agents in treatment of primary liver cancer: a randomized controlled trial. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 211-5.
119. de Gerlache J, Lans M, Preat V, Taper H, Roberfroid M. Comparison of different models of rat liver carcinogenesis: conclusions from a systemic analysis. *Toxicol Pathol* 1984; 12: 374-82.
120. Lu T, Liu J, LeCluyse EL, Zhou YS, Cheng ML, Waalkes MP. Application of cDNA microarray to the study of arsenic-induced liver diseases in the population of Guizhou, China. *Toxicol Sci* 2001; 59: 185-92.
121. Waalkes MP, Liu J, Ward JM, Diwan BA. Mechanisms underlying arsenic carcinogenesis: hypersensitivity of mice exposed to inorganic arsenic during gestation. *Toxicology* 2004; 198: 31-8.
122. Waalkes MP, Ward JM, Diwan BA. Induction of tumors of the liver, lung, ovary and adrenal in adult mice after brief maternal gestational exposure to inorganic arsenic: promotional effects of postnatal phorbol ester exposure on hepatic and pulmonary, but not dermal cancers. *Carcinogenesis* 2004; 25: 133-41.
123. Waalkes MP, Ward JM, Liu J, Diwan BA. Transplacental carcinogenicity of inorganic arsenic in the drinking water: induction of hepatic, ovarian, pulmonary, and adrenal tumors in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 186: 7-17.
124. Rocha NS, Barbisan LF, de Oliveira ML, de Camargo JL. Effects of fasting and intermittent fasting on rat hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Teratog Carcinog Mutagen* 2002; 22: 129-38.

125. Laconi E, Tomasi C, Curreli F, Diana S, Laconi S, Serra G, Collu M, Pani P. Early exposure to restraint stress enhances chemical carcinogenesis in rat liver. *Cancer Lett* 2000; 161: 215-20.
126. Tomasi C, Laconi E, Laconi S, Greco M, Sarma DS, Pani P. Effect of fasting/refeeding on the incidence of chemically induced hepatocellular carcinoma in the rat. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1979-83.
127. Ishikawa H, Nakao K, Matsumoto K, Nishimura D, Ichikawa T, Hamasaki K, Eguchi K. Bone marrow engraftment in a rodent model of chemical carcinogenesis but no role in the histogenesis of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004; 53: 884-9.
128. Nakaji M, Yano Y, Ninomiya T, Seo Y, Hamano K, Yoon S, Kasuga M, Teramoto T, Hayashi Y, Yokozaki H. IFN-alpha prevents the growth of pre-neoplastic lesions and inhibits the development of hepatocellular carcinoma in the rat. *Carcinogenesis* 2004; 25: 389-97.
129. Altavilla G, Caputo A, Lanfredi M, Piola C, Barbanti-Brodano G, Corallini A. Enhancement of chemical hepatocarcinogenesis by the HIV-1 tat gene. *Am J Pathol* 2000; 157: 1081-9.
130. Bishayee A, Karmakar R, Mandal A, Kundu SN, Chatterjee M. Vanadium-mediated chemoprotection against chemical hepatocarcinogenesis in rats: haematological and histological characteristics. *Eur J Cancer Prev* 1997; 6: 58-70.
131. Bishayee A, Chatterjee M. Inhibitory effect of vanadium on rat liver carcinogenesis initiated with diethylnitrosamine and promoted by phenobarbital. *Br J Cancer* 1995; 71: 1214-20.
132. Tamano S, Merlini GT, Ward JM. Rapid development of hepatic tumors in transforming growth factor alpha transgenic mice associated with increased cell proliferation in precancerous hepatocellular lesions initiated by N-nitrosodiethylamine and promoted by phenobarbital. *Carcinogenesis* 1994; 15: 1791-8.
133. Masuhara M, Ogasawara H, Katyal SL, Nakamura T, Shinozuka H. Cyclosporine stimulates hepatocyte proliferation and accelerates development of hepatocellular carcinomas in rats. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1579-84.
134. Wirtzner U, Enzmann H, Rosenbruch M, Bomhard EM. Accumulation of p53 protein in chemically induced oval cells during early stages of rodent hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1995; 16: 697-701.
135. Fischer G, Lilienblum W, Ullrich D, Bock KW. Immunohistochemical differentiation of gamma-glutamyltranspeptidase in focal lesions and in zone I of rat liver after treatment with chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 1986; 7: 1405-10.
136. Fischer G, Ulrich D, Bock KW. Effects of N-nitrosomorpholine and phenobarbital on UDP-glucuronyltransferase in putative preneoplastic foci of rat liver. *Carcinogenesis* 1985; 6: 605-9.
137. Kuhlmann WD. Alpha-fetoprotein: cellular origin of a biological marker in rat liver under various experimental conditions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1981; 393: 9-26.
138. Fu Y, Deng W, Kawarada Y, Kawagoe M, Ma YZ, Li X, Guo N, Kameda T, Terada K, Sugiyama T. Mutation and expression of the p53 gene during chemical hepatocarcinogenesis in F344 rats. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1628: 40-9.
139. Orian JM, Tamakoshi K, Mackay IR, Brandon MR. New murine model for hepatocellular carcinoma: transgenic mice expressing metallothionein-ovine growth hormone fusion gene. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 393-8.
140. Snibson KJ, Bhathal PS, Hardy CL, Brandon MR, Adams TE. High, persistent hepatocellular proliferation and apoptosis precede hepatocarcinogenesis in growth hormone transgenic mice. *Liver* 1999; 19: 242-52.
141. Tanaka S, Mohr L, Schmidt EV, Sugimachi K, Wands JR. Biological effects of human insulin receptor substrate-1 overexpression in hepatocytes. *Hepatology* 1997; 26: 598-604.
142. Nicholes K, Guillet S, Tomlinson E, Hillan K, Wright B, Frantz GD, Pham TA, Dillard-Telm L, Tsai SP, Stephan JP, Stinson J, Stewart T, French DM. A mouse model of hepatocellular carcinoma: ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice. *Am J Pathol* 2002; 160: 2295-307.
143. Harada N, Oshima H, Katoh M, Tamai Y, Oshima M, Taketo MM. Hepatocarcinogenesis in mice with beta-catenin and Ha-ras gene mutations. *Cancer Res* 2004; 64: 48-54.
144. Conner EA, Lemmer ER, Omori M, Wirth PJ, Factor VM, Thorgeirsson SS. Dual functions of E2F-1 in a transgenic mouse model of liver carcinogenesis. *Oncogene* 2000; 19: 5054-62.

145. Deane NG, Parker MA, Aramandla R, Diehl L, Lee WJ, Washington MK, Nanney LB, Shyr Y, Beauchamp RD. Hepatocellular carcinoma results from chronic cyclin D1 overexpression in transgenic mice. *Cancer Res* 2001; 61: 5389-95.
146. Gilbert E, Morel A, Tulliez M, Maunoury R, Terzi F, Miquerol L, Kahn A. In vivo effects of activated H-ras oncogene expressed in the liver and in urogenital tissues. *Int J Cancer* 1997; 73: 749-56.
147. Barlow C, Meister B, Lardelli M, Lendahl U, Vennstrom B. Thyroid abnormalities and hepatocellular carcinoma in mice transgenic for v-erbA. *EMBO J* 1994; 13: 4241-50.
148. Merle P, Barraud L, Lefrancois L, Chevallier M, Guerret S, Maisonnas M, Bordes I, Savre-Train I, Trepo C, Vitvitski-Trepo L. Long-term high-dose interferon-alpha therapy delays Hepadnavirus-related hepatocarcinogenesis in X/myc transgenic mice. *Oncogene* 2003; 22: 2762-71.
149. Santoni-Rugiu E, Jensen MR, Thorgeirsson SS. Disruption of the pRb/E2F pathway and inhibition of apoptosis are major oncogenic events in liver constitutively expressing c-myc and transforming growth factor alpha. *Cancer Res* 1998; 58: 123-34.
150. Sargent LM, Zhou X, Keck CL, Sanderson ND, Zimonjic DB, Popescu NC, Thorgeirsson SS. Nonrandom cytogenetic alterations in hepatocellular carcinoma from transgenic mice overexpressing c-Myc and transforming growth factor-alpha in the liver. *Am J Pathol* 1999; 154: 1047-55.
151. Matsumoto T, Takagi H, Mori M. Androgen dependency of hepatocarcinogenesis in TGFalpha transgenic mice. *Liver* 2000; 20: 228-33.
152. Wu Y, Renard CA, Apiou F, Huerre M, Tiollais P, Dutrillaux B, Buendia MA. Recurrent allelic deletions at mouse chromosomes 4 and 14 in Myc-induced liver tumors. *Oncogene* 2002; 21: 1518-26.
153. Merle P, Chevallier M, Levy R, Maisonnas M, Terradillos O, Ahmed SNS, Trepo C, Buendia MA, Vitvitski-Trepo L. Preliminary results of interferon-alpha therapy on woodchuck hepatitis virus-induced hepatocarcinogenesis: possible benefit in female transgenic mice. *J Hepatol* 2001; 34: 562-9.
154. Araki K, Hino O, Miyazaki J, Yamamura K. Development of two types of hepatocellular carcinoma in transgenic mice carrying the SV40 large T-antigen gene. *Carcinogenesis* 1991; 12: 2059-62.
155. Bennoun M, Rissel M, Engelhardt N, Guillouzo A, Briand P, Weber-Benarous A. Oval cell proliferation in early stages of hepatocarcinogenesis in simian virus 40 large T transgenic mice. *Am J Pathol* 1993; 143: 1326-36.
156. Pousset D, Piller V, Bureaud N, Monsigny M, Piller F. Increased alpha2,6 sialylation of N-glycans in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 4249-56.
157. Baratin M, Ziolo M, Romieu R, Kayibanda M, Gouilleux F, Briand P, Leroy P, Haddada H, Renia L, Viguier M, Guillet JG. Regression of primary hepatocarcinoma in cancer-prone transgenic mice by local interferon-gamma delivery is associated with macrophages recruitment and nitric oxide production. *Cancer Gene Ther* 2001; 8: 193-202.
158. Dupuy E, Hainaud P, Villemain A, Bodevin-Phedre E, Brouland JP, Briand P, Tobelem G. Tumoral angiogenesis and tissue factor expression during hepatocellular carcinoma progression in a transgenic mouse model. *J Hepatol* 2003; 38: 793-802.
159. Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinelli C, Dunsford HA, Sell S, Pinkert CA, Brinster RL, Palmiter RD. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 1989; 59: 1145-56.
160. Kuo MT, Zhao JY, Teeter LD, Ikeguchi M, Chisari FV. Activation of multidrug resistance (P-glycoprotein) mdr3/mdr1a gene during the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell Growth Differ* 1992; 3: 531-40.
161. Kirby GM, Chemin I, Montesano R, Chisari FV, Lang MA, Wild CP. Induction of specific cytochrome P450s involved in aflatoxin B1 metabolism in hepatitis B virus transgenic mice. *Mol Carcinog* 1994; 11: 74-80.
162. Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL. Altered DNA mutation spectrum in aflatoxin b1-treated transgenic mice that express the hepatitis B virus x protein. *J Virol* 2002; 76: 11770-4.
163. Jakubczak JL, Chisari FV, Merlino G. Synergy between transforming growth factor alpha and hepatitis B virus surface antigen in hepatocellular proliferation and carcinogenesis. *Cancer Res* 1997; 57: 3606-11.

164. Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991; 351: 317-20.
165. Koike K, Moriya K, Kimura S. Role of hepatitis C virus in the development of hepatocellular carcinoma: transgenic approach to viral hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 394-400.
166. Terradillos O, Billet O, Renard CA, Levy R, Molina T, Briand P, Buendia MA. The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene* 1997; 14: 395-404.
167. Lakhtakia R, Kumar V, Reddi H, Mathur M, Dattagupta S, Panda SK. Hepatocellular carcinoma in a hepatitis B 'x' transgenic mouse model: A sequential pathological evaluation. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 80-91.
168. Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein acts as a tumor promoter in development of diethylnitrosamine-induced preneoplastic lesions. *J Virol* 2001; 75: 3851-8.
169. Slagle BL, Lee TH, Medina D, Finegold MJ, Butel JS. Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus X gene. *Mol Carcinog* 1996; 15: 261-9.
170. Moriya K, Todoroki T, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Miyoshi H, Ishibashi K, Takayama T, Makuuchi M, Watanabe K, Miyamura T, Kimura S, Koike K. Increase in the concentration of carbon 18 monounsaturated fatty acids in the liver with hepatitis C: analysis in transgenic mice and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 1207-12.
171. Kato T, Miyamoto M, Date T, Yasui K, Taya C, Yonekawa H, Ohue C, Yagi S, Seki E, Hirano T, Fujimoto J, Shirai T, Wakita T. Repeated hepatocyte injury promotes hepatic tumorigenesis in hepatitis C virus transgenic mice. *Cancer Sci* 2003; 94: 679-85.
172. Corallini A, Altavilla G, Pozzi L, Bignozzi F, Negrini M, Rimessi P, Gualandi F, Barbanti-Brodano G. Systemic expression of HIV-1 tat gene in transgenic mice induces endothelial proliferation and tumors of different histotypes. *Cancer Res* 1993; 53: 5569-75.
173. Fidler IJ. Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1986; 5: 29-49.
174. Sharkey FE, Fogh J. Considerations in the use of nude mice for cancer research. *Cancer Metastasis Rev* 1984; 3: 341-60.
175. Ain JF, Gouillat C, Bertrand S, Fourel I, Guillaud M, Saguier G, Trepo C. Human hepatocellular carcinoma transplanted in nude mice: a relevant experimental model to assess tumoral destruction by alcoholization. *J Surg Res* 1994; 57: 366-72.
176. Ain JF, Gouillat C, Bertrand S, Fourel I, Guillaud M, Saguier G, Trepo C. Histopathological assessment of tumoral destruction by alcoholization in an experimental model of human hepatocellular carcinoma transplanted in nude mice. *Eur J Surg Oncol* 1993; 19: 561-6.
177. Vucenik I, Zhang ZS, Shamsuddin AM. IP6 in treatment of liver cancer. II. Intra-tumoral injection of IP6 regresses pre-existing human liver cancer xenotransplanted in nude mice. *Anticancer Res* 1998; 18: 4091-6.
178. Miwa T, Emi N, Nonami T, Kurokawa T, Yoshikawa K, Nakao A, Takagi H. Gene transfer with cationic lipid into human hepatocellular carcinoma in nude mice. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 825-9.
179. Adler R, Hurwitz E, Wands JR, Sela M, Shouval D. Specific targeting of adriamycin conjugates with monoclonal antibodies to hepatoma associated antigens to intrahepatic tumors in athymic mice. *Hepatology* 1995; 22: 1482-7.
180. Wang L, Tang ZY, Qin LX, Wu XF, Sun HC, Xue Q, Ye SL. High-dose and long-term therapy with interferon-alfa inhibits tumor growth and recurrence in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma xenografts with high metastatic potential. *Hepatology* 2000; 32: 43-8.
181. Xia JL, Yang BH, Tang ZY, Sun FX, Xue Q, Gao DM. Inhibitory effect of the angiogenesis inhibitor TNP-470 on tumor growth and metastasis in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123: 383-7.
182. Bu W, Tang ZY, Sun FX, Ye SL, Liu KD, Xue Q, Chen J, Gao DM. Effects of matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 on liver cancer growth and metastasis in a patient-like orthotopic model LCI-D20. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 1056-61.

183. Teicher BA, Menon K, Alvarez E, Liu P, Shih C, Faul MM. Antiangiogenic and antitumor effects of a protein kinase C beta inhibitor in human hepatocellular and gastric cancer xenografts. *In Vivo* 2001; 15: 185-93.
184. Yao X, Hu JF, Daniels M, Yien H, Lu H, Sharan H, Zhou X, Zeng Z, Li T, Yang Y, Hoffman AR. A novel orthotopic tumor model to study growth factors and oncogenes in hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2719-26.
185. Song YQ, Wang GF, Dai XL, Xie H. Enhanced radioimmunotherapeutic efficacy of a monoclonal antibody cocktail against SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma. *Cell Res* 1998; 8: 241-7.
186. Hirano T, Kaneko S, Kaneda Y, Saito I, Tamaoki T, Furuyama J, Tamaoki T, Kobayashi K, Ueki T, Fujimoto J. HVJ-liposome-mediated transfection of HSVtk gene driven by AFP promoter inhibits hepatic tumor growth of hepatocellular carcinoma in SCID mice. *Gene Ther* 2001; 8: 80-3.
187. Iqbal Ahmed CM, Johnson DE, Demers GW, Engler H, Howe JA, Wills KN, Wen SF, Shinoda J, Beltran J, Nodelman M, Machemer T, Maneval DC, Nagabhushan TL, Sugarman BJ. Interferon alpha2b gene delivery using adenoviral vector causes inhibition of tumor growth in xenograft models from a variety of cancers. *Cancer Gene Ther* 2001; 8: 788-95.
188. Tsuchiyama T, Kaneko S, Nakamoto Y, Sakai Y, Honda M, Mukaida N, Kobayashi K. Enhanced antitumor effects of a bicistronic adenovirus vector expressing both herpes simplex virus thymidine kinase and monocyte chemoattractant protein-1 against hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2003; 10: 260-9.
189. Rashidi B, An Z, Sun FX, Li X, Tang ZY, Moossa AR, Hoffman RM. Efficacy of intra-hepatectomy 5-FU on recurrence and metastasis of human hepatocellular carcinoma in nude mice. *Int J Cancer* 2001; 91: 231-5.
190. Jia WD, Xu GL, Xu RN, Sun HC, Wang L, Yu JH, Wang J, Li JS, Zhai ZM, Xue Q. Octreotide acts as an antitumor angiogenesis compound and suppresses tumor growth in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma xenografts. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 327-34.
191. Tang ZY, Sun FX, Tian J, Ye SL, Liu YK, Liu KD, Xue Q, Chen J, Xia JL, Qin LX, Sun SL, Wang L, Zhou J, Li Y, Ma ZC, Zhou XD, Wu ZQ, Lin ZY, Yang BH. Metastatic human hepatocellular carcinoma models in nude mice and cell line with metastatic potential. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 597-601.
192. Ou J, Rutter WJ. Hybrid hepatitis B virus-host transcripts in a human hepatoma cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 83-7.
193. Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979; 282: 615-6.
194. Lee Y, Bong Y, Poo H, Lee Y, Park J, Oh S, Sohn M, Lee S, Park U, Kim N, Hyun S. Establishment and characterization of cell lines constitutively expressing hepatitis B virus X-protein. *Gene* 1998; 207: 111-8.
195. Le Jossic C, Glaise D, Corcos L, Diot C, Dezier JF, Fautrel A, Guguen-Guillouzo C. trans-Acting factors, detoxication enzymes and hepatitis B virus replication in a novel set of human hepatoma cell lines. *Eur J Biochem* 1996; 238: 400-9.
196. Bagnarelli P, Devescovi G, Manzin A, Bearzi I, Bonazzi P, Carloni G, Clementi M. Growth-factor independence of a new differentiated hepatitis B virus DNA-negative human hepatoma cell line. *Hepatology* 1990; 11: 1024-32.
197. Das PK, Nayak NC, Tsiquaye KN, Zuckerman AJ. Establishment of a human hepatocellular carcinoma cell line releasing hepatitis B virus surface antigen. *Br J Exp Pathol* 1980; 61: 648-54.
198. Lee JH, Ku JL, Park YJ, Lee KU, Kim WH, Park JG. Establishment and characterization of four human hepatocellular carcinoma cell lines containing hepatitis B virus DNA. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 289-95.
199. Aoki Y, Aizaki H, Shimoike T, Tani H, Ishii K, Saito I, Matsuura Y, Miyamura T. A human liver cell line exhibits efficient translation of HCV RNAs produced by a recombinant adenovirus expressing T7 RNA polymerase. *Virology* 1998; 250: 140-50.
200. Cheng D, Yang A, Thomas H, Monjardino J. Characterization of stable hepatitis delta expressing hepatoma cell lines: effect of HDAG on cell growth. *Prog Clin Biol Res* 1993; 382: 149-53.
201. Sing GK, Pace R, Prior S, Scott JS, Shield P, Martin N, Searle J, Battersby C, Powell LW, Cooksley WG. Establishment of a cell line from a hepatocellular carcinoma from a patient with hemochromatosis. *Hepatology* 1994; 20: 74-81.

202. Utsunomiya I, Iemura A, Yano H, Akiba J, Kojiro M. Establishment and characterization of a new human hepatocellular carcinoma cell line, HAK-3, and its response to growth factors. *Int J Oncol* 1999; 15: 669-75.
203. Yano H, Iemura A, Fukuda K, Mizoguchi A, Haramaki M, Kojiro M. Establishment of two distinct human hepatocellular carcinoma cell lines from a single nodule showing clonal dedifferentiation of cancer cells. *Hepatology* 1993; 18: 320-7.
204. Tokiwa T, Kusaka Y, Endo A, Namba M. Primary culture of liver cancer tissues with or without transcatheter arterial embolization and establishment of a cell strain. *Cell Biol Int Rep* 1992; 16: 259-67.
205. Murakami T, Yano H, Maruiwa M, Sugihara S, Kojiro M. Establishment and characterization of a human combined hepatocholangiocarcinoma cell line and its heterologous transplantation in nude mice. *Hepatology* 1987; 7: 551-6.
206. Watanabe T, Morizane T, Tsuchimoto K, Inagaki Y, Munakata Y, Nakamura T, Kumagai N, Tsuchiya M. Establishment of a cell line (HCC-M) from a human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1983; 32: 141-6.
207. Chang C, Lin Y, Lee TW, Chou CK, Lee TS, Liu TJ, P'eng FK, Chen TY, Hu CP. Induction of plasma protein secretion in a newly established human hepatoma cell line. *Mol Cell Biol* 1983; 3: 1133-7.
208. Kurowska EM, Manthey JA. Regulation of lipoprotein metabolism in HepG2 cells by citrus flavonoids. *Adv Exp Med Biol* 2002; 505: 173-9.
209. Cederbaum AI, Wu D, Mari M, Bai J. CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1539-43.
210. Hoekstra D, Zegers MM, van Ijzendoorn SC. Membrane flow, lipid sorting and cell polarity in HepG2 cells: role of a subapical compartment. *Biochem Soc Trans* 1999; 27: 422-8.
211. Suzuki K, Hayashi T. cis-elements required for expression of human protein C inhibitor gene in HepG2 cells and its androgen-dependent expression in rat reproductive organs. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 75-83.
212. Carruba G, Cervello M, Miceli MD, Farruggio R, Notarbartolo M, Virruso L, Giannitrapani L, Gambino R, Montalto G, Castagnetta L. Truncated form of beta-catenin and reduced expression of wild-type catenins feature HepG2 human liver cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 886: 212-6.
213. Dashti N, Wolfbauer G. Secretion of lipids, apolipoproteins, and lipoproteins by human hepatoma cell line, HepG2: effects of oleic acid and insulin. *J Lipid Res* 1987; 28: 423-36.
214. Oh SH, Lee BH. A ginseng saponin metabolite-induced apoptosis in HepG2 cells involves a mitochondria-mediated pathway and its downstream caspase-8 activation and Bid cleavage. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 194: 221-9.
215. Zhou JM, Zhu XF, Pan QC, Liao DF, Li ZM, Liu ZC. Manumycin induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Int J Mol Med* 2003; 12: 955-9.
216. Simile MM, De Miglio MR, Muroli MR, Frau M, Asara G, Serra S, Muntoni MD, Seddaiu MA, Daino L, Feo F, Pascale RM. Down-regulation of c-myc and Cyclin D1 genes by antisense oligodeoxy nucleotides inhibits the expression of E2F1 and in vitro growth of HepG2 and Morris 5123 liver cancer cells. *Carcinogenesis* 2004; 25: 333-41.
217. Zeng ZC, Jiang GL, Wang GM, Tang ZY, Curran WJ, Iliakis G. DNA-PKcs subunits in radiosensitization by hyperthermia on hepatocellular carcinoma hepG2 cell line. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 797-803.
218. Lee YS, Jin DQ, Kwon EJ, Park SH, Lee ES, Jeong TC, Nam DH, Huh K, Kim JA. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular Ca<sup>2+</sup> release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells. *Cancer Lett* 2002; 186: 83-91.
219. Sugiyama N, Mizuguchi T, Aoki T, Hui T, Inderbitzin D, Demetriou AA, Rozga J. Glycerol suppresses proliferation of rat hepatocytes and human HepG2 cells. *J Surg Res* 2002; 103: 236-42.
220. Chu AC, Tsang SY, Lo EH, Fung KP. Low density lipoprotein as a targeted carrier for doxorubicin in nude mice bearing human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci* 2001; 70: 591-601.
221. Lystad E, Hostmark AT, Jebens E. Apoptotic effects of dichloro stearic and dichloro myristic acid in human hepatoma cells (HepG2). *Pharmacol Toxicol* 2001; 89: 85-91.
222. Chan JY, Chu AC, Fung KP. Inhibition of P-glycoprotein expression and reversal of drug resistance of human hepatoma HepG2 cells by multidrug resistance gene (mdr1) antisense RNA. *Life Sci* 2000; 67: 2117-24.

223. Castaneda F, Kinne RK. Short exposure to millimolar concentrations of ethanol induces apoptotic cell death in multicellular HepG2 spheroids. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 305-10.
224. Castaneda F, Kinne RK. Cytotoxicity of millimolar concentrations of ethanol on HepG2 human tumor cell line compared to normal rat hepatocytes in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 503-10.
225. Semenkova LN, Dudich EI, Dudich IV, Shingarova LN, Korobko VG. Alpha-fetoprotein as a TNF resistance factor for the human hepatocarcinoma cell line HepG2. *Tumour Biol* 1997; 18: 30-40.
226. Vonarx-Coinsman V, Foutlier MT, de Brito LX, Morlet L, Gouyette A, Patrice T. HepG2 human hepatocarcinoma cells: an experimental model for photosensitization by endogenous porphyrins. *J Photochem Photobiol B* 1995; 30: 201-8.
227. Kraft A, Reid LM, Zvibel I. Suramin inhibits growth and yet promotes insulin-like growth factor II expression in HepG2 cells. *Cancer Res* 1993; 53: 652-7.
228. San RH, Shimada T, Maslansky CJ, Kreiser DM, Laspia MF, Rice JM, Williams GM. Growth characteristics and enzyme activities in a survey of transformation markers in adult rat liver epithelial-like cell cultures. *Cancer Res* 1979; 39: 4441-8.
229. Deschatrette J, Moore EE, Dubois M, Weiss MC. Dedifferentiated variants of a rat hepatoma: reversion analysis. *Cell* 1980; 19: 1043-51.
230. Angrand PO, Coffinier C, Weiss MC. Response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids depends on the integrity of the cAMP pathway. *Cell Growth Differ* 1994; 5: 957-66.
231. Thompson EB, Tomkins GM, Curran JF. Induction of tyrosine alpha-ketoglutarate transaminase by steroid hormones in a newly established tissue culture cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966; 56: 296-303.
232. Richardson UI, Tashjian AH, Jr., Levine L. Establishment of a clonal strain of hepatoma cells which secrete albumin. *J Cell Biol* 1969; 40: 236-47.
233. Zaret KS, DiPersio CM, Jackson DA, Montigny WJ, Weinstat DL. Conditional enhancement of liver-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 9076-80.
234. Darlington GJ. Liver cell lines. *Methods Enzymol* 1987; 151: 19-38.
235. Hankinson O. Single-step selection of clones of a mouse hepatoma line deficient in aryl hydrocarbon hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 373-6.
236. Unoura M, Kobayashi K, Fukuoka K, Matsushita F, Morimoto H, Oshima T, Kaneko S, Hattori N, Murakami S, Yoshikawa H. Establishment of a cell line from a woodchuck hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1985; 5: 1106-11.
237. Ohnishi S, Aoyama H, Shiga J, Itai Y, Moriyama T, Ishikawa T, Sasaki N, Yamamoto K, Koshimizu K, Kaneko S, . Establishment of a new cell line from a woodchuck hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1988; 8: 104-7.
238. Kawaguchi T, Nomura K, Hirayama Y, Kitagawa T. Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH. *Cancer Res* 1987; 47: 4460-4.
239. Krulich L, Dhariwal AP, McCann SM. Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology* 1968; 83: 783-90.
240. Dhariwal AP, Krulich L, McCann SM. Purification of a growth hormone-inhibiting factor (CIF) from sheep hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1969; 4: 282-8.
241. Dhariwal AP, Krulich L, Katz SH, McCann SM. Purification of growth hormone-releasing factor. *Endocrinology* 1965; 77: 932-6.
242. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973; 179: 77-9.
243. Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 1999; 20: 157-98.
244. Kaupmann K, Bruns C, Hoyer D, Seuwen K, Lubbert H. Distribution and second messenger coupling of four somatostatin receptor subtypes expressed in brain. *FEBS Lett* 1993; 331: 53-9.
245. Thermos K. Functional mapping of somatostatin receptors in the retina: a review. *Vision Res* 2003; 43: 1805-15.
246. Reisine T, Bell GI. Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocr Rev* 1995; 16: 427-42.
247. Reisine T. Somatostatin receptors. *Am J Physiol* 1995; 269: G813-G820 .

248. Lamberts SW, Krenning EP, Reubi JC. The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumors. *Endocr Rev* 1991; 12: 450-82.
249. Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA. Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med* 2001; 28: 836-46.
250. Dizeyi N, Konrad L, Bjartell A, Wu H, Gadaleanu V, Hansson J, Helboe L, Abrahamsson PA. Localization and mRNA expression of somatostatin receptor subtypes in human prostatic tissue and prostate cancer cell lines. *Urol Oncol* 2002; 7: 91-8.
251. Oda Y, Tanaka Y, Naruse T, Sasanabe R, Tsubamoto M, Funahashi H. Expression of somatostatin receptor and effects of somatostatin analog on pancreatic endocrine tumors. *Surg Today* 2002; 32: 690-4.
252. Hannon JP, Nunn C, Stolz B, Bruns C, Weckbecker G, Lewis I, Troxler T, Hurth K, Hoyer D. Drug design at peptide receptors: somatostatin receptor ligands. *J Mol Neurosci* 2002; 18: 15-27.
253. Dalm VA, Van Hagen PM, de Krijger RR, Kros JM, Van Koetsveld PM, Van Der Lely AJ, Lamberts SW, Hofland LJ. Distribution pattern of somatostatin and cortistatin mRNA in human central and peripheral tissues. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60: 625-9.
254. Dube D, Leclerc R, Pelletier G, Arimura Aschally AV. Immunohistochemical detection of growth hormone-release inhibiting hormone (somatostatin) in the guinea-pig brain. *Cell Tissue Res* 1975; 161: 385-92.
255. Kobayashi RM, Brown M, Vale W. Regional distribution of neurotensin and somatostatin in rat brain. *Brain Res* 1977; 126: 584-8.
256. Epelbaum J. Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog Neurobiol* 1986; 27: 63-100.
257. de Lecea L, Ruiz-Lozano P, Danielson PE, Peelle-Kirley J, Foye PE, Frankel WN, Sutcliffe JG. Cloning, mRNA expression, and chromosomal mapping of mouse and human preprocortistatin. *Genomics* 1997; 42: 499-506.
258. de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE, Dunlop CL, Siggins GR, Henriksen SJ, Sutcliffe JG. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 1996; 381: 242-5.
259. Spier AD, de Lecea L. Cortistatin: a member of the somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 33: 228-41.
260. Fukusumi S, Kitada C, Takekawa S, Kizawa H, Sakamoto J, Miyamoto M, Hinuma S, Kitano K, Fujino M. Identification and characterization of a novel human cortistatin-like peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232: 157-63.
261. Siehler S, Seuwen K, Hoyer D. [125I]Tyr<sup>10</sup>-cortistatin<sup>14</sup> labels all five somatostatin receptors. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1998; 357: 483-9.
262. Robas N, Mead E, Fidock M. MrgX2 Is a High Potency Cortistatin Receptor Expressed in Dorsal Root Ganglion. *J Biol Chem* 2003; 278: 44400-4.
263. Dalm VA, Van Hagen PM, Van Koetsveld PM, Langerak AW, Van Der Lely AJ, Lamberts SW, Hofland LJ. Cortistatin rather than somatostatin as a potential endogenous ligand for somatostatin receptors in the human immune system. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 270-6.
264. Dalm VA, Van Hagen PM, Van Koetsveld PM, Achilefu S, Houtsmuller AB, Pols DH, Van Der Lely AJ, Lamberts SW, Hofland LJ. Expression of somatostatin, cortistatin, and somatostatin receptors in human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E344-E353.
265. Schonbrunn A, Tashjian H, Jr. Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture. *J Biol Chem* 1978; 253: 6473-83.
266. Thermos K, Reisine T. Somatostatin receptor subtypes in the clonal anterior pituitary cell lines AtT-20 and GH3. *Mol Pharmacol* 1988; 33: 370-7.
267. Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S. 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* 1992; 89: 251-5.
268. Vanetti M, Kouba M, Wang X, Vogt G, Hollt V. Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). *FEBS Lett* 1992; 311: 290-4.



269. Vanetti M, Vogt G, Hollt V. The two isoforms of the mouse somatostatin receptor (mSSTR2A and mSSTR2B) differ in coupling efficiency to adenylate cyclase and in agonist-induced receptor desensitization. *FEBS Lett* 1993; 331: 260-6.
270. Patel YC, Greenwood M, Kent G, Panetta R, Srikant CB. Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSTR2: tissue selective distribution and cAMP regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192: 288-94.
271. Kluxen FW, Bruns C, Lubbert H. Expression cloning of a rat brain somatostatin receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 4618-22.
272. Schindler M, Kidd EJ, Carruthers AM, Wyatt MA, Jarvie EM, Sellers LA, Feniuk W, Humphrey PP. Molecular cloning and functional characterization of a rat somatostatin sst2(b) receptor splice variant. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 209-17.
273. Matsumoto K, Yokogoshi Y, Fujinaka Y, Zhang C, Saito S. Molecular cloning and sequencing of porcine somatostatin receptor 2. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 298-305.
274. Yamada Y, Reisine T, Law SF, Ihara Y, Kubota A, Kagimoto S, Seino M, Seino Y, Bell GI, Seino S. Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylate cyclase. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 2136-42.
275. Rohrer L, Raulf F, Bruns C, Buettner R, Hofstaedter F, Schule R. Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 4196-200.
276. Xu Y, Song J, Bruno JF, Berelowitz M. Molecular cloning and sequencing of a human somatostatin receptor, hSSTR4. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193: 648-52.
277. Demchyshyn LL, Srikant CB, Sunahara RK, Kent G, Seeman P, Van Tol HH, Panetta R, Patel YC, Niznik HB. Cloning and expression of a human somatostatin-14-selective receptor variant (somatostatin receptor 4) located on chromosome 20. *Mol Pharmacol* 1993; 43: 894-901.
278. Yamada Y, Kagimoto S, Kubota A, Yasuda K, Masuda K, Someya Y, Ihara Y, Li Q, Imura H, Seino S. Cloning, functional expression and pharmacological characterization of a fourth (hSSTR4) and a fifth (hSSTR5) human somatostatin receptor subtype. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195: 844-52.
279. Panetta R, Greenwood MT, Warszynska A, Demchyshyn LL, Day R, Niznik HB, Srikant CB, Patel YC. Molecular cloning, functional characterization, and chromosomal localization of a human somatostatin receptor (somatostatin receptor type 5) with preferential affinity for somatostatin-28. *Mol Pharmacol* 1994; 45: 417-27.
280. Patel YC, Srikant CB. Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5). *Endocrinology* 1994; 135: 2814-7.
281. Patel YC. Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *J Endocrinol Invest* 1997; 20: 348-67.
282. Fujii Y, Gono T, Yamada Y, Chihara K, Inagaki N, Seino S. Somatostatin receptor subtype SSTR2 mediates the inhibition of high-voltage-activated calcium channels by somatostatin and its analogue SMS 201-995. *FEBS Lett* 1994; 355: 117-20.
283. Bauer W, Briner U, Doepfner W, Haller R, Huguenin R, Marbach P, Petcher TJ, Pless. SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci* 1982; 31: 1133-40.
284. Veber DF, Saperstein R, Nutt RF, Freidinger RM, Brady SF, Curley P, Perlow DS, Paleveda WJ, Colton CD, Zacchei AG. A super active cyclic hexapeptide analog of somatostatin. *Life Sci* 1984; 34: 1371-8.
285. Lamberts SW, Van Der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ. Octreotide. *N Engl J Med* 1996; 334: 246-54.
286. Lewis I, Bauer W, Albert R, Chandramouli N, Pless J, Weckbecker G, Bruns C. A novel somatostatin mimic with broad somatotropin release inhibitory factor receptor binding and superior therapeutic potential. *J Med Chem* 2003; 46: 2334-44.
287. Weckbecker G, Briner U, Lewis I, Bruns C. SOM230: a new somatostatin peptidomimetic with potent inhibitory effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in rats, primates, and dogs. *Endocrinology* 2002; 143: 4123-30.
288. Bruns C, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G. SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *Eur J Endocrinol* 2002; 146: 707-16.

289. Rohrer SP, Birzin ET, Mosley RT, Berk SC, Hutchins SM, Shen DM, Xiong Y, Hayes EC, Parmar RM, Foor F, Mitra SW, Degrado SJ, Shu M, Klopp JM, Cai SJ, Blake A, Chan WW, Pasternak A, Yang L, Patchett AA, Smith RG, Chapman KT, Schaeffer JM. Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science* 1998; 282: 737-40.
290. Yang L, Berk SC, Rohrer SP, Mosley RT, Guo L, Underwood DJ, Arison BH, Birzin ET, Hayes EC, Mitra SW, Parmar RM, Cheng K, Wu TJ, Butler BS, Foor F, Pasternak A, Pan Y, Silva M, Freidinger RM, Smith RG, Chapman K, Schaeffer JM, Patchett AA. Synthesis and biological activities of potent peptidomimetics selective for somatostatin receptor subtype 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 10836-41.
291. Feniuk W, Jarvie E, Luo J, Humphrey PP. Selective somatostatin sst(2) receptor blockade with the novel cyclic octapeptide, CYN-154806. *Neuropharmacology* 2000; 39: 1443-50.
292. Bass RT, Buckwalter BL, Patel BP, Pausch MH, Price LA, Strnad J, Hadcock JR. Identification and characterization of novel somatostatin antagonists. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 709-15.
293. Baumbach WR, Carrick TA, Pausch MH, Bingham B, Carmignac D, Robinson IC, Houghten R, Eppler CM, Price LA, Zysk JR. A linear hexapeptide somatostatin antagonist blocks somatostatin activity in vitro and influences growth hormone release in rats. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 864-73.
294. Hocart SJ, Jain R, Murphy WA, Taylor JE, Morgan B, Coy DH. Potent antagonists of somatostatin: synthesis and biology. *J Med Chem* 1998; 41: 1146-54.
295. Hocart SJ, Jain R, Murphy WA, Taylor JE, Coy DH. Highly potent cyclic disulfide antagonists of somatostatin. *J Med Chem* 1999; 42: 1863-71.
296. Nunn C, Schoeffter P, Langenegger D, Hoyer D. Functional characterisation of the putative somatostatin sst2 receptor antagonist CYN 154806. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003; 367: 1-9.
297. Nunn C, Langenegger D, Hurth K, Schmidt K, Fehlmann D, Hoyer D. Agonist properties of putative small-molecule somatostatin sst2 receptor-selective antagonists. *Eur J Pharmacol* 2003; 465: 211-8.
298. Law SF, Manning D, Reisine T. Identification of the subunits of GTP-binding proteins coupled to somatostatin receptors. *J Biol Chem* 1991; 266: 17885-97.
299. Law SF, Reisine T. Agonist binding to rat brain somatostatin receptors alters the interaction of the receptors with guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *Mol Pharmacol* 1992; 42: 398-402.
300. Murray-Whelan R, Schlegel W. Brain somatostatin receptor-G protein interaction. G alpha C-terminal antibodies demonstrate coupling of the soluble receptor with Gi(1-3) but not with Go. *J Biol Chem* 1992; 267: 2960-5.
301. Gu YZ, Schonbrunn A. Coupling specificity between somatostatin receptor sst2A and G proteins: isolation of the receptor-G protein complex with a receptor antibody. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 527-37.
302. Moller LN, Stidsen CE, Hartmann B, Holst JJ. Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1616 : 1-84.
303. Massa A, Barbieri F, Aiello C, Arena S, Pattarozzi A, Pirani P, Corsaro A, Iuliano R, Fusco A, Zona G, Spaziante R, Florio T, Schettini G. The expression of the phosphotyrosine phosphatase dep-1/PTPeta dictates the responsiveness of glioma cells to somatostatin inhibition of cell proliferation. *J Biol Chem* 2004.
304. Teijeiro R, Rios R, Costoya JA, Castro R, Bello JL, Devesa J, Arce VM. Activation of human somatostatin receptor 2 promotes apoptosis through a mechanism that is independent from induction of p53. *Cell Physiol Biochem* 2002; 12: 31-8.
305. Florio T, Arena S, Thellung S, Iuliano R, Corsaro A, Massa A, Pattarozzi A, Bajetto A, Trapasso F, Fusco A, Schettini G. The activation of the phosphotyrosine phosphatase eta (r-PTP eta) is responsible for the somatostatin inhibition of PC C13 thyroid cell proliferation. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 1838-52.
306. Florio T, Thellung S, Arena S, Corsaro A, Bajetto A, Schettini G, Stork PJ. Somatostatin receptor 1 (SSTR1)-mediated inhibition of cell proliferation correlates with the activation of the MAP kinase cascade: role of the phosphotyrosine phosphatase SHP-2. *J Physiol Paris* 2000; 94: 239-50.
307. Douziech N, Calvo E, Coulombe Z, Muradia G, Bastien J, Aubin RA, Lajas A, Morisset J. Inhibitory and stimulatory effects of somatostatin on two human pancreatic cancer cell lines: a primary role for tyrosine phosphatase SHP-1. *Endocrinology* 1999; 140: 765-77.

308. Florio T, Scorizello A, Fattore M, D'Alto V, Salzano S, Rossi G, Berlingieri MT, Fusco A, Schettini G. Somatostatin inhibits PC C13 thyroid cell proliferation through the modulation of phosphotyrosine activity. Impairment of the somatostatinergic effects by stable expression of E1A viral oncogene. *J Biol Chem* 1996; 271: 6129-36.
309. Florio T, Rim C, Hershberger RE, Loda M, Stork PJ. The somatostatin receptor SSTR1 is coupled to phosphotyrosine phosphatase activity in CHO-K1 cells. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 1289-97.
310. Kubota A, Yamada Y, Kagimoto S, Yasuda K, Someya Y, Ihara Y, Okamoto Y, Kozasa T, Seino S, Seino Y. Multiple effector coupling of somatostatin receptor subtype SSTR1. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204: 176-86.
311. Komatsuzaki K, Murayama Y, Giambarella U, Ogata E, Seino S, Nishimoto I. A novel system that reports the G-proteins linked to a given receptor: a study of type 3 somatostatin receptor. *FEBS Lett* 1997; 406: 165-70.
312. Patel RC, Lange DC, Patel YC. Photobleaching fluorescence resonance energy transfer reveals ligand-induced oligomer formation of human somatostatin receptor subtypes. *Methods* 2002; 27: 340-8.
313. Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Laugsch M, Holtt V, Schulz S. Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem* 2002; 277 : 19762-72.
314. Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* 2000; 288: 154-7.
315. Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Klutzny M, Kirscht S, Kreienkamp HJ, Holtt V, Schulz S. Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A). *J Biol Chem* 2001; 276: 14027-36.
316. Gordon D. Physical and chemical cooperation between somatostatin and dopamine receptors. *Gastroenterology* 2000; 119: 4.
317. Milligan G. Neurobiology. Receptors as kissing cousins. *Science* 2000; 288: 65-7.
318. Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC, Patel YC. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem* 2000; 275: 7862-9.
319. Csaba Z , Bernard V, Helboe L, Bluet-Pajot MT, Bloch B, Epelbaum J, Dournaud P. In vivo internalization of the somatostatin sst2A receptor in rat brain: evidence for translocation of cell-surface receptors into the endosomal recycling pathway. *Mol Cell Neurosci* 2001; 17: 646-61.
320. Breder CD, Yamada Y, Yasuda K, Seino S, Saper CB, Bell GI. Differential expression of somatostatin receptor subtypes in brain. *J Neurosci* 1992; 12: 3920-34.
321. Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M. Pituitary and hypothalamic somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in the food-deprived and diabetic rat. *Endocrinology* 1994; 135: 1787-92.
322. Kong H, DePaoli AM, Breder CD, Yasuda K, Bell GI, Reisine T. Differential expression of messenger RNAs for somatostatin receptor subtypes SSTR1, SSTR2 and SSTR3 in adult rat brain: analysis by RNA blotting and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 1994; 59: 175-84.
323. Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB. The somatostatin receptor family. *Life Sci* 1995; 57: 1249-65.
324. Perez J , Rigo M, Kaupmann K, Bruns C, Yasuda K, Bell GI, Lubbert H, Hoyer D. Localization of somatostatin (SRIF) SSTR-1, SSTR-2 and SSTR-3 receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994; 349: 145-60.
325. Raulf F , Perez J, Hoyer D, Bruns C. Differential expression of five somatostatin receptor subtypes, SSTR1-5, in the CNS and peripheral tissue. *Digestion* 1994; 55 Suppl 3: 46-53.
326. Schindler M, Harrington KA, Humphrey PP, Emson PC. Cellular localisation and co-expression of somatostatin receptor messenger RNAs in the human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 34: 321-6.
327. Thoss VS, Perez J, Probst A, Hoyer D. Expression of five somatostatin receptor mRNAs in the human brain and pituitary. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1996; 354: 411-9.
328. O'Carroll AM, Krempels K. Widespread distribution of somatostatin receptor messenger ribonucleic acids in rat pituitary . *Endocrinology* 1995; 136: 5224-7.

329. Perez J , Hoyer D. Co-expression of somatostatin SSTR-3 and SSTR-4 receptor messenger RNAs in the rat brain. *Neuroscience* 1995; 64: 241-53.
330. Senaris RM, Schindler M, Humphrey PP, Emson PC. Expression of somatostatin receptor 3 mRNA in the motoneurons of the rat spinal cord, and the sensory neurons of the spinal ganglia. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 29: 185-90.
331. Harrington KA, Schindler M, Humphrey PP, Emson PC. Expression of messenger RNA for somatostatin receptor subtype 4 in adult rat brain. *Neurosci Lett* 1995; 188: 17-20.
332. Kumar U , Sasi R, Suresh S, Patel A, Thangaraju M, Metrakos P, Patel SC, Patel YC. Subtype-selective expression of the five somatostatin receptors (hSSTR1-5) in human pancreatic islet cells: a quantitative double-label immunohistochemical analysis. *Diabetes* 1999; 48: 77-85.
333. Krempels K, Hunyady B, O'Carroll AM, Mezey E. Distribution of somatostatin receptor messenger RNAs in the rat gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1997; 112: 1948-60.
334. Le Romancer M, Cherifi Y, Levasseur S, Laigneau JP, Peranzi G, Jais P, Lewin MJ, Reyl-Desmars F. Messenger RNA expression of somatostatin receptor subtypes in human and rat gastric mucosae. *Life Sci* 1996; 58: 1091-8.
335. Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M. Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinology* 1993; 133: 2561-7.
336. Caron P , Buscail L, Beckers A, Esteve JP, Igout A, Hennen G, Susini C. Expression of somatostatin receptor SST4 in human placenta and absence of octreotide effect on human placental growth hormone concentration during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3771-6.
337. Zhu LJ, Krempels K, Bardin CW, O'Carroll AM, Mezey E. The localization of messenger ribonucleic acids for somatostatin receptors 1, 2, and 3 in rat testis. *Endocrinology* 1998; 139: 350-7.
338. Khare S , Kumar U, Sasi R, Puebla L, Calderon L, Lemstrom K, Hayry P, Patel AY. Differential regulation of somatostatin receptor types 1-5 in rat aorta after angioplasty. *FASEB J* 1999; 13: 387-94.
339. Ferone D, Van Hagen PM, Van Koetsveld PM, Zuijderwijk J, Mooy DM, Lichtenauer-Kaligis EG, Colao A, Bogers AJ, Lombardi G, Lamberts SW, Hofland LJ. In vitro characterization of somatostatin receptors in the human thymus and effects of somatostatin and octreotide on cultured thymic epithelial cells . *Endocrinology* 1999; 140: 373-80.
340. Weinstock JV, Elliott D. The somatostatin immunoregulatory circuit present at sites of chronic inflammation. *Eur J Endocrinol* 2000; 143 Suppl 1: S15-S19.
341. Elliott DE, Li J, Blum AM, Metwali A, Patel YC, Weinstock JV. SSTR2A is the dominant somatostatin receptor subtype expressed by inflammatory cells, is widely expressed and directly regulates T cell IFN-gamma release. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2454-63.
342. Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Papakonstanti E, Stourmaras C, Emmanouel DS, Castanas E. Identification and characterization of opioid and somatostatin binding sites in the opossum kidney (OK) cell line and their effect on growth. *J Cell Biochem* 1996; 63: 410-21.
343. Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Armatas P, Hebert F, Sun B, Feil A, Kiaris H, Nagy A. Targeted cytotoxic somatostatin analogue AN-238 inhibits somatostatin receptor-positive experimental colon cancers independently of their p53 status. *Cancer Res* 2002; 62: 781-8.
344. Dizeyi N, Konrad L, Bjartell A, Wu H, Gadaleanu V, Hansson J, Helboe L, Abrahamsson PA. Localization and mRNA expression of somatostatin receptor subtypes in human prostatic tissue and prostate cancer cell lines . *Urol Oncol* 2002; 7: 91-8.
345. Ferjoux G, Bousquet C, Cordelier P, Benali N, Lopez F, Rochaix P, Buscail L, Susini C. Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation. *J Physiol Paris* 2000; 94: 205-10.
346. Arena S , Barbieri F, Thellung S, Pirani P, Corsaro A, Villa V, Dadati P, Dorcaratto A, Lapertosa G, Ravetti JL, Spaziante R, Schettini G, Florio T. Expression of somatostatin receptor mRNA in human meningiomas and their implication in in vitro antiproliferative activity. *J Neurooncol* 2004; 66: 155-66.
347. Mawrin C, Schulz S, Pauli SU, Treuheit T, Diete S, Dietzmann K, Firsching R, Schulz S, Holtt V. Differential expression of sst1, sst2A, and sst3 somatostatin receptor proteins in low-grade and high-grade astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63: 13-9.

348. Schulz S, Schmitt J, Weise W. Frequent expression of immunoreactive somatostatin receptors in cervical and endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2003; 89: 385-90.
349. Fjallskog ML, Ludvigsen E, Stridsberg M, Oberg K, Eriksson B, Janson ET. Expression of somatostatin receptor subtypes 1 to 5 in tumor tissue and intratumoral vessels in malignant endocrine pancreatic tumors. *Med Oncol* 2003; 20: 59-67.
350. Oda Y, Tanaka Y, Naruse T, Sasanabe R, Tsubamoto M, Funahashi H. Expression of somatostatin receptor and effects of somatostatin analog on pancreatic endocrine tumors. *Surg Today* 2002; 32: 690-4.
351. Hall GH, Turnbull LW, Richmond I, Helboe L, Atkin SL. Localisation of somatostatin and somatostatin receptors in benign and malignant ovarian tumours. *Br J Cancer* 2002; 87: 86-90.
352. Papotti M, Croce S, Bello M, Bongiovanni M, Allia E, Schindler M, Bussolati G. Expression of somatostatin receptor types 2, 3 and 5 in biopsies and surgical specimens of human lung tumours. Correlation with preoperative octreotide scintigraphy. *Virchows Arch* 2001; 439: 787-97.
353. Lamberts SW, Krenning EP, Klijn JG, Reubi JC. The clinical use of somatostatin analogues in the treatment of cancer. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1990; 4: 29-49.
354. Lamberts SW, de Herder WW, Hofland LJ. Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 451-7.
355. Reubi JC, Zimmermann A, Jonas S, Waser B, Neuhaus P, Laderach U, Wiedenmann B. Regulatory peptide receptors in human hepatocellular carcinomas. *Gut* 1999; 45: 766-74.
356. Chen C, Israel JM, Vincent JD. Electrophysiological responses to somatostatin of rat hypophysial cells in somatotroph-enriched primary cultures. *J Physiol* 1989; 408: 493-510.
357. Bertherat J, Bluet-Pajot MT, Epelbaum J. Neuroendocrine regulation of growth hormone. *Eur J Endocrinol* 1995; 132: 12-24.
358. Bluet-Pajot MT, Epelbaum J, Gourdj D, Hammond C, Kordon C. Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18: 101-23.
359. Shimon I, Taylor JE, Dong JZ, Bitonte RA, Kim S, Morgan B, Coy DH, Culler MD, Melmed S. Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary cultures. Differential role of SSTR2 and SSTR5 for growth hormone, thyroid-stimulating hormone, and prolactin regulation. *J Clin Invest* 1997; 99: 789-98.
360. Chey WY, Chang T. Neural hormonal regulation of exocrine pancreatic secretion. *Pancreatology* 2001; 1: 320-35.
361. Whitehouse I, Beglinger C, Ruttimann G, Gyr K. Inhibition of pentagastrin-stimulated acid secretion after subcutaneous administration of a new somatostatin analogue. *Gut* 1986; 27: 141-6.
362. Raptis S, Schlegel W, Lehmann E, Dollinger HC, Zoupas C. Effects of somatostatin on the exocrine pancreas and the release of duodenal hormones. *Metabolism* 1978; 27: 1321-8.
363. Shiratori K, Watanabe S, Takeuchi T. Somatostatin analog, SMS 201-995, inhibits pancreatic exocrine secretion and release of secretin and cholecystokinin in rats. *Pancreas* 1991; 6: 23-30.
364. Creutzfeldt W, Lembcke B, Folsch UR, Schleser S, Koop I. Effect of somatostatin analogue (SMS 201-995, Sandostatin) on pancreatic secretion in humans. *Am J Med* 1987; 82: 49-54.
365. Van Liessum PA, Hopman WP, Pieters GF, Smals AG, Tangerman A, Jansen JB, Rosenbusch G, Lamers CB. Postprandial exocrine pancreatic function during long-term treatment with the somatostatin analogue SMS 201-995 in acromegalic patients. *Eur J Clin Invest* 1990; 20: 348-53.
366. Hopman WP, Van Liessum PA, Pieters GF, Smals AG, Tangerman A, Jansen JB, Rosenbusch G, Lamers CB, Kloppenborg PW. Pancreatic exocrine and gallbladder function during long-term treatment with octreotide (SMS 201-995). *Digestion* 1990; 45 Suppl 1: 72-6.
367. Krejs GJ, Browne R, Raskin P. Effect of intravenous somatostatin on jejunal absorption of glucose, amino acids, water, and electrolytes. *Gastroenterology* 1980; 78: 26-31.
368. Johansson C, Efendic S, Wisen O, Uvnas-Wallensten K, Luft R. Effects of short-time somatostatin infusion on the gastric and intestinal propulsion in humans. *Scand J Gastroenterol* 1978; 13: 481-3.
369. Fuessl HS, Carolan G, Williams G, Bloom SR. Effect of a long-acting somatostatin analogue (SMS 201-995) on postprandial gastric emptying of <sup>99m</sup>Tc-tin colloid and mouth-to-caecum transit time in man. *Digestion* 1987; 36: 101-7.
370. Matrella E, Valatas V, Notas G, Roumpaki H, Xidakis C, Hadzidakis A, Mouzas I, Kouroumalis E. Bolus somatostatin but not octreotide reduces hepatic sinusoidal pressure by a NO-independent mechanism in chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 857-64.

371. Vora J, Owens DR, Luzio S, Atiea J, Ryder R, Hayes TM. Renal response to intravenous somatostatin in insulin-dependent diabetic patients and normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 975-9.
372. Vora JP, Owens DR, Ryder R, Atiea J, Luzio S, Hayes TM. Effect of somatostatin on renal function. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; 292: 1701-2.
373. Ganten D. Peptidergic control of cardiovascular function: the angiotensin paradigm. *Eur Heart J* 1990; 11 Suppl B: 72-8.
374. Schettini G. Brain somatostatin: receptor-coupled transducing mechanisms and role in cognitive functions. *Pharmacol Res* 1991; 23: 203-15.
375. Raynor K, Lucki I, Reisine T. Somatostatin receptors in the nucleus accumbens selectively mediate the stimulatory effect of somatostatin on locomotor activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 265: 67-73.
376. Casnici C, Lattuada D, Franco P, Cattaneo L, Marelli O. Regulation of human peripheral blood lymphocytes IL-10 BY SMS 201-995. *J Neuroimmunol* 2004; 149: 210-6.
377. Solomou K, Ritter MA, Palmer DB. Somatostatin is expressed in the murine thymus and enhances thymocyte development. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1550-9.
378. Levite M. Nerve-driven immunity. The direct effects of neurotransmitters on T-cell function. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917: 307-21.
379. Casnici C, Lattuada D, Perego C, Franco P, Marelli O. Inhibitory effect of somatostatin on human T lymphocytes proliferation. *Int J Immunopharmacol* 1997; 19 : 721-7.
380. de Lecea L, del Rio JA, Criado JR, Alcantara S, Morales M, Danielson PE, Henriksen SJ, Soriano E, Sutcliffe JG. Cortistatin is expressed in a distinct subset of cortical interneurons. *J Neurosci* 1997; 17: 5868-80.
381. Schweitzer P, Madamba SG, Siggins GR. The sleep-modulating peptide cortistatin augments the h-current in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2003; 23: 10884-91.
382. Flood JF, Uezu K, Morley JE. The cortical neuropeptide, cortistatin-14, impairs post-training memory processing. *Brain Res* 1997; 775: 250-2.
383. Sanchez-Alavez M, Gomez-Chavarin M, Navarro L, Jimenez-Anguiano A, Murillo-Rodriguez E, Prado-Alcala RA, Drucker-Colin R, Prospero-Garcia O. Cortistatin modulates memory processes in rats. *Brain Res* 2000; 858: 78-83.
384. Sutcliffe JG, de Lecea L. Novel neurotransmitters for sleep and energy homeostasis. *Results Probl Cell Differ* 1999; 26: 239-55.
385. Mendez-Diaz M, Guevara-Martinez M, Alquicira CR, Guzman VK, Prospero-Garcia O. Cortistatin, a modulatory peptide of sleep and memory, induces analgesia in rats. *Neurosci Lett* 2004; 354: 242-4.
386. Braun H, Schulz S, Becker A, Schroder H, Hollt V. Protective effects of cortistatin (CST-14) against kainate-induced neurotoxicity in rat brain. *Brain Res* 1998; 803: 54-60.
387. Calbet M, Guadano-Ferraz A, Spier AD, Maj M, Sutcliffe JG, Przewlocki R, de Lecea L. Cortistatin and somatostatin mRNAs are differentially regulated in response to kainate. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 72: 55-64.
388. Rauca C, Schafer K, Hollt V. Effects of somatostatin, octreotide and cortistatin on ischaemic neuronal damage following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999; 360: 633-8.
389. Benso A, Gottero C, Prodam F, Gauna C, Destefanis S, Filtri L, Van Der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E, Broglio F. Effects of cortistatin-14 and somatostatin-14 on the endocrine response to hexarelin in humans. *J Endocrinol Invest* 2003; 26: 599-603.
390. Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Prodam F, Grottoli S, Papotti M, Muccioli G, Van Der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E. Endocrine activities of cortistatin-14 and its interaction with GHRH and ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87 : 3783-90.
391. Deghenghi R, Avallone R, Torsello A, Muccioli G, Ghigo E, Locatelli V. Growth hormone-inhibiting activity of cortistatin in the rat. *J Endocrinol Invest* 2001; 24: RC31-RC33.
392. Deghenghi R, Papotti M, Ghigo E, Muccioli G. Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *J Endocrinol Invest* 2001; 24: RC1-RC3.

393. Cassoni P, Muccioli G, Marrocco T, Volante M, Allia E, Ghigo E, Deghenghi R, Papotti M. Cortistatin-14 inhibits cell proliferation of human thyroid carcinoma cell lines of both follicular and parafollicular origin. *J Endocrinol Invest* 2002; 25: 362-8.
394. Papotti M, Tarabra E, Allia E, Bozzalla-Cassione F, Broglio F, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G. Presence of cortistatin in the human pancreas. *J Endocrinol Invest* 2003; 26: RC15-RC18.
395. Albini A, Florio T, Giunciuglio D, Masiello L, Carlone S, Corsaro A, Thellung S, Cai T, Noonan DM, Schettini G. Somatostatin controls Kaposi's sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis. *FASEB J* 1999; 13: 647-55.
396. Schally AV, Comaru-Schally AM, Nagy A, Kovacs M, Szepeshazi K, Plonowski A, Varga JL, Halmos G. Hypothalamic hormones and cancer. *Front Neuroendocrinol* 2001; 22: 248-91.
397. Woltering EA, Watson JC, Alperin-Lea RC, Sharma C, Keenan E, Kurozawa D, Barrie R. Somatostatin analogs: angiogenesis inhibitors with novel mechanisms of action. *Invest New Drugs* 1997; 15 : 77-86.
398. Bajetta E, Procopio G, Buzzoni R, Catena L, Ferrari L, Del Vecchio M. Advances in diagnosis and therapy of neuroendocrine tumors. *Expert Rev Anticancer Ther* 2001; 1: 371-81.
399. Lamberts SW, Van Der Lely AJ, Hofland LJ. New somatostatin analogs: will they fulfil old promises? *Eur J Endocrinol* 2002; 146: 701-5.
400. Ingle JN, Suman VJ, Kardinal CG, Krook JE, Mailliard JA, Veeder MH, Loprinzi CL, Dalton RJ, Hartmann LC, Conover CA, Pollak MN. A randomized trial of tamoxifen alone or combined with octreotide in the treatment of women with metastatic breast carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 1284-92.
401. Plonowski A, Schally AV, Koppan M, Nagy A, Arencibia JM, Csernus B, Halmos G. Inhibition of the UCI-107 human ovarian carcinoma cell line by a targeted cytotoxic analog of somatostatin, AN-238. *Cancer* 2001; 92: 1168-76.
402. Kiaris H, Schally AV, Nagy A, Szepeshazi K, Hebert F, Halmos G. A targeted cytotoxic somatostatin (SST) analogue, AN-238, inhibits the growth of H-69 small-cell lung carcinoma (SCLC) and H-157 non-SCLC in nude mice. *Eur J Cancer* 2001; 37: 620-8.
403. Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Breeman WA, Kooij PP, Oei HY, van Hagen M, Postema PT, de Jong M, Reubi JC, . Somatostatin receptor scintigraphy with [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>]- and [<sup>123</sup>I-Tyr<sup>3</sup>]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur J Nucl Med* 1993; 20: 716-31.
404. Van Der Lely AJ, de Herder WW, Krenning EP, Kwekkeboom DJ. Octreoscan radioreceptor imaging. *Endocrine* 2003; 20: 307-11.
405. Brownstein MJ. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 5391-3.
406. Hughes J, Kosterlitz HW. Opioid Peptides: introduction. *Br Med Bull* 1983; 39: 1-3.
407. Noda M, Furutani Y, Takahashi H, Toyosato M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S, Numa S. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature* 1982; 295: 202-6.
408. Kakidani H, Furutani Y, Takahashi H, Noda M, Morimoto Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Nakanishi S, Numa S. Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature* 1982; 298: 245-9.
409. Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang AC, Cohen SN, Numa S. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* 1979; 278: 423-7.
410. Hollt V. Opioid peptide processing and receptor selectivity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1986; 26: 59-77.
411. Bardin CW, Chen CL, Morris PL, Gerendai I, Boitani C, Liotta AS, Margioris A, Krieger DT. Proopiomelanocortin-derived peptides in testis, ovary, and tissues of reproduction. *Recent Prog Horm Res* 1987; 43: 1-28.
412. Fujisawa M, Bardin CW, Morris PL. Germ cell factor(s) regulates opioid gene expression in Sertoli cells. *Recent Prog Horm Res* 1993; 48: 497-503.
413. Zoumakis E, Margioris AN, Makrigiannakis A, Stournaras C, Gravanis A. Human endometrium as a neuroendocrine tissue: expression, regulation and biological roles of endometrial corticotropin-releasing hormone (CRH) and opioid peptides. *J Endocrinol Invest* 1997; 20: 158-67.
414. Sirinek LP, O'Dorisio MS. Modulation of immune function by intestinal neuropeptides. *Acta Oncol* 1991; 30: 509-17.

415. Pampusch MS, Osinski MA, Serie JR, Murtaugh MP, Brown DR. Opioid receptor gene expression in the porcine immune system. *Adv Exp Med Biol* 1998; 437: 59-65.
416. Cabot PJ. Immune-derived opioids and peripheral antinociception. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28: 230-2.
417. Rosen H, Bar-Shavit Z. Dual role of osteoblastic proenkephalin derived peptides in skeletal tissues. *J Cell Biochem* 1994; 55: 334-9.
418. Paus R, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Mecklenburg L, Luger T, Slominski A. The skin POMC system (SPS). Leads and lessons from the hair follicle. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 885: 350-63.
419. Livett BG, Marley PD, Wan DC, Zhou XF. Peptide regulation of adrenal medullary function. *J Neural Transm Suppl* 1990; 29: 77-89.
420. Fields HL. Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. *Prog Brain Res* 2000; 122: 245-53.
421. Terenius L. Opioid peptides, pain and stress. *Prog Brain Res* 1992; 92: 375-83.
422. Junien JL, Wettstein JG. Role of opioids in peripheral analgesia. *Life Sci* 1992; 51: 2009-18.
423. Dickenson AH. Mechanisms of the analgesic actions of opiates and opioids. *Br Med Bull* 1991; 47: 690-702.
424. Szeto HH. Dynorphin and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during fetal development. *Life Sci* 2003; 73: 749-58.
425. Micevych P, Sinchak K. Estrogen and endogenous opioids regulate CCK in reproductive circuits. *Peptides* 2001; 22: 1235-44.
426. Houben H, Deneff C. Bioactive peptides in anterior pituitary cells. *Peptides* 1994; 15: 547-82.
427. Plosker SM, Marshall LA, Martin MC, Jaffe RB. Opioid, catecholamine, and steroid interaction in prolactin and gonadotropin regulation. *Obstet Gynecol Surv* 1990; 45: 441-53.
428. Molina PE. Stress-specific opioid modulation of haemodynamic counter-regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29: 248-53.
429. Salis MB, Emanuelli C, Milia AF, Guerrini R, Madeddu P. Studies of the cardiovascular effects of nociceptin and related peptides. *Peptides* 2000; 21: 985-93.
430. Portaluppi F, Vergnani L, Manfredini R, Fersini C. Endocrine mechanisms of blood pressure rhythms. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 783: 113-31.
431. Schadt JC. Sympathetic and hemodynamic adjustments to hemorrhage: a possible role for endogenous opioid peptides. *Resuscitation* 1989; 18: 219-28.
432. Moss IR, Lafferriere A. Central neuropeptide systems and respiratory control during development. *Respir Physiol Neurobiol* 2002; 131: 15-27.
433. Bonham AC. Neurotransmitters in the CNS control of breathing. *Respir Physiol* 1995; 101: 219-30.
434. Shook JE, Watkins WD, Camporesi EM. Differential roles of opioid receptors in respiration, respiratory disease, and opiate-induced respiratory depression. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 895-909.
435. Micevych P, Chaban V, Quesada A, Sinchak K. Oestrogen modulates cholecystokinin: opioid interactions in the nervous system. *Pharmacol Toxicol* 2002; 91: 387-97.
436. Bodnar RJ, Hadjimarkou MM. Endogenous opiates and behavior: 2002. *Peptides* 2003; 24: 1241-302.
437. Sacerdote P, Limiroli E, Gaspani L. Experimental evidence for immunomodulatory effects of opioids. *Adv Exp Med Biol* 2003; 521: 106-16.
438. Sharp BM. Opioid receptor expression and intracellular signaling by cells involved in host defense and immunity. *Adv Exp Med Biol* 2003; 521: 98-105.
439. Jessop DS. Neuropeptides in the immune system: functional roles in health and disease. *Front Horm Res* 2002; 29: 50-68.
440. Zagon IS, McLaughlin PJ. Opioids and the apoptotic pathway in human cancer cells. *Neuropeptides* 2003; 37: 79-88.
441. Kikuchi Y, Kita T, Miyauchi M, Iwano I, Kato K. Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation in vitro by neuroendocrine hormones. *Gynecol Oncol* 1989; 32: 60-4.
442. Foster JS, Moore RN. Dynorphin and related opioid peptides enhance tumoricidal activity mediated by murine peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 1987; 42: 171-4.



443. Murgu AJ. Inhibition of B16-BL6 melanoma growth in mice by methionine-enkephalin. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75: 341-4.
444. Reinscheid RK, Nothacker H, Civelli O. The orphanin FQ/nociceptin gene: structure, tissue distribution of expression and functional implications obtained from knockout mice. *Peptides* 2000; 21: 901-6.
445. Kampa M , Bakogeorgou E, Hatzoglou A, Damianaki A, Martin PM, Castanas E. Opioid alkaloids and casomorphin peptides decrease the proliferation of prostatic cancer cell lines (LNCaP, PC3 and DU145) through a partial interaction with opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 1997; 335: 255-65.
446. Kampa M , Loukas S, Hatzoglou A, Martin P, Martin PM, Castanas E. Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human alpha S1 casein (alpha S1-casomorphin, and alpha S1-casomorphin amide). *Biochem J* 1996; 319 ( Pt 3): 903-8.
447. Kampa M , Loukas S, Tsapis A, Castanas E. Receptorphin: a conserved peptide derived from the sequence of the opioid receptor, with opioid displacement activity and potent antiproliferative actions in tumor cells. *BMC Pharmacol* 2001; 1: 9 .
448. Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 1976; 197: 517-32.
449. Lord JA , Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 1977; 267: 495-9.
450. Wang JB , Johnson PS, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Uhl GR. Human mu opiate receptor. cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Lett* 1994; 338: 217-22.
451. Knapp RJ, Malatynska E, Fang L, Li X, Babin E, Nguyen M, Santoro G, Varga EV, Hruby VJ, Roeske WR, . Identification of a human delta opioid receptor: cloning and expression. *Life Sci* 1994; 54: L463-L469.
452. Mansson E, Bare L, Yang D. Isolation of a human kappa opioid receptor cDNA from placenta. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202: 1431-7.
453. Raynor K, Kong H, Mestek A, Bye LS, Tian M, Liu J, Yu L, Reisine T. Characterization of the cloned human mu opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 423-8.
454. Bare LA , Mansson E, Yang D. Expression of two variants of the human mu opioid receptor mRNA in SK-N-SH cells and human brain. *FEBS Lett* 1994; 354: 213-6.
455. Befort K, Mattei MG, Roeckel N, Kieffer B. Chromosomal localization of the delta opioid receptor gene to human 1p34.3-p36.1 and mouse 4D bands by in situ hybridization. *Genomics* 1994; 20: 143-5.
456. Yasuda K, Espinosa R, III, Takeda J , Le Beau MM, Bell GI. Localization of the kappa opioid receptor gene to human chromosome band 8q11.2. *Genomics* 1994; 19: 596-7.
457. Kosterlitz HW, Paterson SJ, Robson LE. Characterization of the kappa-subtype of the opiate receptor in the guinea-pig brain. *Br J Pharmacol* 1981; 73: 939-49.
458. Mosberg HI, Hurst R, Hruby VJ, Gee K, Yamamura HI, Galligan JJ, Burks TF. Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward delta opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 5871-4.
459. Vonvoigtlander PF, Lahti RA, Ludens JH. U-50,488: a selective and structurally novel non-Mu (kappa) opioid agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 224: 7-12.
460. Lahti RA, Mickelson MM, McCall JM, Von Voigtlander PF. [3H]U-69593 a highly selective ligand for the opioid kappa receptor. *Eur J Pharmacol* 1985; 109: 281-4.
461. Pasternak GW, Wood PJ. Multiple mu opiate receptors. *Life Sci* 1986; 38: 1889-98.
462. Pasternak GW. Multiple morphine and enkephalin receptors and the relief of pain. *JAMA* 1988; 259 : 1362-7.
463. Thompson RC, Mansour A, Akil H, Watson SJ. Cloning and pharmacological characterization of a rat mu opioid receptor. *Neuron* 1993; 11: 903-13.
464. Portoghese PS, Sultana M, Nagase H, Takemori AE. A highly selective delta 1-opioid receptor antagonist: 7-benzylidenenaltrexone. *Eur J Pharmacol* 1992; 218: 195-6.
465. Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T. Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 1994; 45: 330-4.

466. Chavkin C, James IF, Goldstein A. Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. *Science* 1982; 215: 413-5.
467. Zukin RS, Eghbali M, Olive D, Unterwald EM, Tempel A. Characterization and visualization of rat and guinea pig brain kappa opioid receptors: evidence for kappa 1 and kappa 2 opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 4061-5.
468. Castanas E, Giraud P, Bourhim N, Cantau P, Oliver C. Kappa 3: a novel subtype of the kappa opioid site in bovine adrenal medulla, highly selective for Met-enkephalin-Arg6-Phe7. *Neuropeptides* 1984; 5: 133-6.
469. Wollemann M, Benyhe S, Simon J. The kappa-opioid receptor: evidence for the different subtypes. *Life Sci* 1993; 52: 599-611.
470. Devlin T, Shoemaker WJ. Characterization of kappa opioid binding using dynorphin A1-13 and U69,593 in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 253 : 749-59.
471. Clark JA, Liu L, Price M, Hersh B, Edelson M, Pasternak GW. Kappa opiate receptor multiplicity: evidence for two U50,488-sensitive kappa 1 subtypes and a novel kappa 3 subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 251: 461-8.
472. Minami M, Satoh M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res* 1995; 23: 121-45.
473. North RA. Membrane conductances and opioid receptor subtypes. *NIDA Res Monogr* 1986; 71: 81-8.
474. Grudt TJ, Williams JT. Opioid receptors and the regulation of ion conductances. *Rev Neurosci* 1995; 6: 279-86.
475. North RA, Williams JT, Surprenant A, Christie MJ. Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 5487-91.
476. Trapaidze N, Gomes I, Cvejic S, Bansinath M, Devi LA. Opioid receptor endocytosis and activation of MAP kinase pathway. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 76: 220-8.
477. Yin D, Mufson RA, Wang R, Shi Y. Fas-mediated cell death promoted by opioids. *Nature* 1999; 397: 218.
478. Singhal PC, Kapasi AA, Reddy K, Franki N, Gibbons N, Ding G. Morphine promotes apoptosis in Jurkat cells. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 650-8.
479. Singhal P, Kapasi A, Reddy K, Franki N. Opiates promote T cell apoptosis through JNK and caspase pathway. *Adv Exp Med Biol* 2001; 493: 127-35.
480. Singhal PC, Sharma P, Kapasi AA, Reddy K, Franki N, Gibbons N. Morphine enhances macrophage apoptosis. *J Immunol* 1998; 160: 1886-93.
481. Kampa M, Hatzoglou A, Notas G, Niniraki M, Kouroumalis E, Castanas E. Opioids are non-competitive inhibitors of nitric oxide synthase in T47D human breast cancer cells. *Cell Death Differ* 2001; 8: 943-52.
482. Chavkin C, McLaughlin JP, Cerver JP. Regulation of opioid receptor function by chronic agonist exposure: constitutive activity and desensitization. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 20-5.
483. Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Hatzoglou C, Martin PM, Castanas E. Antiproliferative and receptor binding properties of alpha- and beta- casomorphins in the T47D human breast cancer cell line. *Eur J Pharmacol* 1996; 310: 217-23.
484. Hatzoglou A, Ouafik L, Bakogeorgou E, Thermos K, Castanas E. Morphine cross-reacts with somatostatin receptor SSTR2 in the T47D human breast cancer cell line and decreases cell growth. *Cancer Res* 1995; 55: 5632-6.
485. Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Kampa M, Panagiotou S, Martin PM, Loukas S, Castanas E. Somatostatin and opioid receptors in mammary tissue. Role in cancer cell growth. *Adv Exp Med Biol* 2000; 480: 55-63.
486. Hatsukari I, Hitosugi N, Matsumoto I, Nagasaka H, Sakagami H. Induction of early apoptosis marker by morphine in human lung and breast carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 2003; 23: 2413-7.
487. Maneckjee R, Minna JD. Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 3294-8.
488. Lee YS, Wurster RD. Differential effects of methionine enkephalin on the growth of brain tumor cells. *J Neurooncol* 1994; 19: 11-5.

489. Sasamura T, Nakamura S, Iida Y, Fujii H, Murata J, Saiki I, Nojima H, Kuraishi Y. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. *Eur J Pharmacol* 2002; 441 : 185-91.
490. Faith RE, Murgo AJ. Inhibition of pulmonary metastases and enhancement of natural killer cell activity by methionine-enkephalin. *Brain Behav Immun* 1988; 2: 114-22.
491. McLaughlin PJ, Levin RJ, Zagon IS. Regulation of human head and neck squamous cell carcinoma growth in tissue culture by opioid growth factor. *Int J Oncol* 1999; 14: 991-8.
492. McLaughlin PJ, Zagon IS, Skitzki J. Human neuroblastoma cell growth in tissue culture is regulated by opioid growth factor. *Int J Oncol* 1999; 14: 373-80.
493. Bisignani GJ, McLaughlin PJ, Ordille SD , Beltz MS, Jarowenko MV, Zagon IS. Human renal cell cancer proliferation in tissue culture is tonically inhibited by opioid growth factor. *J Urol* 1999; 162: 2186-91.
494. Zagon IS, McLaughlin PJ. Endogenous opioid systems regulate growth of neural tumor cells in culture. *Brain Res* 1989; 490: 14-25.
495. Zagon IS, Verderame MF, McLaughlin PJ. The biology of the opioid growth factor receptor (OGFr). *Brain Res Brain Res Rev* 2002; 38: 351-76.
496. Sakaguchi M, Murayama K, Yabe K, Satoh M, Takeuchi M, Matsumura E. Beta-casomorphin-5 stimulates neurite outgrowth in a mouse neuroblastoma cell line (Neuro-2a). *Neurosci Lett* 1998; 251: 97-100.
497. Malkova NV, Krasnova SB, Navolotskaya EV, Zargarova TA, Prasolov VS . Effect of beta-endorphin and beta-endorphin-like peptide immunorphan on the growth of human leukemic cells in vitro. *Russ J Immunol* 2002; 7: 239-44.
498. Navolotskaya EV, Malkova NV, Zargarova TA, Lepikhova TN, Krasnova SB , Lipkin VM. Effect of synthetic beta-endorphin-like peptide immunorphan on human T lymphocytes. *Biochemistry (Mosc )* 2002; 67: 357-63.
499. Jairaj M, Watson DG, Grant MH, Skellern GG. The toxicity of opiates and their metabolites in HepG2 cells. *Chem Biol Interact* 2003; 146: 121-9.
500. Reisine T, Bell GI. Molecular biology of opioid receptors. *Trends Neurosci* 1993; 16: 506-10.
501. Konagaya T, Kusugami K, Yamamoto H, Nishio Y, Kaneko H, Nagai H, Mitsuma T. Effect of intragastric administration of beta-endorphin on thyrotropin-releasing hormone and somatostatin release into gastric lumen of rats. *J Gastroenterol* 1998; 33: 27-31.
502. Ghosh S , Geller EB, Adler MW. Interaction of cholecystokinin and somatostatin with a selective mu-opioid agonist and mu- and kappa-antagonists in thermoregulation. *Brain Res* 1997; 745: 152-7.
503. Chiodera P, Gnudi A, Bianconi L, Capretti L, Fagnoni F, Volpi R, Coiro V. Naloxone abolishes the inhibiting effect of somatostatin on the release of oxytocin evoked by insulin-induced hypoglycemia in humans. *Metabolism* 1989; 38: 709-11.
504. Stirnweiss J, Hartrodt B, Greksch G, Sturzebecher U, Bohmer FD, Neubert K, Liebmann C. Tyr-c[D-Orn-Tyr(Bzl)-Pro-Gly]: a novel antiproliferative acting somatostatin receptor agonist with mu-opioid receptor-sensitizing properties. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 13-22.
505. Penn RD , Paice JA, Kroin JS. Octreotide: a potent new non-opiate analgesic for intrathecal infusion. *Pain* 1992; 49: 13-9.
506. Paunovic VR, Popovic V. The development of dependence to an octapeptide somatostatin analog: contribution to the study of somatostatin analgesia. *Biol Psychiatry* 1989; 26: 97-101.
507. Shook JE, Pelton JT, Lemcke PK, Porreca F, Hruby VJ, Burks TF. Mu opioid antagonist properties of a cyclic somatostatin octapeptide in vivo: identification of mu receptor-related functions. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 242: 1-7.
508. Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Laugsch M, Holtt V, Schulz S. Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem* 2002; 277 : 19762-72.
509. Stonans I, Stonane E, Russwurm S, Deigner HP, Bohm KJ, Wiederhold M, Jager L, Reinhart K. HepG2 human hepatoma cells express multiple cytokine genes. *Cytokine* 1999; 11: 151-6.
510. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
511. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.

512. Talme T , Ivanoff J, Hagglund M, Van Neerven RJ, Ivanoff A, Sundqvist KG. Somatostatin receptor (SSTR) expression and function in normal and leukaemic T-cells. Evidence for selective effects on adhesion to extracellular matrix components via SSTR2 and/or 3. *Clin Exp Immunol* 2001; 125: 71-9.
513. Liapakis G, Thermos K. Characterization of [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>11</sup>-somatostatin binding sites in the rabbit retina. *Neuropeptides* 1992; 21: 13-9.
514. Bylund DB, Martinez JR. alpha 2-Adrenergic receptors appear in rat salivary glands after reserpine treatment. *Nature* 1980; 285: 229-30.
515. Castanas E, Bourhim N, Giraud P, Boudouresque F, Cantau P, Oliver C. Interaction of opiates with opioid binding sites in the bovine adrenal medulla: II. Interaction with kappa sites. *J Neurochem* 1985; 45: 688-99.
516. Castanas E, Bourhim N, Giraud P, Boudouresque F, Cantau P, Oliver C. Interaction of opiates with opioid binding sites in the bovine adrenal medulla: I. Interaction with delta and mu sites. *J Neurochem* 1985; 45: 677-87.
517. Sperk G , Widmann R. Somatostatin precursor in the rat striatum: changes after local injection of kainic acid. *J Neurochem* 1985; 45: 1441-7.
518. Notas G , Xidakis C, Valatas V, Kouroumalis A, Kouroumalis E. Levels of circulating endothelin-1 and nitrates/nitrites in patients with virus-related hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 2001; 8: 63-9.
519. Thangaraju M, Sharma K, Leber B, Andrews DW, Shen SH, Srikant CB. Regulation of acidification and apoptosis by SHP-1 and Bcl-2. *J Biol Chem* 1999; 274: 29549-57.
520. Zapata PD, Ropero RM, Valencia AM, Buscail L, Lopez JI, Martin-Orozco RM, Prieto JC, Angulo J, Susini C, Lopez-Ruiz P, Colas B. Autocrine regulation of human prostate carcinoma cell proliferation by somatostatin through the modulation of the SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1 . *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 915-26.
521. Lee JU, Hosotani R, Wada M, Doi R, Koshiba T, Fujimoto K, Miyamoto Y, Tsuji S, Nakajima S, Hirohashi M, Uehara T, Arano Y, Fujii N, Imamura M. Antiproliferative activity induced by the somatostatin analogue, TT-232, in human pancreatic cancer cells. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1526-34.
522. Reardon DB, Dent P, Wood SL, Kong T, Sturgill TW. Activation in vitro of somatostatin receptor subtypes 2, 3, or 4 stimulates protein tyrosine phosphatase activity in membranes from transfected Ras-transformed NIH 3T3 cells: coexpression with catalytically inactive SHP-2 blocks responsiveness. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 1062-9.
523. Dournaud P, Boudin H, Schonbrunn A, Tannenbaum GS, Beaudet A. Interrelationships between somatostatin sst2A receptors and somatostatin-containing axons in rat brain: evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous somatostatin. *J Neurosci* 1998; 18: 1056-71.
524. Reubi JC, Waser B, Liu Q, Laissue JA, Schonbrunn A. Subcellular distribution of somatostatin sst2A receptors in human tumors of the nervous and neuroendocrine systems: membranous versus intracellular location. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3882-91.
525. Ejekkar K, Abel F, Sjoberg R, Backstrom J, Kogner P, Martinsson T. Fine mapping of the human preprocortistatin gene (CORT) to neuroblastoma consensus deletion region 1p36.3-->p36.2, but absence of mutations in primary tumors. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 89: 62-6.
526. Wright K, Kolios G, Westwick J, Ward SG. Cytokine-induced apoptosis in epithelial HT-29 cells is independent of nitric oxide formation. Evidence for an interleukin-13-driven phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival mechanism. *J Biol Chem* 1999; 274: 17193-201.
527. Samonakis DN, Moschandreass J, Arnaoutis T, Skordilis P, Leontidis C, Vafiades I, Kouroumalis E. Treatment of hepatocellular carcinoma with long acting somatostatin analogues. *Oncol Rep* 2002; 9: 903-7.
528. Kreuzer OJ, Krisch B, Dery O, Bunnett NW, Meyerhof W. Agonist-mediated endocytosis of rat somatostatin receptor subtype 3 involves beta-arrestin and clathrin coated vesicles. *J Neuroendocrinol* 2001; 13: 279-87.
529. Stroh T , Jackson AC, Sarret P, Dal Farra C, Vincent JP, Kreienkamp HJ, Mazella J, Beaudet A. Intracellular dynamics of sst5 receptors in transfected COS-7 cells: maintenance of cell surface receptors during ligand-induced endocytosis. *Endocrinology* 2000; 141: 354-65.
530. Roth BL , Willins DL. What's all the RAVE about receptor internalization? *Neuron* 1999; 23: 629-31.

531. Chou CK , Ho LT, Ting LP, Hu CP, Su TS, Chang WC , Suen CS, Huang MY, Chang CM. Selective suppression of insulin-induced proliferation of cultured human hepatoma cells by somatostatin. *J Clin Invest* 1987; 79: 175-8.
532. Ballare E, Persani L, Lania AG, Filopanti M, Giammona E, Corbetta S, Mantovani S, Arosio M, Beck-Peccoz P, Faglia G, Spada A. Mutation of somatostatin receptor type 5 in an acromegalic patient resistant to somatostatin analog treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3809-14.
533. Hornick CA, Anthony CT, Hughey S, Gebhardt BM, Espenan GD, Woltering EA. Progressive nuclear translocation of somatostatin analogs. *J Nucl Med* 2000; 41: 1256-63.
534. Kenakin T. Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 346-54.
535. Wink DA , Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998; 19: 711-21.
536. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 175-95.
537. Hemish J, Nakaya N, Mittal V, Enikolopov G. Nitric oxide activates diverse signaling pathways to regulate gene expression. *J Biol Chem* 2003; 278: 42321-9.
538. Lane P, Gross SS. Cell signaling by nitric oxide. *Semin Nephrol* 1999; 19: 215-29.
539. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
540. Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, Rhodes P, Westmore K, Emson PC, Moncada S. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4392-6.
541. Brune B , Zhou J, von Knethen A. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis. *Kidney Int Suppl* 2003; S22-S24.
542. Thomas WJ, Thomas DL, Knezetic JA, Adrian TE. The role of oxygen-derived free radicals and nitric oxide in cytokine-induced antiproliferation of pancreatic cancer cells. *Pancreas* 2002; 24: 161-8.
543. Iishi H , Tatsuta M, Baba M, Yamamoto R, Uehara H, Nakaizumi A. Inhibition of experimental gastric carcinogenesis, induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats, by sodium nitroprusside, a nitric oxide generator. *Eur J Cancer* 1998; 34: 554-7.
544. Morcos E, Jansson OT, Adolfsson J, Kratz G, Wiklund NP. Endogenously formed nitric oxide modulates cell growth in bladder cancer cell lines. *Urology* 1999; 53: 1252-7.
545. Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN, Harris CC. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 955-68.
546. Thomsen LL, Lawton FG, Knowles RG, Beesley JE, Riveros-Moreno V, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 1352-4.
547. Stepnik M. Roles of nitric oxide in carcinogenesis. Protumorigenic effects. *Int J Occup Med Environ Health* 2002; 15: 219-27.
548. Lopez F , Ferjoux G, Cordelier P, Saint-Laurent N, Esteve JP, Vaysse N, Buscail L, Susini C. Neuronal nitric oxide synthase: a substrate for SHP-1 involved in sst2 somatostatin receptor growth inhibitory signaling . *FASEB J* 2001; 15: 2300-2.
549. Vasilaki A, Mouratidou M, Schulz S, Thermos K. Somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst(2) receptors in the rat retina. *Neuropharmacology* 2002; 43: 899-909.
550. Loukas S, Varoucha D, Zioudrou C, Streaty RA, Klee WA. Opioid activities and structures of alpha-casein-derived exorphins. *Biochemistry* 1983; 22: 4567-73.
551. Zioudrou C, Streaty RA, Klee WA. Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins. *J Biol Chem* 1979; 254: 2446-9.
552. Teschemacher H, Koch G. Opioids in the milk. *Endocr Regul* 1991; 25 : 147-50.
553. Teschemacher H, Koch G, Brantl V. Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers* 1997; 43: 99-117.
554. Brantl V. Novel opioid peptides derived from human beta-casein: human beta-casomorphins. *Eur J Pharmacol* 1984; 106: 213-4.
555. Kuper H , Tzonou A, Lagiou P, Mucci LA, Trichopoulos D, Stuver SO, Trichopoulou A. Diet and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Greece. *Nutr Cancer* 2000; 38: 6-12.
556. Adams ML, Meyer ER, Cicero TJ. Effects of nitric oxide-related agents on opioid regulation of rat testicular steroidogenesis. *Biol Reprod* 1996; 54: 1128-34.

557. Budziszewska B, Leskiewicz M, Jaworska-Feil L, Lason W. 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* 1999; 107: 75-9.
558. Babey AM, Kolesnikov Y, Cheng J, Inturrisi CE, Trifilletti RR, Pasternak GW. Nitric oxide and opioid tolerance. *Neuropharmacology* 1994; 33: 1463-70.
559. Bhargava HN, Bian JT, Kumar S. Mechanism of attenuation of morphine antinociception by chronic treatment with L-arginine. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281: 707-12.
560. Bhargava HN, Cao YJ. 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* 1997; 18: 1629-34.
561. Bilfinger TV, Salzet M, Fimiani C, Deutsch DG, Tramu G, Stefano GB. Pharmacological evidence for anandamide amidase in human cardiac and vascular tissues. *Int J Cardiol* 1998; 64 Suppl 1: S15-S22.
562. Stefano GB, Hartman A, Bilfinger TV, Magazine HI, Liu Y, Casares F, Goligorsky MS. Presence of the mu<sub>3</sub> opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation. *J Biol Chem* 1995; 270: 30290-3.
563. Stefano GB, Goumon Y, Bilfinger TV, Welters ID, Cadet P. Basal nitric oxide limits immune, nervous and cardiovascular excitation: human endothelia express a mu opiate receptor. *Prog Neurobiol* 2000; 60: 513-30.
564. Majeed NH, Przewlocka B, Machelska H, Przewlocki R. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. *Neuropharmacology* 1994; 33: 189-92.
565. Lue WM, Su MT, Lin WB, Tao PL. The role of nitric oxide in the development of morphine tolerance in rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 1999; 383: 129-35.
566. Ding YQ, Li JL, Lu BZ, Wang D, Zhang ML, Li JS. 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* 1998; 792: 149-53.