

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000265332



8

THE UNIVERSITY OF THE STATE OF NEW YORK
THE STATE LIBRARY
ALBANY, N. Y.

UNIVERSITY OF THE STATE OF NEW YORK





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΓΓΕΛΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΗΣ ΠΡΟΛΑΚΤΙΝΗΣ
ΚΑΙ ΣΥΓΓΕΝΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ
ΣΕ ΟΡΜΟΝΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ
ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

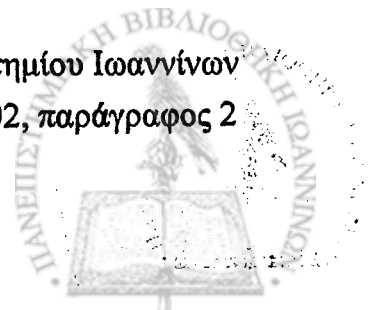
ΦΩΤΟΔΟΤΗΣ ΜΑΛΑΜΑΣ
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2
(νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)



Ημερομηνία αίτησης του κ. Μάλαμα Φωτοδότη: 26-9-2001

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 451^α/6-11-2001

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Στέφος Θεόδωρος Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τσατσούλης Αγαθοκλής Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας –Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 8-11-2001

«Μελέτη των επιδράσεων της προλακτίνης και συγγενών ορμονών σε ορμονοεξαρτώμενες κυτταρικές σειρές του μαστού και του προστάτη»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 623^α/18-12-2007

Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στέφος Θεόδωρος	Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας με έμφαση στην Εμβρυομητρική Ιατρική Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσατσούλης Αγαθοκλής	Καθηγητής Παθολογίας –Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καλφακάκου Βασιλική	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κιόρτσης Δημήτριος –Νικηφόρος	Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ντούσιος Βασίλειος	Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ογκολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ναυρόζογλου Ιορδάνης	Λέκτορας Μαιευτικής –Γυναικολογίας με ειδικές γνώσεις Γυναικολογικής –Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 20-12-2007

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας



Γραμματέας της Σχολής



ΕΠΙΧΡΟΝΟΓΡΑΦΗ

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

Στους γονείς μου,

Μιχάλη και Αγαθή

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και χρηματοδοτήθηκε από το Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων, μέσω του προγράμματος ΕΠΕΑΕΚ «Ηράκλειτος: Υποτροφίες έρευνας με προτεραιότητα στην βασική έρευνα». Μέρος των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα για αρχή να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, και επιβλέποντα της διατριβής, Καθηγητή κ. Ευαγγέλου Άγγελο για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση και την αμέριστη συμπαράστασή του σε όλους τους τομείς, καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μελέτης. Επίσης ευχαριστώ τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Στέφο Θεόδωρο, Καθηγητή της Μαιευτικής-Γυναικολογίας και κ. Τσατσούλη Αγαθοκλή, Καθηγητή της Ενδοκρινολογίας για το ενδιαφέρον τους, τη βοήθεια τους και την καθοδήγησή τους.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Χάρις Λιάπη, για την παραχώρηση του χώρου στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας όπου διενεργήθηκε μέρος των πειραμάτων, αλλά και την αμέριστη και πολύτιμη βοήθεια καθώς και τις συμβουλές της σε κάθε δυσκολία που προέκυψε.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τον διδάκτορα της Ιατρικής Σχολής, βιολόγο κ. Θωμά Χριστόφορο για την εκμάθηση διαφόρων τεχνικών κυτταρικής και μοριακής βιολογίας, τη βοήθεια του στη διενέργεια μέρους των πειραμάτων, το συνεχές ενδιαφέρον του, τις πολύτιμες συμβουλές του μαζί με τη στήριξη που παρείχε συνεχώς, σε όλες τις φάσεις της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Τζαβάρα Θεόδωρο για την εκμάθηση των τεχνικών της κυτταροκαλλιέργειας καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές του σε διάφορα θέματα. Επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κωλέττα Ευάγγελο για τις συμβουλές, τις παρατηρήσεις του και την τεχνική βοήθεια σε πολλά ζητήματα κατά τη διάρκεια της διατριβής. Την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Κωνσταντή Μαρία την ευχαριστώ θερμά για τις συμβουλές, το ενδιαφέρον της αλλά και τη βοήθεια της σε ζητήματα μοριακών τεχνικών και στην επίλυση παρόμοιων προβλημάτων. Ακόμη ευχαριστώ την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Βεζυράκη Πατρώνα, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αγγελίδη Χαράλαμπο για τη βοήθειά



τους και τις συμβουλές του σε κάθε περίπτωση. Την υποψήφια διδάκτορα Ρεντέση Γεωργία την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την άμεση και πολύτιμη βοήθειά της όταν της ζητήθηκε.

Επίσης ευχαριστώ την αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Καλφακάκου Βασιλική, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κιόρτση Δημήτριο και τον Λέκτορα κ. Καρκαμπούνα Σπυρίδωνα για το ενδιαφέρον τους και τη στήριξή τους. Ευχαριστώ τον διδάκτορα κ. Κονταργύρη Ευάγγελο για το ενδιαφέρον και τη βοήθεια σε τεχνικά θέματα. Ακόμη ευχαριστώ τα μέλη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας κ. Γούλα Ευτυχία, κ. Τζίμα Χριστίνα, κ. Γκάσκο Νικόλαο και τον κ. Γρίβα Παναγιώτη για την πρόθυμη βοήθεια που μου παρείχαν σε πολλά ζητήματα. Ακόμη ευχαριστώ όλους τους υπόλοιπους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Φυσιολογίας για την βοήθεια που μου παρείχαν όποτε τους ζητήθηκε αλλά και τη φιλική συνεργασία και συμπεριφορά απέναντί μου όλο αυτό το διάστημα. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την πολύπλευρη στήριξή τους.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

	Σελίδα
I. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	1
IA. Επιδημιολογικοί παράγοντες κινδύνου	1
IB. Γονιδιακές μεταλλάξεις στον καρκίνο του μαστού	4
IF. Διάγνωση, σταδιοποίηση και θεραπεία	5
II. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ	9
IIA. Γενικά	9
IIB. Επιδημιολογικοί παράγοντες κινδύνου	10
IIC. Γονιδιακές μεταλλάξεις στον καρκίνο του προστάτη	12
IID. Διάγνωση, σταδιοποίηση και θεραπεία	15
III. ΠΡΟΛΑΚΤΙΝΗ (PRL)	19
IIIA. Το γονίδιο της προλακτίνης και η σύνθεση του μορίου της	19
IIIB. Μετά-μετασυνθετικές τροποποιήσεις του μορίου της PRL	20
IIIC. Θέσεις σύνθεσης και ρύθμιση της έκκρισης της προλακτίνης	22
IIIC1. Ρύθμιση της έκκρισης PRL από την υπόφυση	22
IIIC2. Εξωϋποφυσιακή σύνθεση της PRL	25
IIID. Η βιολογική δράση της PRL	26
IIIE. Ο υποδοχέας της προλακτίνης	29
IIIST. Σχέση της PRL με συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις στον άνθρωπο	34
IIIZ. Σχέση προλακτίνης και καρκίνου μαστού	35
IIIZ1 In vivo δεδομένα από πειραματόζωα	35
IIIZ2. Σχέση μεταξύ του υποδοχέα της προλακτίνης και καρκίνου του μαστού	36



III3. Ανίχνευση της προλακτίνης σε καρκινικά κύτταρα	37
III4. Μιτογόνος δράση της προλακτίνης	38
III5. Ανταγωνιστές της μιτογόνου δράσης της προλακτίνης	40
III6. Επιδημιολογικά δεδομένα	41
IIIΗ. Σχέση προλακτίνης- καρκίνου προστάτη	45
IIIΗ1. Εισαγωγή	45
IIIΗ2. Ανίχνευση του υποδοχέα της PRL σε κύτταρα προστάτη	46
IIIΗ3. Δράση της PRL στο πολλαπλασιασμό κυττάρων του προστάτη	46
IIIΗ4. Δράση της υπερπρολακτιναιμίας in vivo	48
IV. Ν-ΑΚΕΤΥΛ-ΚΥΣΤΕΙΝΗ (NAC)	51
IVA. Εισαγωγή	51
IVB. Χρήση της NAC σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις	53
IVΓ. Δράσεις της NAC στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση	56
IVΔ. Δράσεις της NAC στον καρκίνο	57
IVΔ1. Μηχανισμοί της αντικαρκινικής δράσης και πειραματικά δεδομένα	57
IVΔ2. Κλινικά δεδομένα από την χρήση της NAC σε ασθενείς με καρκίνο	
V. Ν-(2- ΜΕΡΚΑΠΤΟΠΡΟΠΙΟΝΥΛ)ΓΛΥΚΙΝΗ	63
VA. Εισαγωγή	63
VB. Πειραματικά δεδομένα για τις δράσεις της MPG	63
VI. ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	67
VII. Ο ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	69
VIIA. Εισαγωγή	69
VIIΒ. Η φάση G ₁ και η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού	71
VIIΓ. Η φάση S και ο διπλασιασμός του DNA	74
VIIΔ. Η φάση G ₂ και ο έλεγχος της εισόδου στην μίτωση	74
VIIΕ. Κυτταρικός κύκλος, κυκλίνες και καρκίνος	75



VIII. ΣΚΟΠΟΣ	81
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
IX. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	85
IXΑ. Κυτταρική καλλιέργεια	85
IXΒ. Εκχύλιση και ανάλυση των πρωτεϊνών από τα κύτταρα	88
IXΓ. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS- PAGE	89
IXΔ. Ανάλυση πρωτεϊνών με αποτύπωμα κατά WESTERN	91
X. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	93
XA. Η επίδραση της PRL, της NAC, της MPG και του συνδυασμού τους στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7	93
XB. Η επίδραση της PRL, της NAC, της MPG και του συνδυασμού τους στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτη DU-145	99
XΓ. Η επίδραση της PRL στα επίπεδα των πρωτεϊνών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου	104
XI. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	111
XII. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	123
XIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	125
XIV. SUMMARY	129
XV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	131



A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνή νεοπλασία στις γυναίκες, μετά τον καρκίνο του δέρματος (22% όλων των καρκίνων το 2000), και η δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες (15% των θανάτων από καρκίνο), μετά τον καρκίνο του πνεύμονα (American Cancer Society (ACS), 2007). Η εκτιμώμενη ετήσια επίπτωση παγκοσμίως είναι 1.000.000 περιπτώσεις, με περίπου 180.000 από αυτές στις ΗΠΑ και περίπου 220.000 περιπτώσεις στην Ευρώπη, το 2000. Στις ΗΠΑ η ACS υπολογίζει ότι το έτος 2007 περίπου 178.840 γυναίκες θα προσβληθούν από καρκίνο του μαστού και 40.460 γυναίκες θα πεθάνουν από τη νόσο. Μία στις 8 γυναίκες θα προσβληθεί από καρκίνο του μαστού στη διάρκεια της ζωής της και 1 στις 33 θα αποβιώσει από αυτή τη νόσο. Στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι η νόσος προσβάλλει 1 στις 12 γυναίκες. Κατά τις τελευταίες 2 δεκαετίες η ετήσια επίπτωση στις ΗΠΑ αυξάνει σταδιακά, ωστόσο η ετήσια θνησιμότητα μειώνεται σταθερά κατά 2,3 % κατά έτος, λόγω προόδων στην έγκαιρη διάγνωση και στην εφαρμογή πιο αποτελεσματικών μεθόδων θεραπείας.

ΙΑ. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Με βάση επιδημιολογικές μελέτες, καλά διευκρινισμένοι και καθορισμένοι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού είναι οι παρακάτω :

Ηλικία : η επίπτωση της νόσου είναι χαμηλή πριν τα 25 έτη, και αυξάνει 100 φορές στην ηλικία των 45 ετών, γεγονός που οφείλεται στην ορμονική εξάρτηση της νόσου. Μετά την εμμηνόπαυση σε άλλες χώρες η συχνότητα εξακολουθεί αν αυξάνει (πχ ΗΠΑ) ενώ σε άλλες εμφανίζει στασιμότητα η και μικρή μείωση (πχ Ιαπωνία).

Γεωγραφική εντόπιση: σημαντική διαφορά (5 έως 10 φορές) υπάρχει στη συχνότητα μεταξύ χωρών χαμηλού κινδύνου (Άπω Ανατολή, Αφρική, Νότια Αμερική) και χωρών υψηλού κινδύνου (Βόρεια Αμερική και Βόρεια Ευρώπη), λόγω γενετικών παραγόντων αλλά και διαφορών στον τρόπο ζωής, διατροφής, και στους περιβαλλοντικούς παράγοντες.



Μετανάστες από χώρες χαμηλού κινδύνου σε χώρες υψηλού κινδύνου εμφανίζουν αύξηση της συχνότητας.

Αναπαραγωγικοί παράγοντες : η έκθεση στις ενδογενείς ορμόνες του φύλου καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μιας γυναίκας καθορίζεται από παράγοντες όπως η ηλικία της εμμηναρχής, η ηλικία κατά την πρώτη κύηση, ο αριθμός των κυήσεων και η ηλικία της εμμηνόπαυσης. Η πρόωμη εμμηναρχή (σε ηλικία < 12 ετών έναντι ηλικίας >14 ετών) αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού. Επίσης ο κίνδυνος αυξάνει κατά 3% για κάθε έτος μέχρι την ηλικία της εμμηνόπαυσης. Αντίθετα μειώνεται στην περίπτωση χειρουργικής εμμηνόπαυσης πριν την ηλικία των 35 έως 45 ετών. Η πρώτη κύηση σε ηλικία μικρότερη των 20 ετών προστατεύει έναντι της πρώτης κυήσεως σε ηλικία μεγαλύτερη των 30 ετών. Η ατοκία και η ηλικία πρώτης κύησης άνω των 35 ετών αυξάνουν τον κίνδυνο. Κάθε μετέπειτα κύηση, όπως και ο θηλασμός, μειώνουν τον κίνδυνο κατά 7% και 4,3% αντίστοιχα.

Εξωγενείς ορμόνες: Η χρήση αντισυλληπτικών δισκίων, όπως και η χορήγηση ορμονών μετά την εμμηνόπαυση αυξάνει τον κίνδυνο. Αντίθετα η χρήση αντιοιστρογόνων, πχ ταμοξιφαίνης, μειώνει τον κίνδυνο

Αλκοόλ και πρόσληψη φυλλικού οξέος: η κατανάλωση αλκοόλ συνδέεται θετικά με τον κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Η πρόσληψη φυλλικού μειώνει τον κίνδυνο σε γυναίκες που καταναλώνουν αλκοόλ, ενώ η μειωμένη πρόσληψη φυλλικού σχετίζεται επίσης με αυξημένο κίνδυνο.

Δίαιτα: Η διατροφή περιέχει πολλές ουσίες που μπορεί να προδιαθέσουν σε κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου, όπως και ουσίες που προστατεύουν. Η πρόσληψη κρέατος και ακόρεστων λιπαρών οξέων σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο, ενώ τα πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα και τα ω-3 λιπαρά οξέα φαίνεται να προστατεύουν, όπως επίσης τα φρούτα και τα λαχανικά.

Παχυσαρκία και φυσική δραστηριότητα : η παχυσαρκία αυξάνει τον κίνδυνο σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, ενώ σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο στις προεμμηνοπαυσιακές. Η άσκηση και η σωματική δραστηριότητα στην εφηβεία και στη νεαρή ηλικία σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο.

Οικογενειακό ιστορικό: η ύπαρξη συγγενών πρώτου βαθμού με καρκίνο του μαστού αυξάνει τον κίνδυνο κατά 2-3 φορές.

Το **επίπεδο μόρφωσης** σχετίζεται με τη νόσο. Γυναίκες χαμηλότερης μόρφωσης έχουν 1,36 φορές αυξημένο κίνδυνο σε σχέση με γυναίκες με ανώτερη μόρφωση.



Άλλοι παράγοντες κινδύνου: η μαστογραφική πυκνότητα των μαστών, η ύπαρξη ορισμένων καλοηθών παθήσεων του μαστού και η έκθεση του μαστού σε αυξημένες δόσεις ιονίζουσας ακτινοβολίας αυξάνουν τον κίνδυνο. Η σοβαρή άτυπη επιθηλιακή υπερπλασία αυξάνει τον κίνδυνο κατά 4 με 5 φορές. Το σωματικό ύψος αυξάνει ελαφρά τον κίνδυνο. Η πυκνότητα των οστών είναι παράγοντας κινδύνου, που σχετίζεται με τα οιστρογόνα. Η προλακτίνη επίσης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο. Η ταμοξιφαίνη μειώνει τον κίνδυνο. Παρόμοια ευεργετική επίδραση φαίνεται να έχει και η ραλοξιφαίνη, ενώ διερευνάται η δράση της anastrozole. Επίσης η ασπιρίνη και η χρήση NSAID σχετίζονται με μείωση της επίπτωσης του καρκίνου του μαστού.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	ΣΧΕΤΙΚΟΣ ΚΙΝΔΥΝΟΣ
Ηλικία (>50 έναντι <50 ετών)	6,5
Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού	
• 1 ^{ου} βαθμού συγγένεια	1,4-13,6
• 2 ^{ου} βαθμού συγγένεια	1,5-1,8
Ηλικία εμμηναρχής (<12 έναντι >12 ετών)	1,2-1,5
Ηλικία εμμηνόπαυσης (>55 έναντι <55 ετών)	1,5-2,0
Ηλικία 1 ^{ης} γέννας (>30 έναντι <20 ετών)	1,3-2,2
Καλοήθειες παθήσεις μαστού	
• Βιοψία μαστού (οποιοδήποτε ιστολογικό εύρημα)	1,5-1,8
• Άτυπη υπερπλασία	4,0-4,4
Θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης	1,0-1,5

Πίνακας 1: σχέση μεταξύ παραγόντων κινδύνου και ανάπτυξης καρκίνου του μαστού (Από τους Armstrong et al., New England Journal of Medicine, 2004)



ΙΒ. ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Μεταλλάξεις στα γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας για τον καρκίνο του μαστού όπως τα BRCA1, BRCA2, p53, ATM και PTEN σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη της κληρονομικής μορφής της νόσου. Οι μεταλλάξεις αυτές ενοχοποιούνται για ένα 5-10% των περιστατικών καρκίνου του μαστού. Οι κληρονομικές μορφές ευθύνονται συνήθως για την εμφάνιση καρκίνων σε μικρότερη ηλικία και συχνά αμφοτερόπλευρες ή πολυεστιακές εντοπίσεις.

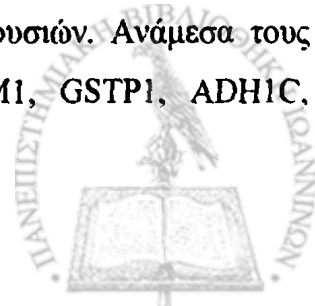
Οι μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 ευθύνονται για το 80-90% των κληρονομικών μορφών της νόσου. Οι γυναίκες με μεταλλάξεις στα BRCA1 και BRCA2 έχουν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού (80%), ποσοστό 10 φορές υψηλότερο από τον κίνδυνο του γενικού πληθυσμού. Οι μεταλλάξεις στο BRCA1 σχετίζονται με το 42% των οικογενών καρκίνων του μαστού και το 81% των οικογενών καρκίνων μαστού και ωοθηκών μαζί. Οι μεταλλάξεις στο BRCA2 σχετίζονται με το 76% των οικογενών καρκίνων μαστού.

Το p53 είναι το συχνότερα μεταλλαγμένο γονίδιο σε όλες τις μορφές καρκίνου (περίπου στο 50% των καρκίνων). Μεταλλάξεις στο p53 υπάρχουν στο σύνδρομο Li-Fraumeni, το οποίο σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου μαστού και άλλων οργάνων. Οι προσβεβλημένες γυναίκες έχουν 18 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για ανάπτυξη Ca μαστού πριν τα 45 έτη.

Μεταλλάξεις στο PTEN παρατηρούνται στο 80% των ασθενών με σύνδρομο Cowden, μια σπάνια νόσο που συνδέεται με κίνδυνο 25-50% για ανάπτυξη Ca μαστού.

Οι ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο ATM που είναι ετερόζυγοι έχουν αυξημένο κίνδυνο για Ca μαστού. Οι ασθενείς με σύνδρομο Peutz-Jeghers έχουν μετάλλαξη στο γονίδιο LKB1 και εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη Ca μαστού.

Τα γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας δρουν σε συνδυασμό με ενδογενείς και άλλους παράγοντες κινδύνου, και αυξάνουν τον κίνδυνο για εκδήλωση της νόσου. Ευθύνονται για τα περισσότερα περιστατικά σποραδικών καρκίνων του μαστού. Τέτοια γονίδια είναι αυτά που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των οιστρογόνων, των διαφόρων καρκινογόνων, στην αποτοξίκωση των ελευθέρων ριζών, στον μεταβολισμό διαφόρων ουσιών. Ανάμεσα τους περιλαμβάνονται τα γονίδια CYP1A1, CYP2D6, CYP19, GSTM1, GSTP1, ADH1C.



MTHFR, XRCC1, XRCC3, ERCC4/XPF, PR, ER, TNFa, HSP70 κ.α. (Dimitresku RG and Cotarla I, 2005).

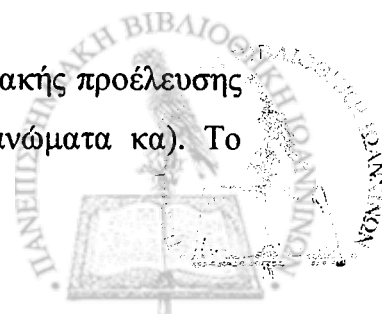
ΙΓ. ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η πρόωμη διάγνωση της νόσου είναι βασικής σημασίας για την όσο το δυνατόν πιο επιτυχή αντιμετώπιση.

Οι μέθοδοι προληπτικού ελέγχου είναι η αυτοεξέταση του μαστού, η κλινική εξέταση του μαστού από τον ιατρό, και η μαστογραφία. Η κλινική εξέταση του μαστού και η αυτοεξέταση του μαστού πρέπει να αρχίζουν από την ηλικία των 20 ετών, και συστήνεται κλινική εξέταση κάθε 3 χρόνια για γυναίκες μεταξύ 20 έως και 30 ετών, και μία φορά το χρόνο για γυναίκες ηλικίας 40 ετών και άνω. Η πλέον σημαντική εξέταση για την πρόωμη διάγνωση είναι η μαστογραφία, καθ' ότι είναι η μόνη που μπορεί να ανιχνεύσει έναν καρκίνο σε υποκλινική μορφή, προτού γίνει αντιληπτός με τη ψηλάφηση. Με την μαστογραφία είναι δυνατόν να ανιχνευθεί ένα ογκίδιο διαμέτρου 4-6 mm ή και λιγότερο, ενώ με την αυτοεξέταση μια γυναίκα μπορεί να ανιχνεύσει ένα ογκίδιο που δεν προϋπήρχε διαμέτρου 8 mm, ενώ ένας έμπειρος ιατρός ένα ογκίδιο 1 cm. Το διάστημα από τη στιγμή που ένα ογκίδιο ανιχνεύεται μαστογραφικά μέχρι να γίνει ψηλαφητικά αντιληπτό μπορεί να φτάσει μέχρι και τα δυο χρόνια. Αυτό υποδηλώνει την μεγάλη αξία της εξέτασης η οποία συστήνεται να γίνεται προληπτικά σε κάθε γυναίκα άνω των 40 ετών μια φορά τον χρόνο, ενώ στις γυναίκες με επιβαρημένο οικογενειακό ιστορικό επιβάλλεται ο έλεγχος να ξεκινάει από το 35^ο έτος της ηλικίας. Περαιτέρω επεμβατικές μέθοδοι διερεύνησης ενός ογκιδίου του μαστού είναι η ανοιχτή βιοψία ή η παρακέντηση με λεπτή βελόνη.

Ο υπέρηχος δεν δίνει ακριβή εικόνα όλου του μαστού και δεν αποτελεί προς το παρόν αξιόπιστη εξέταση. Η μαγνητική τομογραφία (MRI) αν και συνιστάται ως διαγνωστικό εργαλείο σε γυναίκες που έχουν ήδη διαγνωσθεί με καρκίνο του μαστού για ανίχνευση νέων εστιών και γενικά παρακολούθηση της θεραπείας, με τις νέες οδηγίες της ACS συνιστάται να γίνεται σε γυναίκες άνω των 30 ετών που έχουν μετάλλαξη στα γονίδια BRCA1 και BRCA2, σε όσες έχουν λάβει θεραπεία για νόσο του Hodgkin ή όσες έχουν ισχυρό οικογενειακό ιστορικό της νόσου.

Το μεγαλύτερο ποσοστό κακοήθων όγκων του μαστού είναι επιθηλιακής προέλευσης (αδενοκαρκινώματα), και σπανιότερα μη επιθηλιακής (σαρκώματα, μελανώματα κ). Το



μεγαλύτερο ποσοστό των διηθητικών καρκίνων προέρχονται από το επιθήλιο των μικρών τελικών πόρων και των αδενοκυψελών.

Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των κυττάρων τους οι όγκοι του μαστού κατατάσσονται σε 3 βαθμούς διαφοροποίησης (Grades), G1, G2 και G3. Η σταδιοποίηση γίνεται με βάση το σύστημα AJCC/TNM, όπου με T αξιολογείται το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου, με N ο αριθμός των περιοχών διηθημένων λεμφαδένων και με M οι απομακρυσμένες μεταστάσεις. Η κλινική σταδιοποίηση είναι σημαντική στον σχεδιασμό της θεραπείας, και η ιστολογική σταδιοποίηση μετά το χειρουργείο βοηθάει σε συνδυασμό με την κλινική στην πρόβλεψη της πρόγνωσης της νόσου. Η ύπαρξη επίσης του γονιδίου Her2/neu (ανιχνεύεται στον αφαιρούμενο καρκινικό ιστό και δείχνει επιθετικό καρκίνο) είναι σημαντική για το καθορισμό της θεραπείας (χορήγηση trastuzumab, lapatinib).

Από πολλούς ο καρκίνος του μαστού θεωρείται ως συστηματική και όχι τοπική νόσος τη στιγμή της διάγνωσης, λόγω του μεγάλου διαστήματος που αναπτύσσεται προκλινικά και της τάσης του να μεθίσταται, καθώς και του γεγονότος ότι παρά την τάση των καρκινικών κυττάρων του μαστού να μεταναστεύουν από τον πρωτοπαθή όγκο πιστεύεται ότι ανοσολογικοί και άλλοι παράγοντες μπορούν να εμποδίσουν τα κύτταρα αυτά να αναπτυχθούν σε απομακρυσμένες θέσεις.

Βασικοί προγνωστικοί παράγοντες θεωρούνται ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων και το μέγεθος του όγκου, ενώ άλλοι προγνωστικοί παράγοντες είναι ο ιστολογικός τύπος του όγκου, η διαφοροποίηση του όγκου, η παρουσία ορμονικών (οιστρογονικών ή/και προγεστερονικών υποδοχέων), παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, η παρουσία συγκεκριμένων ογκογονιδίων ή αντιγόνων κ.ά.

Η αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού μπορεί να είναι θεραπευτική ή παρηγορική ανάλογα με το στάδιο της νόσου, και τοπική ή συστηματική. Η τοπική θεραπεία περιλαμβάνει την χειρουργική εξαίρεση και την ακτινοθεραπεία, ενώ η συστηματική την χημειοθεραπεία και την ορμονοθεραπεία.

Ως χειρουργικές μέθοδοι θεραπείας του μαστού έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς η ριζική μαστεκτομή, η εκτεταμένη ριζική μαστεκτομή (έχουν σχεδόν εγκαταλειφθεί), η τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή, η απλή, η υποδόρια μαστεκτομή και η μερική μαστεκτομή (εκτομή του όγκου, τμηματεκτομή ή τεταρτεκτομή του μαστού) σε συνδυασμό με λεμφαδενικό καθαρισμό. Οι χειρουργικές μέθοδοι μπορούν να συνδυαστούν με ακτινοβολία.



Στο σκέλος της ορμονοθεραπείας το αντιοιστρογόνο ταμοξифαίνη αποτελεί πολύτιμη θεραπεία για τους όγκους που είναι θετικοί για οιστρογονικούς υποδοχείς (+ER), ενώ θετικά ανταποκρίνεται και ένα ποσοστό ασθενών με (-)ER. Να σημειωθεί ότι γενικά γυναίκες που εμφανίζουν τη νόσο στην εμμηνόπαυση είναι (+)ER ενώ προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες είναι (-)ER. Η ραλοξифαίνη και οι αναστολείς της αρωματάσης (anastrozole, exemestane, letrozole) αποτελούν επίσης ορμονικές θεραπείες της νόσου.

Η συμπληρωματική συστηματική χημειοθεραπεία αποτελείται από σχήματα με συνδυασμούς φαρμάκων, π.χ. κυκλοφωσφαμίδη με μεθοτρεξάτη και 5-φθοριουρακίλη (CMF), δοξορουβικίνη και κυκλοφωσφαμίδη (AC), κυκλοφωσφαμίδη με δοξορουβικίνη και 5-φθοριουρακίλη (CAF), κυκλοφωσφαμίδη με επιρουβικίνη και 5-φθοριουρακίλη (CEF). Τέλος, η στοχευμένη (targeted) θεραπεία κατευθύνεται κατά αυξητικών πρωτεϊνών όπως Her2/neu, που αναφέρθηκε παραπάνω. (Lippman M H, 2005, Eric J. Bieber, Joseph Sanfilippo, Ira Horowitz, Clinical Gynecology, Churchill-Livingstone 2006, σελ 597-630, Γ. Κρεατσάς, Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική, εκδόσεις Πασχαλίδη 1998, σελ 412-434, DeCherney, Current obstetric and gynecologic diagnosis ant treatment, Mc Graw Hill, 9th edition, σελ 1100-1115, Ely S. and Vioral N.A., 2007, Heck K et al., 1993).



II. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

IIA. ΓΕΝΙΚΑ

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου στους άνδρες (μετά το καρκίνο του πνεύμονα), και την τρίτη αιτία θανάτου στις ΗΠΑ πλησίον του καρκίνου του παχέος εντέρου, ενώ από την ηλικία των 70 και άνω γίνεται η πρώτη σε συχνότητα εμφάνισης κακοήθεια. Σε μία ισπανική μελέτη, σε νεκρωσίες το 33% των άνω των 80 ετών ανδρών είχε καρκίνο του προστάτη. Στις ΗΠΑ το ποσοστό αυτό είναι υψηλότερο. Η συχνότητα του καρκίνου του προστάτη ανεβαίνει σταθερά τα τελευταία χρόνια, και αυτό οφείλεται εν μέρει στους πιο αποτελεσματικούς διαγνωστικούς ελέγχους που διενεργούνται με την χρήση της μέτρησης του PSA και την διορθική υπερηχογραφία.

Η εκτιμώμενη ετήσια επίπτωση στις ΗΠΑ είναι περίπου 185,4 ανά 100.000 άτομα, στις χώρες της Νότιας και Κεντρικής Αμερικής 27-42 ανά 100.000 άτομα, στη Δυτική Ευρώπη 100 ανά 100.000 άτομα, στην Ανατολική Ευρώπη 15-36 ανά 100.000 άτομα, ενώ στην Ασία αρκετά λιγότερο, και ποικίλει ανάλογα με το πόσο δυτικοποιημένες είναι οι κοινωνίες. Στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι η νόσος προσβάλλει 10 στους 100.000 άντρες και η θνητότητα ανέρχεται σε 8,7 ανά 100.000.

Η 5ετής επιβίωση σήμερα είναι σχετικά υψηλή (στην Αγγλία κυμαίνεται στο 65%). Ο καρκίνος του προστάτη μπορεί να διακριθεί επιδημιολογικά σε κληρονομική και σποραδική μορφή. Είναι δύσκολο όμως να αναγνωρισθούν οι δύο αυτές μορφές σε μοριακό επίπεδο.

Η αιτιολογία του καρκίνου του προστάτη παραμένει αδιευκρίνιστη, παρά την υψηλή νοσηρότητα. Οι μόνοι βεβαιωμένοι αιτιολογικοί παράγοντες είναι η μεγάλη ηλικία, η φυλή και το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του προστάτη Άλλοι παράγοντες που έχουν ενοχοποιηθεί είναι: ορμονικοί, παχυσαρκία, διαίτα, επάγγελμα, κάπνισμα, έλλειψη φυσικής δραστηριότητας, κ. ά., όμως τα επιδημιολογικά στοιχεία δεν είναι επαρκή (Hsing, A. W. and, Chokkalingam A. P, 2006, Hughes C. et al. 2005, Oxford textbook of Oncology 2nd edition, Oxford Press 2002, σελ 1498-1523, DeVita, Cancer: principles and practice of oncology, 6th edition, Lippincott Williams & Wilkins 2001).



ΠΒ. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Ηλικία : η επίπτωση σχετίζεται με την ηλικία. Σε άνδρες ηλικίας 50 ετών είναι περίπου 10%, και στην ηλικία >65 ετών είναι περίπου 70%, ή 17 φορές περισσότερο από ότι σε ηλικία < 65 ετών.

Οικογενειακό ιστορικό: η ύπαρξη συγγενών πρώτου βαθμού με καρκίνο του προστάτη αυξάνει τον κίνδυνο πάνω από 2 φορές.

Επάγγελμα: παίζει πιθανώς ρόλο, όπως για παράδειγμα σε αγρότες, όπου ο κίνδυνος καρκίνου προστάτη είναι αυξημένος κατά 7-12%. Επίσης εργαζόμενοι σε βαριές βιομηχανίες λόγω έκθεσης σε χημικές ουσίες έχουν πιθανώς αυξημένο κίνδυνο.

Η κοινωνικοοικονομική κατάσταση παίζει ρόλο στην εξέλιξη της νόσου υπό την έννοια της μη συχνής κλινικής και εργαστηριακής εξέτασης, της πιθανώς μειωμένης φροντίδας και της μη εύκολης πρόσβασης σε σύγχρονες διαγνωστικές και θεραπευτικές μεθόδους.

Δίαιτα: Η διατροφή περιέχει πολλές ουσίες που μπορεί να προδιαθέσουν σε κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου, όπως και ουσίες που προστατεύουν. Η πρόσληψη κόκκινου κρέατος και ακόρεστων λιπαρών οξέων σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο, ενώ τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και τα ω-3 λιπαρά οξέα φαίνεται να προστατεύουν. Η πρόσληψη λίπους αυξάνει τη παραγωγή ανδρογόνων και οιστρογόνων. Σε μία μεγάλη μελέτη (μέσω ερωτηματολογίου, μελέτη δείκτου-ελέγχου (case-control)) στην Ιταλία ευρέθη ότι το άμυλο σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη.

Η τομάτα (σάλτσα τομάτας μαγειρευμένη) προστατεύει από τον καρκίνο του προστάτη. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα σταυρανθή (μπρόκολο, κουνουπίδι) προστατεύουν, καθώς και το σκόρδο και το κρεμμύδι. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αν και αναφέρεται ότι σχετίζονται με τη νόσο, λόγω του περιεχόμενου ασβεστίου, σε πρόσφατη μελέτη εδείχθη ότι η πολύ μεγάλη πρόληψη ασβεστίου (>2.000mg/ημέρα) σχετίζεται πιθανώς με τη νόσο. Το σελήνιο φαίνεται ότι προστατεύει από τη νόσο σταματώντας το κυτταρικό κύκλο και προάγοντας την απόπτωση. Επίσης η συχνή κατανάλωση ψαριών προστατεύει.

Παχυσαρκία: Πολλές μελέτες σχετικά με τη παχυσαρκία και τον αυξημένο κίνδυνο καρκίνου προστάτη είναι αντικρουόμενες. Είναι πιθανό ότι η παχυσαρκία αντανάκλα το δυτικοποιημένο τρόπο ζωής.

Οινόπνευμα: Δεν φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο.



Η φυσική άσκηση δεν φαίνεται να προστατεύει από αυξημένο κίνδυνο.

Σωματικό ύψος : Υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες σχετικά με το ύψος και τον αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του προστάτη. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι υπάρχει μικρή αλλά στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ ύψους και αυξημένου κινδύνου καρκίνου του προστάτη.

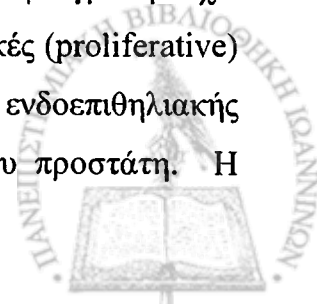
Γεωγραφική εντόπιση: Η επίπτωση καρκίνου του προστάτη και η εξ' αυτού θνητότητα κυμαίνονται σε διάφορες περιοχές του κόσμου, με τη μεγαλύτερη επίπτωση στις ΗΠΑ και Δυτική Ευρώπη και τη χαμηλότερη σε Ασία, λόγω γενετικών παραγόντων αλλά και διαφοράς στον τρόπο ζωής, διατροφής, και διαφορών στους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Μετανάστες από χώρες χαμηλού κινδύνου σε χώρες υψηλού κινδύνου εμφανίζουν αύξηση της συχνότητας.

Ορμόνες: Η τεστοστερόνη είναι το κύριο ανδρογόνο στη κυκλοφορία ενώ η διϋδροτεστοστερόνη (DHT) είναι το ισχυρότερο ανδρογόνο και ευρίσκεται κυρίως στο κύτταρο. Στον άνδρα η DHT παράγεται κυρίως στους όρχεις και δευτερευόντως στο προστάτη από την εισερχόμενη κυκλοφορούσα τεστοστερόνη (μέσω του ενζύμου 5α-αναγωγάση των στεροειδών, steroid 5 alpha-reductase). Η συγκέντρωση της DHT στο προστάτη είναι αρκετές φορές υψηλότερη από ότι στη κυκλοφορία και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του προστάτη και στην ογκογένεση. Η δράση της ασκείται μετά τη σύνδεση της με υποδοχείς ανδρογόνων (AR), σχηματίζοντας ενδοκυττάριο σύμπλεγμα το οποίο συνδέεται με το στοιχείο απάντησης στα ανδρογόνα, στο DNA των κυττάρων του προστάτη επάγοντας το πολλαπλασιασμό. Αν υπάρχει έλλειψη ανδρογόνων, συνδέονται και μη ανδρογόνα όπως βιταμίνη D, οιστραδιόλη και οι αυξητικοί παράγοντες (insulin-like growth factors, IGFs) πυροδοτώντας ανδρογόνο δράση.

Επιδημιολογικές μελέτες δεν δείχνουν συσχέτιση ανδρογόνων του πλάσματος και καρκίνου του προστάτη. Αν και εργαστηριακές έρευνες δείχνουν ότι η βιταμίνη D προστατεύει από τη νόσο, εντούτοις δεν υπάρχουν αξιόπιστα επιδημιολογικά στοιχεία.

Ο αυξητικός παράγων insulin-like growth factor IGF-I έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του προστάτη

Χρόνια φλεγμονή του προστάτη: Μελέτες έχουν δείξει ότι πρώιμα στάδια καρκίνου του προστάτη μπορεί να αναπτυχθούν επί βλαβών που οφείλονται σε χρόνια φλεγμονή. Έχει δειχθεί ότι σχεδόν όλες οι εστιακές ατροφικές βλάβες είναι πολλαπλασιαστικές (proliferative) και τέτοια φλεγμονώδης ατροφία ευρίσκεται πλησίον υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του προστάτη (PIN), που είναι πρόδρομος του καρκίνου του προστάτη. Η



φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε ογκογένεση διεγείροντας την αγγειογένεση, αυξάνοντας το πολλαπλασιασμό των κυττάρων, και δρώντας βλαπτικά στο DNA μέσω ROS. Φαίνεται λοιπόν ότι η χρόνια φλεγμονή του προστάτη αυξάνει το κίνδυνο. Να σημειωθεί ότι η χρήση NSAID και ιδιαίτερα ασπιρίνης μειώνει το κίνδυνο.

Σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα: Αυξάνεται ο κίνδυνος καρκίνου του προστάτη και πιθανώς αυτό σχετίζεται συνδέεται με τη χρόνια φλεγμονή που αναφέρθηκε παραπάνω.

Καλοήθης υπερπλασία του προστάτη: Επειδή σε μεγάλη ηλικία μπορεί να συνυπάρχει με τον καρκίνο του προστάτη είναι δύσκολο να εκτιμηθεί η μεταξύ τους σχέση, αν και σε μία μεγάλη μελέτη έχει βρεθεί οριακή συσχέτιση.

Άλλοι παράγοντες όπως κάπνισμα, διαβήτης, κίρρωση ήπατος δεν φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο.

(Bidoli E et al., 2005, Nelson W. G, 2004, Chokkalingam A. P et al., 2007, Villeneuve PJ et al., 1999, June M. et al., 2005, Zhihong Gong et al., 2006, Platz E A et al., 2004, Zeegers M et al., 2005, Sequoia J. S.P et al., 2006)

ΠΓ. ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

Μεταλλάξεις στα γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας για τον καρκίνο του προστάτη σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη κληρονομικής μορφής της νόσου. Οι μεταλλάξεις αυτές ενοχοποιούνται για το 10% των περιστατικών καρκίνου του προστάτη. Παρά ταύτα δεν υπάρχουν ισχυρά αποτελέσματα για τα γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας, αλλά φαίνεται ότι η δράση τους εξαρτάται από την αλληλεπίδραση με γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας και περιβαλλοντικούς παράγοντες.

ΠΓ1. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

Γονίδια που έχουν ευρεθεί σε κάποιες οικογένειες και πιθανόν εμπλέκονται στη κληρονομική μορφή του καρκίνου του προστάτη είναι τα ELAC2, RNASEL, MSR1, NSB1, και CHEK2. Το γονίδιο RNASEL κωδικοποιεί μία ριβονουκλεάση η οποία αποδομεί ιϊκό και κυτταρικό DNA. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό σχετίζονται με κληρονομική και σποραδική μορφή της νόσου, αν και υπάρχουν αντίθετες μελέτες. Το γονίδιο ELAC2 δεν φαίνεται να

έχει σημαντικό ρόλο. Το MSR1 κωδικοποιεί ένα υποδοχέα-εκκαθαριστή των μακροφάγων. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό δεν φαίνεται να παίζουν ρόλο στη κληρονομική μορφή της νόσου. Το NBSI συνδέεται με μικρό κίνδυνο. Το CHEK2 είναι ένας προς τα άνω ρυθμιστής του p53 στο μονοπάτι μεταβίβασης σήματος βλάβης του DNA. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό σχετίζονται με κληρονομική και σποραδική μορφή της νόσου, και συνδέεται με μικρό κίνδυνο.

Επιδημιολογικές έρευνες δείχνουν συσχέτιση της νόσου με την ινσουλίνη και τη λεπτίνη. Ο ρόλος τους όμως στο καρκίνο του προστάτη δεν έχει διευκρινισθεί ακόμη. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της ινσουλίνης συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο. (Hughes C. et al. 2005, Chokkalingam A. P et al. 2007)

ΠΓ2. ΣΠΟΡΑΔΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

Οι περισσότεροι καρκίνοι του προστάτη είναι σποραδικής μορφής. Γενετικοί πολυμορφισμοί πιθανώς ενέχουν μικρό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη.

Το γονίδιο TLR4 παίζει ρόλο στην ανοσολογική απάντηση σε λοίμωξη από Gram-μικρόβια. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι πολυμορφισμός στο p27 και p21 συνδέεται με προχωρημένο καρκίνο του προστάτη. Το γονίδιο PTEN (phosphatase and tensin homologue) είναι ένα σημαντικό κατασταλατικό του όγκου γονίδιο και επηρεάζει τη συγκέντρωση του CDKN1B (p27). Στο καρκίνο του προστάτη η συγκέντρωση του PTEN είναι μειωμένη ιδιαίτερα σε καρκίνο υψηλής κακοήθειας ή σταδίου. Το γονίδιο CDKN1B (p27) είναι ένα σημαντικό κατασταλατικό γονίδιο του καρκίνου του προστάτη. Μειωμένη συγκέντρωση του p27 (αναστολέας των εξαρτωμένων από τις κυκλίνες κινασών που κωδικοποιείται από το γονίδιο CDKN1B), είναι συνήθης στο καρκίνο του προστάτη, ιδιαίτερα σε αυτόν με πτωχή πρόγνωση. Το γονίδιο NKX3.1 είναι πολύ σημαντικό γονίδιο του καρκίνου του προστάτη και η έλλειψή του σχετίζεται με την αύξηση του PSA κατά την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη.

Το γονίδιο της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (glutathione S-transferase) GSTP1 είναι από τα σημαντικότερα κατασταλατικά γονίδια στο καρκίνο του προστάτη. Το GSTP1 μπορεί να αδρανοποιηθεί με υπερμεθυλίωση στο καρκίνο του προστάτη. Η υπερμεθυλίωση του γονιδίου GSTP1 είναι η πλέον αναφερθείσα (> 90%) επιγενετική αλλοίωση στο καρκίνο του προστάτη. Συμβαίνει στα αρχικά στάδια και πιθανόν θα

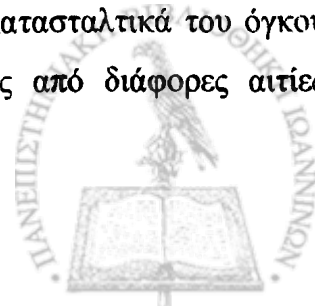


αποτελέσει αξιόπιστο δείκτη καρκίνου περιορισμένου σε κάποιο όργανο, ακόμη και σε μικρό δείγμα βιοψίας.

Τα ογκογονίδια c-myc and bcl-2 ανευρίσκονται αυξημένα σε διάφορους καρκίνους. Ο αριθμός των γενετικών τόπων (loci) που περιλαμβάνονται στη καρκινογένεση του προστάτη είναι πολύ μεγάλος και ο μηχανισμός όχι καλά κατανοητός. Ο STAT5, ένας μεταβιβαστής του σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής, είναι ένας κρίσιμος παράγων επιβίωσης για τα καρκινικά κύτταρα. Ενεργοποίηση του STAT5 συνδέεται με υψηλό βαθμό κακοήθειας ιστολογικά, στο καρκίνο του προστάτη (Hughes C. et al. 2005, Chokkalingam A. P et al. 2007).

ΠΓ3. Ο ΡΟΛΟΣ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

ΑΝΔΡΟΓΟΝΑ: Επειδή ο καρκίνος του προστάτη είναι ανδρογονοεξαρτώμενος είναι πιθανό ότι γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθεση και μεταβολισμό των ανδρογόνων συμμετέχουν στο καρκίνο του προστάτη. Το γονίδιο που έχει μελετηθεί περισσότερο είναι αυτό που κωδικοποιεί τον υποδοχέα των ανδρογόνων. Άλλες μελέτες δείχνουν συσχέτιση και άλλες όχι. Παρόλο ότι δύο άλλοι πολυμορφισμοί του AR, και συγκεκριμένα η μετάλλαξη R726L έχει βρεθεί σε Φιλανδούς με καρκίνο του προστάτη, και η μετάλλαξη StuI έχει βρεθεί σε Άφρο-αμερικανούς και Βραζιλιάνους αλλά όχι σε Αυστραλούς, είναι απίθανο να είναι αιτία καρκίνου του προστάτη. Το κυτόχρωμα P450c17 (ένζυμο για τη βιοσύνθεση τεστοστερόνης) δεν φαίνεται να έχει σχέση, τουλάχιστον σημαντική, στην ανάπτυξη της νόσου. Η δραστηριότητα του ενζύμου 5-α-αναγωγή των στεροειδών και ο πολυμορφισμός του γονιδίου SRD5A2 που την παράγει ενδέχεται να συμμετέχουν στις παρατηρούμενες μεγάλες εθνοφυλετικές διαφορές όσον αφορά την επίπτωση της νόσου. Γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα καταβολισμού της DHT όπως τα HSD3B και HSD17B πιθανόν να παίζουν ρόλο στη νόσο, αλλά απαιτούνται περισσότερες μελέτες. Μεταλλάξεις στο γονίδιο για το ένζυμο CYP3A το οποίο μεταβολίζει τη τεστοστερόνη σε λιγότερο δραστικές μορφές δεν φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο. Μεταλλάξεις στο γονίδιο για το ένζυμο CYP3A5 το οποίο συνεισφέρει στο μεταβολισμό της τεστοστερόνης πιθανό συνεισφέρουν σε μειωμένο κίνδυνο καρκίνου προστάτη, όπως έχει παρατηρηθεί σε Ιάπωνες. Κατασταλτικά του όγκου γονίδια ενέχονται στη νόσο όταν διαταραχθεί η λειτουργία τους από διάφορες αιτίες (μετάλλαξη, απάλειψη, κ.ά.).

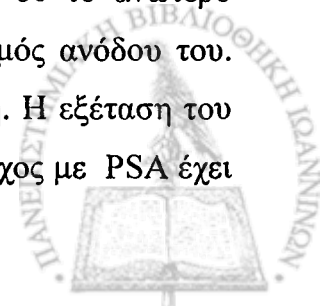


ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ: Ο προστάτης προσλαμβάνει οιστρογόνα από περιφερικές πηγές και από μετατροπή της τεστοστερόνης. Τα οιστρογόνα αλληλεπιδρούν με τα ανδρογόνα και τη SHBG για τη ρύθμιση της φυσιολογικής ανάπτυξης και λειτουργίας του προστάτη. Ο ρόλος των οιστρογόνων στο καρκίνο του προστάτη δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος. Είναι πιθανό ότι φυσιολογικά εκκρινόμενες ποσότητες έχουν προστατευτική δράση μέσω του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων, ενώ φαρμακολογικές δόσεις μόνες ή σε συνεργασία με ανδρογόνα προάγουν την ογκογένεση. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η SHBG έχει ευεργετικό αποτέλεσμα στο καρκίνο το οποίο είναι ανεξάρτητο από τη δράση που αναφέρθηκε παραπάνω.

ΠΔ. ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η πρώιμη διάγνωση της νόσου είναι βασικής σημασίας. Πρώιμα συμπτώματα από το κατώτερο ουροποιητικό είναι συνήθως η κατακράτηση ούρων, η συχνουρία, η καθυστέρηση στην ούρηση και η νυκτουρία. Τα συμπτώματα αυτά μπορεί να αποτελούν ένδειξη υπερτροφίας του προστάτη, αλλά επειδή αφορούν το ουροποιητικό δεν βάζουν σε υποψία τον ασθενή. Έχει βρεθεί σχέση μεταξύ ανικανότητας και καρκίνου του προστάτη. Αν και αυτή παρουσιάζεται στα τελικά στάδια της νόσου εν τούτοις μπορεί να συμβεί πολύ πριν τη διάγνωση. Οποιαδήποτε και αν είναι η αιτία της ανικανότητας θα πρέπει να διερευνάται η πιθανότητα καρκίνου του προστάτη. Η αιματουρία επίσης μπορεί να οφείλεται σε καρκίνο του προστάτη. Η ανωμαλίες του προστάτη στη δακτυλική εξέταση του ορθού αποτελεί επίσης ισχυρό παράγοντα υποψίας της νόσου, παρά το ότι μπορεί να οφείλεται σε καλοήγη υπερπλασία του προστάτη.

Οι μέθοδοι προληπτικού ελέγχου είναι η προσέλευση του ασθενούς στο γιατρό εάν υπάρχουν τα παραπάνω συμπτώματα και η μέτρηση του PSA κάθε χρόνο μετά την ηλικία των 50. Εάν υπάρχει οικογενειακό ιστορικό η μέτρηση του PSA πρέπει να αρχίζει από την ηλικία των 40 ετών. Οι φυσιολογικές τιμές του PSA είναι 0 - 4 ng/mL. Για τιμές > 4, η ευαισθησία του τεστ για καρκίνο του προστάτη είναι 57-79% και η ειδικότητα 59-68%, και η θετική πρόβλεψη ανέρχεται σε 40-49%. Για άνδρες ηλικίας κάτω των 60 το ανώτερο φυσιολογικό όριο του PSA είναι 2,6 ng/mL. Σημασία έχει επίσης ο ρυθμός ανόδου του. Ρυθμός ανόδου >0.75 ng/mL ετησίως δείχνει πιθανό καρκίνο του προστάτη. Η εξέταση του PSA είναι πολύ σημαντική για τη πρόληψη και τη διάγνωση. Ο ετήσιος έλεγχος με PSA έχει



ως αποτέλεσμα να ανιχνεύεται η νόσος όταν είναι ακόμη εντοπισμένη στο προστάτη σε ποσοστό >95%. Επειδή το PSA ανευρίσκεται υψηλό και σε άλλες παθήσεις (π.χ. φλεγμονές, καλοήθης υπερπλασία του προστάτη), θα πρέπει να συνδυάζεται με δακτυλική εξέταση του ορθού. Αυτό αποτελεί το καλύτερο συνδυασμό στη πρώιμη διάγνωση. Σε περίπτωση υποψίας καρκίνου του προστάτη, το διορθικό υπερηχογράφημα του προστάτη και η βιοψία δια λεπτής βελόνης (transrectal ultrasound (TRUS)-guided biopsies) βοηθούν στη διάγνωση. Να σημειωθεί ότι επειδή με τη τεχνική αυτή λαμβάνεται τυχαίο δείγμα μπορεί να μη έχουμε διαπίστωση της βλάβης, οπότε ανάλογα με τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα αποφασίζεται η περαιτέρω αντιμετώπιση.

Ποσοστό μεγαλύτερο του 95% των κακοήθων όγκων του προστάτη είναι αδενοκαρκινώματα, και το υπόλοιπο άλλα νεοπλάσματα όπως αδενοκυστικό, μεταβατικό κ.ά. Το μεγαλύτερο ποσοστό προέρχεται από τη περιφερική ζώνη, 15-20% από τη κεντρική ζώνη, και 10-15% από τη μεταβατική ζώνη. Σε ποσοστό 85% περίπου ο καρκίνος του προστάτη είναι πολυεστιακός. Η εξάπλωση του γίνεται κατά συνέχεια ιστού, μέσω της λεμφική και της αιματικής οδού. Οι μεταστατικές εστίες εντοπίζονται στα οστά της λεκάνης, στη σπονδυλική στήλη, στο κρανίο, στους πνεύμονες και σπανιότερα σε άλλα όργανα.

Σημαντικό προγνωστικό σημείο αποτελεί ο βαθμός διαφοροποίησης του καρκίνου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το σύστημα Gleason το οποίο βασίζεται στην αρχιτεκτονική του όγκου και όχι στα κυτταρολογικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Υπάρχουν 5 βαθμοί διαφοροποίησης, όπου ο βαθμός 5 αναφέρεται στο μεγαλύτερο βαθμό κακοήθειας και σε πτωχή πρόγνωση. Με το σύστημα αυτό ορίζονται στο κάθε δείγμα ιστού δύο βαθμοί διαφοροποίησης (ο μεγαλύτερος και ο μικρότερος). Επειδή υπάρχουν 2 βαθμοί (score), άθροισμα 2-4 δείχνει χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα και μικρό όγκο, 5-7 δείχνει ενδιάμεση κακοήθεια, και σκορ 8-10 δείχνει υψηλού βαθμού κακοήθεια. Η σταδιοποίηση γίνεται με το σύστημα TNM.



Στάδια TNM	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	
T1a	Μη ψηλαφητός όγκος με 5% του αφαιρεθέντος ιστού με καρκίνο	A1
T1b	Μη ψηλαφητός όγκος με >5% του αφαιρεθέντος ιστού με καρκίνο	A2
T1c	Μη ψηλαφητός όγκος που ανιχνεύθηκε λόγω αυξημένου PSA	
T2a	Ψηλαφητός όγκος με \leq του ημίσεως λοβού με καρκίνο	B1N
T2b	Ψηλαφητός όγκος με > του ημίσεως λοβού με καρκίνο	B1
T2c	Ψηλαφητός όγκος με τους δύο λοβούς με καρκίνο	B2
T3a	Ψηλαφητός όγκος με επέκταση του ενός λοβού εκτός «κάψας»	C1
T3b	Ψηλαφητός όγκος με επέκταση και των δύο λοβών εκτός «κάψας»	
T3c	Όγκος που έχει διηθήσει τις σπερματικές οδούς	C2
M1	Απομακρυσμένες μεταστάσεις	D

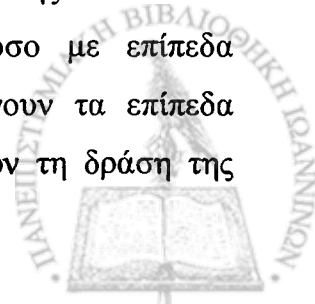
Πίνακας 2: σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη κατά TNM

(Τροποποιημένο από *Harrison's Principles of Internal Medicine 16th edition, 2005, The McGraw-Hill Companies, Inc.*)

Η αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη διαφέρει ανάλογα με το αν η νόσος βρίσκεται σε αρχικό ή προχωρημένο στάδιο.

Εντοπισμένος καρκίνος του προστάτη: Το είδος της θεραπείας του εντοπισμένου καρκίνου του προστάτη είναι δύσκολο να αποφασισθεί και αυτό φαίνεται και από τις διαφορετικές εκτιμήσεις ουρολόγων σε διάφορα μέρη του κόσμου, αλλά και στην ίδια χώρα. Στο αρχικό στάδιο εφαρμόζονται η ριζική προστατεκτομή, η ακτινοθεραπεία και αναμονή μέχρι την εμφάνιση συμπτωμάτων (watchful waiting). Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αρκετά πειστικά δεδομένα υπέρ μίας από τις παραπάνω μεθόδους αντιμετώπισης του ασθενούς. Στο πολύ αρχικό στάδιο η αναμονή φαίνεται να προτιμάται από πολλούς ειδικούς. Επιπλέον σε ασθενείς μεγάλης ηλικίας ή πάσχοντες από νοσήματα όπου το προσδόκιμο επιβίωσης είναι μικρότερο από 10 χρόνια, η θεραπεία του αρχικού σταδίου του καρκίνου του προστάτη ενδέχεται να μη προσφέρει, αλλά και να επιβαρύνει τον ασθενή. Η ριζική προστατεκτομή εφαρμόζεται σε ασθενείς με προσδόκιμο επιβίωσης >10 έτη, όπως και η ακτινοθεραπεία. Η ενδοϊστική ακτινοθεραπεία (βραχυθεραπεία) και η κρυοθεραπεία αποτελούν εναλλακτικές μορφές θεραπείας σε μικρό ποσοστό ασθενών.

Προχωρημένος καρκίνος του προστάτη: Η ορμονοθεραπεία αποτελεί ανακουφιστική θεραπεία σε προχωρημένο και μεταστατικό καρκίνο του προστάτη. Σε ασθενείς με απομακρυσμένες μεταστάσεις (στάδιο M1) το προσδόκιμο επιβίωσης είναι 10-20 μήνες και η ριζική προστατεκτομή δεν ωφελεί. Σε μεταστατική νόσο με επίπεδα τεστοστερόνης φυσιολογικά και άνω, χορηγούνται φάρμακα που μειώνουν τα επίπεδα τεστοστερόνης (π.χ. οιστρογόνα, γκοσερελίνη) ή φάρμακα που εμποδίζουν τη δράση της



όπως τα αντιανδρογόνα φλουταμίδη, βικαλουταμίδη. Αν δεν υπάρξει ανταπόκριση τότε ενδέχεται να επαναληφθεί ή να δοκιμασθεί χημειοθεραπεία, η οποία γενικά δεν είναι αποτελεσματική. Η αντοχή στην ορμονοθεραπεία συνδέεται με μειωμένη επιβίωση των ασθενών (6-12 μήνες).

Όσον αφορά τη χημειοπροφύλαξη στο καρκίνο του προστάτη μέχρις στιγμής σχετικές αποδείξεις υπάρχουν μόνο για τη φιναστερίδη. Οι μελέτες για άλλους παράγοντες δεν είναι επαρκείς και απαιτείται περαιτέρω έρευνα και μεγάλης κλίμακας μελέτες για να αποσαφηνισθεί ο ρόλος τους στον καρκίνο.

Ορμονικοί παράγοντες όπως αναστολέας της 5-α-αναγωγάσης και εκλεκτικοί τροποποιητές υποδοχέων οιστρογόνων (SERMs) όπως τορεμιφαίνη μελετώνται και θα ανακοινωθούν σύντομα. Το σελήνιο (200μg/ημέρα) σε μία μελέτη μείωσε την επίπτωση του καρκίνου του προστάτη σε 4,5 και 7 χρόνια παρακολούθησης, και η συσχέτιση ήταν σημαντική σε άνδρες με χαμηλό σελήνιο ή σε άνω των 65 ετών ή σε εκείνους με PSA < 4ng/ml. Η υψηλή κατανάλωση τομάτας (σε μαγειρευμένη μορφή) φαίνεται ότι μειώνει, έστω και σε μικρό βαθμό, την επίπτωση του καρκίνου του προστάτη και ίσως αυτό οφείλεται και στο περιεχόμενο λυκοπένιο. Μία μεγάλης κλίμακας μελέτης με σελήνιο και βιταμίνη E στη πρόληψη του καρκίνου του προστάτη θα ολοκληρωθεί το 2013. Η χρήση της ασπιρίνης και των NSAID φαίνεται σε μελέτες να έχει μία μέτρια επίδραση. Οι στατίνες επίσης έχουν αναφερθεί ως προληπτικοί παράγοντες αλλά απαιτούνται εκτεταμένες μελέτες για οριστικά συμπεράσματα (Hamilton W et al., 2006, Howard I. Scher in *Harrison's Principles of Internal Medicine* 16th edition 2005, Mischel G Neil and Neil E Fleshner 2006).



III. ΠΡΟΛΑΚΤΙΝΗ

III.A. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΠΡΟΛΑΚΤΙΝΗΣ ΚΑΙ Η ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΤΗΣ

Η PRL μαζί με την GH και το PL ανήκουν στη ίδια οικογένεια ορμονών, και τα γονίδια τους εκτιμάται ότι προήλθαν από ένα κοινό προγονικό γονίδιο, με γονιδιακό διπλασιασμό, πριν από τουλάχιστον 400.000.000 χρόνια (Ben-Jonathan N et al. 1996, Bole-Feysot C et al. 1998, Freeman ME et al. 2000). Στον άνθρωπο το γονίδιο της PRL εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 και έχει μέγεθος 15 kb. Αποτελείται από 6 εξόνια (1a, 1b, 2, 3, 4 και 5). Το εξόνιο 1a βρίσκεται 5,8 kb ανοδικά από το σημείο από το οποίο αρχίζει η μεταγραφή στην υπόφυση. Η σύνθεση της PRL ρυθμίζεται με διαφορετικό τρόπο στην υπόφυση από ότι στους άλλους ιστούς. Συγκεκριμένα, στην υπόφυση ελέγχεται από έναν εγγύτατο υποκινητή (proximal promoter), ενώ εκτός υπόφυσης ελέγχεται από έναν υπεραπομακρυσμένο υποκινητή (super-distal promoter). Ο εγγύτατος υποκινητής της υπόφυσης αποτελείται από 2 τμήματα: μια κεντρικότερη περιοχή και έναν πιο απομακρυσμένο ενισχυτή. Στον υποκινητή της υπόφυσης είναι απαραίτητος ο μεταγραφικός παράγοντας Pit-1 για την έναρξη της τρανσενεργοποίησης. Στον ενισχυτή υπάρχει και η περιοχή ERE, όπου συνδέονται οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών και δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Ο υπεραπομακρυσμένος υποκινητής, ο οποίος ρυθμίζει την σύνθεση της PRL εκτός της υπόφυσης βρίσκεται 5,8 kb ανοδικά από το σημείο έναρξης της μεταγραφής στην υπόφυση. Παραμένει ανενεργός στη υπόφυση, δεν συνδέει τον μεταγραφικό παράγοντα Pit-1 και δεν επηρεάζεται από την ντοπαμίνη ή τα οιστρογόνα, περιέχει όμως θέσεις σύνδεσης για άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Στις θέσεις εκτός υπόφυσης, παρότι ο υποκινητής βρίσκεται 5,8 kb ανοδικά σε σχέση με την υπόφυση, λόγω συρραφής (splicing) του εξονίου 1a με το 1b μεταγράφεται ένα μόριο RNA όμοιο με αυτό της υπόφυσης, πλην μιας μη μεταφραζόμενης περιοχής 150 bp στο 5' άκρο. Συνεπώς, η έκφραση του γονιδίου της PRL ρυθμίζεται διαφορετικά στην υπόφυση σε σχέση με τους άλλους ιστούς, αλλά παρά αυτόν τον διαφορετικό τρόπο ρύθμισης το τελικό μόριο της PRL που συντίθεται είναι πανομοιότυπο και στις δυο περιπτώσεις (Ben-Jonathan N et al. 1996, Ben-Jonathan N et al. 2002, Freeman ME et al. 2000).



Το αρχικό μόριο που συντίθεται είναι μια προ-ορμόνη 227 αμινοξέων, από την οποία προκύπτει το τελικό μόριο της PRL, μεγέθους 199 αμινοξέων και βάρους ~23 kDa, κατόπιν πρωτεολυτικής αποκοπής ενός πεπτιδίου 28 αμινοξέων από το αμινοτελικό άκρο. Το μόριο της PRL ανιχνεύεται σε όλα τα σπονδυλωτά, και η αλληλουχία των αμινοξέων ποικίλει στους διάφορους οργανισμούς, εμφανίζοντας ομολογία που κυμαίνεται από 97% μεταξύ των πρωτευόντων οργανισμών έως 56% μεταξύ πρωτευόντων και τρωκτικών. Στο μόριο σχηματίζονται 3 ενδομοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ των καταλοίπων ομάδων κυστεΐνης στις θέσεις 4-11, 58-174 και 191-199. Μελέτες της δευτεροταγούς δομής έδειξαν ότι ένα ~50% των αμινοξέων σχηματίζουν α-έλικες ενώ τα υπόλοιπα βρόγχους. Στην τριτοταγή μορφή του μορίου της PRL σχηματίζονται 4 α-έλικες σε αντιπαράλληλη θέση (Simon W.E et al. 1985, Bole-Feysot C et al. 1998, Freeman ME et al. 2000, Keeler C et al. 2003).

Η PRL που συντίθεται στην υπόφυση αποθηκεύεται σε εκκριτικά κοκκία εντός των κυττάρων, σε αντίθεση με την PRL που συντίθεται εκτός υπόφυσης και δεν αποθηκεύεται, γεγονός που αποτελεί μια ακόμη διαφορά μεταξύ των δύο διαφορετικών αυτών θέσεων σύνθεσής της.

III. ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΤΗΣ PRL

1) Μόρια ως προϊόντα εναλλακτικής συρραφής. Η εναλλακτική συρραφή των πρόδρομων μορίων mRNA είναι μια συνηθισμένη διαδικασία στους οργανισμούς μέσω της οποίας προκύπτουν διαφορετικές ισομορφές μιας πρωτεΐνης από ένα μόνο γονίδιο. Το φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και για την PRL. Ωστόσο τα περισσότερα τροποποιημένα μόρια της PRL προκύπτουν από μετασυνθετικές τροποποιήσεις όπως η αποκοπή, η φωσφορυλίωση, η γλυκοζυλίωση και η απαμίνωση.

2) Αποκοπή της PRL και αποκομμένα μόρια. Η αποκοπή συμβαίνει τόσο στους ιστούς όπου παράγεται η PRL, όπως η υπόφυση, όσο και σε όργανα-στόχους όπως ο μαστός και ο προστάτης. Υπάρχουν 2 τρόποι αποκοπής του μορίου της PRL: 1) η πρωτεολυτική αποκοπή μέσω της καθεψίνης-D στις θέσεις 145-149. Μέσω αυτής προκύπτουν 2 μόρια, ένα 16 kDa και ένα μικρότερο 6 kDa. Το μόριο των 16 kDa έχει ιδιότητες κατά της αγγειογένεσης

και αναστέλλει την ανάπτυξη προστατικών όγκων στα ποντίκια, πιθανώς καταστέλλοντας τον σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων. Έχει επίσης μειωμένη μιτογόνο και γαλακτογόνο δράση στον μαστό σε σχέση με το 'ακέραιο' μόριο της. 2) Η αποκοπή με τη δράση της καλλικρεΐνης στις θέσεις 173-174. Με αυτό το μηχανισμό προκύπτει ένα τμήμα 22 kDa. Στους επίμυες το κλάσμα αυτό παράγεται με φυλοεξαρτώμενο τρόπο και πιθανώς να παίζει κάποιο ρόλο στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Έχουν ανιχνευθεί και άλλα μόρια ως πιθανά προϊόντα αποκοπής, όμως ο ακριβής ρόλος τους παραμένει αδιευκρίνιστος.

3) Γλυκοζυλιωμένη PRL. Η γλυκοζυλιωμένη PRL έχει ανιχνευθεί σε πολλά είδη. Στον άνθρωπο αποτελεί το 16-24% της ολικής PRL του πλάσματος. Η ανθρώπινη PRL είναι γλυκοζυλιωμένη στην Asp³¹. Η μορφή αυτή έχει μειωμένη δραστηριότητα έναντι της μη γλυκοζυλιωμένης όσον αφορά πολλές δράσεις, όπως για παράδειγμα είναι η σύνδεση με τον υποδοχέα.

4) Φωσφορυλιωμένη PRL. Η φωσφορυλιωμένη PRL αποτελεί επίσης μια μορφή που ανιχνεύεται σε πολλά είδη. Η κύρια θέση φωσφορυλίωσης είναι η σερίνη 90, και σε μικρότερο βαθμό η σερίνη 26 και 34. Η φωσφορυλιωμένη μορφή μπορεί να εμφανίζει τόσο αγωνιστικές όσο και ανταγωνιστικές ιδιότητες έναντι της μη φωσφορυλιωμένης. Για παράδειγμα, εμφανίζει μειωμένη δράση όσον αφορά τη διέγερση του πολλαπλασιασμού των Nb2 κυττάρων του λεμφώματος. Στους επίμυες το ποσοστό της μεταβάλλεται ανάλογα με την φάση του κύκλου και κατά την κύηση. Επίσης στους επίμυες δρα με αυτοκρινή τρόπο ως ρυθμιστής της εκκρινόμενης από την υπόφυση προλακτίνης.

5) Απαμινωμένη PRL. Η απαμίνωση περιλαμβάνει την απώλεια μια αμινομάδας από την ασπαραγίνη ή τη γλουταμίνη και είναι συνηθισμένη διαδικασία για πολλές πρωτεΐνες. Η απαμινωμένη PRL έχει ανιχνευθεί σε διάφορα είδη, όπως και στον άνθρωπο. Ο φυσιολογικός της ρόλος δεν είναι ακόμη γνωστός.

6) Θειομένη PRL. Έχει ανιχνευτεί σε διάφορα είδη, ο φυσιολογικός της όμως ρόλος δεν είναι ακόμη γνωστός.

Επίσης υπάρχουν μόρια με τα οποία συνδέεται η προλακτίνη, τα οποία έχουν ανιχνευθεί στο γάλα και τον ορό. Φαίνεται πως μοιάζουν με το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα. Πολυμερισμός και σύνδεση με IgG οδηγεί στο σχηματισμό μεγάλων μορίων: η 'μεγάλη' PRL (50-60 kDa) και η μακρο-PRL (150-170 kDa) ανιχνεύονται στον ορό ασθενών με υπερπρολακτιναιμία (Sinha YN' 1995).



ΠΙΓ. ΘΕΣΕΙΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΛΑΚΤΙΝΗΣ

Το κύριο όργανο παραγωγής της PRL είναι η υπόφυση, όπου η PRL συντίθεται από κύτταρα που ονομάζονται λακτοτρόφα ή μαμμοτρόφα και τα οποία αποτελούν το 20-50% των κυττάρων του προσθίου λοβού. Η έκκριση τους βρίσκεται υπό τον συνεχή ανασταλτικό έλεγχο του υποθαλάμου. Ο κυριότερος ανασταλτικός παράγοντας έκκρισης της PRL (prolactin inhibitor factor, PIF) που εκκρίνεται από τον υποθάλαμο είναι η ντοπαμίνη, και το κυριότερο φυσιολογικό ερέθισμα για την έκκριση της PRL είναι ο θηλασμός. Εκτός της υποφύσεως, η PRL συντίθεται και σε πολλούς άλλους ιστούς και όργανα, όπως οι διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, ο φθαρτός, το μυομήτριο, ο θύμος αδένας, ο σπλήνας, τα κυκλοφορούντα λεμφοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα του μυελού των οστών, τα κύτταρα του μαστού (φυσιολογικά και καρκινικά), οι ινοβλάστες του δέρματος, οι ιδρωτοποιοί και οι δακρυικοί αδένες, ο προστάτης. Πειράματα σε επίμνες που υπέστησαν υποφουσεκτομή έδειξαν ότι τα επίπεδα της PRL στον ορό μειώνονται στο 20% των αρχικών μετά την επέμβαση, για να επανέλθουν σταδιακά σε επίπεδα ~50% των φυσιολογικών, γεγονός που υποδηλώνει ότι η εξωϋποφυσιακή PRL ενδεχομένως αντικαθιστά την PRL της υπόφυσης για ορισμένες από τις δράσεις της (Bole-Feysot C et al. 1998).

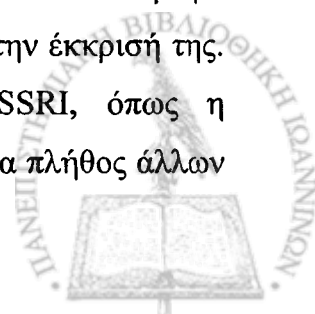
ΠΙΓ1. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΛΑΚΤΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΦΥΣΗ

Ο ρυθμός της έκκρισης της PRL από την υπόφυση διαφοροποιείται ανάλογα με ποικίλα ερεθίσματα, προερχόμενα είτε από το εξωτερικό περιβάλλον είτε από το εσωτερικό περιβάλλον του οργανισμού. Για παράδειγμα, υπάρχει ο κιρκάδιος ρυθμός έκκρισης, κατά τον οποίο τα επίπεδα της PRL είναι υψηλότερα κατά τον ύπνο και χαμηλότερα την ώρα της αφύπνισης. Ο θηλασμός, το στρες, και τα αυξημένα επίπεδα ωοθηκικών ορμονών, κυρίως οιστρογόνων, διεγείρουν την έκκριση της PRL. Στους επίμνες παρατηρείται καταμήνια διακύμανση της PRL, με αύξηση της στον προ-οίστρο λόγω αύξησης της οιστραδιόλης. Κατά την κύηση τα επίπεδα της PRL αυξάνουν, όμως στον τοκετό υπάρχει μια εντελώς διαφορετική διακύμανσή τους, καθώς μειώνονται σταδιακά μέχρι 1-2 ώρες πριν ολοκλήρωσή του, αυξάνουν στη συνέχεια και μειώνονται ξανά 2 ώρες μετά το τέλος του τοκετού. Η διακύμανση αυτή ρυθμίζεται και επηρεάζεται ισχυρά από παράγοντες άλλους

πλην της ντοπαμίνης (Stefos T. et al. 2001). Επίσης εξωδεκτικά αισθητικά ερεθίσματα, όπως οπτικά, οσφρητικά, ηχητικά, επηρεάζουν την έκκριση της PRL σε πειραματόζωα. Η εκάστοτε ρύθμιση όλων αυτών των μεταβολών του ρυθμού έκκρισης γίνεται σε διαφορετικά επίπεδα. Ήδη αναφέρθηκε η ρύθμιση στο επίπεδο του υποθαλάμου. Ένα άλλο επίπεδο ρύθμισης βρίσκεται μέσα στην ίδια την υπόφυση, μέσω αυτοκρινών και παρακρινών μηχανισμών μεταξύ των κυττάρων του προσθίου λοβού, αλλά και μέσω της δράσης της νευροϋπόφυσης και του ενδιάμεσου λοβού πάνω στην πρόσθια υπόφυση. Ένα ακόμη επίπεδο ρύθμισης είναι αυτή που ασκούν απομακρυσμένα περιφερικά όργανα (Freeman M et al. 2000).

A. Ρύθμιση σε επίπεδο υποθαλάμου

Αναλυτικότερα, όσον αφορά τον υποθάλαμο, η ντοπαμίνη που παράγεται στους TIDA νευρώνες φτάνει μέσω πυλαίων αγγείων στα κολπώδη τριχοειδή της υπόφυσης και αποτελεί τον κυριότερο ρυθμιστή της έκκρισης της PRL, ασκώντας ανασταλτική δράση στα λακτοτρόφα κύτταρα μέσω των D_2 ντοπαμινεργικών υποδοχέων. Φάρμακα που αποκλείουν τους υποδοχείς την ντοπαμίνης (πχ φαινοθειαζίνες, μετοκλοπραμίδη) ή προκαλούν ελάττωση των αποθεμάτων της ντοπαμίνης στον υποθάλαμο (ρεζερπίνη, μεθυλντόπα) διεγείρουν την έκκριση της PRL. Η PRL επηρεάζει τον βαθμό του ελέγχου που ασκεί στην έκκρισή της ο υποθάλαμος μέσω ενός μηχανισμού βραχείας παλίνδρομης ρύθμισης. Συγκεκριμένα, η αύξηση της PRL στο πλάσμα ασκεί θετική παλίνδρομη ρύθμιση στην έκκριση της ντοπαμίνης, η οποία με την σειρά της προκαλεί ελάττωση της έκκρισης της PRL από την υπόφυση. Υπάρχουν και ντοπαμινεργικοί THDA νευρώνες οι οποίοι εκλύουν ντοπαμίνη στον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης και επηρεάζουν την έκκριση της PRL, καθώς και PHDA νευρώνες που εκκρίνουν ντοπαμίνη στο μέσο λοβό (σε πειραματόζωα). Εκτός της ντοπαμίνης, που είναι ο κύριος ανασταλτικός παράγοντας της έκκρισης της PRL, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες με παρόμοια δράση που εκκρίνονται από νευροενδοκρινείς νευρώνες, όπως το GABA και η σωματοστατίνη. Πέραν των ανασταλτικών παραγόντων, οι νευροενδοκρινείς νευρώνες εκκρίνουν και παράγοντες που διεγείρουν την έκκριση της PRL (prolactin releasing factors, PRF). Τέτοιοι παράγοντες είναι η TRH, η ωκυτοκίνη και η νευροτενσίνη. Σε αντίθεση με το ντοπαμινεργικό σύστημα, το υποθαλαμικό σεροτονινεργικό σύστημα διεγείρει την έκκριση της PRL. Η επίδραση δεν είναι άμεση στα λακτοτρόφα κύτταρα αλλά έμμεση, μέσω της παραγωγής άλλων ουσιών που διεγείρουν την έκκρισή της. Φάρμακα που αναστέλλουν την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης (SSRI, όπως η φλουοξετίνη) αυξάνουν τα επίπεδα της PRL στο πλάσμα. Επίσης υπάρχει ένα πλήθος άλλων



παραγόντων που επηρεάζουν την έκκριση της PRL, είτε επιδρώντας στους TIDA νευρώνες, είτε στα λακτοτρόφα κύτταρα, είτε στο ΚΝΣ. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες δρουν σε διαφορετικά επίπεδα ταυτόχρονα, με δράσεις που συχνά είναι διαφορετικές και αντίθετες σε κάθε επίπεδο. Η έκκριση της PRL αυξάνεται από την ισταμίνη, την TRH, την ωκυτοκίνη, την βαζοπρεσσίνη, το VIP, τα ενδογενή οπιοειδή, την γαλανίνη, αυξητικούς παράγοντες όπως οι EGF, FGF-2, τις στεροειδείς ορμόνες, την αγγειοτενσίνη II, ενώ αναστέλλεται από την ακετυλχολίνη, την καλσιτονίνη, την α -MSH (Freeman M et al. 2000).

B. Ενδοϋποφυσιακή ρύθμιση

Μεταξύ των κυττάρων του προσθίου λοβού της υπόφυσης υπάρχουν αυτοκρινείς και παρακρινείς μηχανισμοί που ρυθμίζουν την έκκριση της PRL. Η ίδια η ορμόνη αναστέλλει την έκκριση της δρώντας στα λακτοτρόφα κύτταρα. Με αυτοκρινή-παρακρινή τρόπο αυξάνεται η έκκριση της PRL από το VIP, την γαλανίνη, την αγγειοτενσίνη II, την II-6, ενώ αναστέλλεται από τις ενδοθηλίνες, την καλσιτονίνη και την ακετυλχολίνη. Φαίνεται πως η παρακρινής δράση δεν είναι υπεύθυνη για απότομες και βραχυχρόνιες αλλαγές στην έκκριση της PRL, αλλά για αλλαγές που συμβαίνουν σε ένα μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Πέραν των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων του προσθίου λοβού της υπόφυσης, ένα άλλο είδος ενδοϋποφυσιακής ρύθμισης αποτελεί η δράση της νευροϋπόφυσης και του ενδιάμεσου λοβού πάνω στον πρόσθιο λοβό. Παράγοντες που συντίθενται σε αυτούς τους λοβούς, όπως είναι για παράδειγμα η ωκυτοκίνη, η βαζοπρεσσίνη και η α -MSH, φτάνουν στον πρόσθιο λοβό μέσω των βραχέων πυλαίων αγγείων και επηρεάζουν την έκκριση της PRL (Freeman M et al. 2000).

Γ. Ρύθμιση από περιφερικά όργανα.

Ουσίες που παράγονται σε απομακρυσμένα όργανα επηρεάζουν την έκκριση της προλακτίνης δρώντας είτε στον υποθάλαμο είτε κατευθείαν στα λακτοτρόφα κύτταρα. Με αυτό τον τρόπο δρα η οιστραδιόλη, η οποία παράγεται στις ωοθήκες και αυξάνει την έκκριση της PRL δρώντας και στο επίπεδο του υποθαλάμου αλλά και απευθείας στα λακτοτρόφα κύτταρα. Επίσης η προγεστερόνη, που άλλοτε προκαλεί αύξηση και άλλοτε μείωση των επιπέδων της PRL. Τα γλυκοκορτικοειδή των επινεφριδίων μειώνουν την έκκριση της PRL δρώντας στον υποθάλαμο. Μείωση της PRL προκαλεί και το PL που παράγεται στον πλακούντα και δρα τόσο στον υποθάλαμο όσο και στην υπόφυση. Επίσης η λεπτίνη που



παράγεται στον λιπώδη ιστό αυξάνει την PRL με μηχανισμούς που δεν είναι σαφώς διευκρινισμένοι (Freeman M et al. 2000).

III.2. ΕΞΩΥΠΟΦΥΣΙΑΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ PRL

Η παρουσία της PRL σε έναν ιστό ή ένα διαμέρισμα του σώματος δεν υποδηλώνει και παραγωγή στο σημείο αυτό, καθώς η PRL μπορεί να μεταφερθεί από την κυκλοφορία σε ένα άλλο διαμέρισμα μέσω πρωτεϊνικών μεταφορέων ή να συγκεντρωθεί στο εσωτερικό των κυττάρων με ενδοκύττωση. Πέραν της υπόφυσης, η σύνθεση της PRL έχει ανιχνευτεί σε πολλά θηλαστικά και σε επίμυες σε περιοχές του εγκεφάλου όπως ο υποθάλαμος, ο εγκεφαλικός φλοιός, ο υπόκαμπος, ο αμυγδαλοειδής πυρήνας, το εγκεφαλικό στέλεχος, το διαφανές διάφραγμα, το κέλυφος του φακοειδούς πυρήνα, το εγκεφαλικό στέλεχος, η παρεγκεφαλίδα, ο νωτιαίος μυελός, τα χοριοειδή πλέγματα, και τα περικοιλιακά όργανα (Freeman ME et al. 2000, Ben-Jonathan N et al., 1996).

Ο πλακούντας παράγει τα πλακουντιακά λακτογόνα που ομοιάζουν με την PRL αλλά παράγει και καθεαυτή την προλακτίνη. Ο φθαρτός υμένας αποτελεί την πλουσιότερη εξωϋποφυσιακή πηγή PRL, η οποία μάλιστα είναι πανομοιότυπη με την PRL της υπόφυσης με βάση χημικά, ανοσολογικά και βιολογικά κριτήρια. Η έκκρισή της ρυθμίζεται από αυτοκρινείς και παρακρινείς παράγοντες της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας, ενώ οι ρυθμιστές της υποφυσιακής έκκρισης όπως η ντοπαμίνη και η TRH και το VIP δεν παίζουν κανένα ρόλο. Η προγεστερόνη έχει βρεθεί να είναι ένας ισχυρός διεγέρτης αυτής της έκκρισης. Η παραγόμενη PRL διαχέεται στο αμνιακό υγρό όπου οι συγκεντρώσεις της απαντώνται σε επίπεδα 50-100 φορές μεγαλύτερα από αυτά της μητρικής και εμβρυϊκής κυκλοφορίας, με την μέγιστη τιμή στις 20-24 εβδομάδες της κύησης (Freeman ME et al. 2000, Bole-Feysot C et al. 1998).

Η μη εγκυμονούσα μήτρα επίσης παράγει PRL, όμως σε αντίθεση με τον φθαρτό η προγεστερόνη φαίνεται να αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα αυτής της έκκρισης (Freeman ME et al. 2000, Ben-Jonathan N et al. 1996).

Ο μαζικός αδένας μπορεί να παράγει PRL, καθώς έχει ανιχνευτεί τόσο το mRNA της PRL όσο και η ίδια η PRL σε επιθηλιακά κύτταρα του μαστού με northern blot, RT-PCR και in situ υβριδισμό. Μέρος της εκκρινόμενης στο γάλα PRL προέρχεται από την υπόφυση και



μέρος από την τοπικά παραγόμενη στον μαστό (Freeman ME et al. 2000, Ben-Jonathan N et al. 1996, Bole-Feysot C et al. 1998).

Τα λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος παράγουν PRL και φέρουν ντοπαμινεργικούς υποδοχείς. Το mRNA της PRL έχει ανιχνευτεί με northern blot, RT-PCR και in situ υβριδισμό, ενώ με western blot και διαφόρους μεθόδους σήμανσης έχει ανιχνευτεί ένα μόριο PRL 22kDa και άλλα μόρια μικρότερα αυτού. Τόσο τα T- όσο και τα B-λεμφοκύτταρα παράγουν PRL, όπως και οι μυελοβλάστες ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία, τα κύτταρα του λεμφώματος, τα NK κύτταρα. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος φέρουν και τους αντίστοιχους υποδοχείς για την PRL.

Υπάρχουν ενδείξεις για παραγωγή PRL και σε πολλά άλλα όργανα, όπως το δέρμα και οι αδένες αυτού, το ΓΕΣ, οι πνεύμονες, τα επινεφρίδια, τα νησίδια του Langerhans, οι ωοθήκες, ο προστάτης και οι όρχεις. Τέλος η PRL ανιχνεύεται σε πολλά βιολογικά υγρά και διαμερίσματα του σώματος όπως το ΕΝΥ, τα δάκρυα, το γάλα, το αίμα, τα ούρα, το ωοθηλακικό και το αμνιακό υγρό (Ben-Jonathan N et al. 1996).

Ο φυσιολογικός ρόλος και οι λειτουργίες που επιτελεί η PRL στις παραπάνω θέσεις αναλύονται στη συνέχεια.

III. Η ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ PRL

Παρότι αρχικά η PRL αναγνωρίστηκε ως μια υποφυσιική ορμόνη που σχετίζεται με την γαλουχία, έχει πλέον ανακαλυφθεί ότι σχετίζεται με περισσότερες από 300 βιολογικές δράσεις, πολλές εκ των οποίων παρατηρούνται μόνο σε κατώτερους οργανισμούς, ενώ άλλες ανευρίσκονται και στους ανώτερους.

Για λόγους ταξινόμησης οι βιολογικές της δράσεις μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 6 γενικές κατηγορίες:

- I. Ισοζύγιο ύδατος και ηλεκτρολυτών
- II. Αύξηση και ανάπτυξη
- III. Ενδοκρινολογία και μεταβολισμός
- IV. Εγκέφαλος και συμπεριφορά
- V. Αναπαραγωγή
- VI. Ανοσορρύθμιση

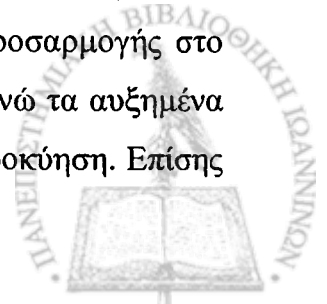


I. Δράσεις σχετικές με το ισοζύγιο ύδατος και ηλεκτρολυτών: Η δράση στο ισοζύγιο ύδατος και ηλεκτρολυτών είναι περισσότερο εμφανής στα ψάρια και τους αμφίβιους οργανισμούς. Ωστόσο και στα θηλαστικά έχει βρεθεί ότι μειώνει την απέκκριση Na^+ και K^+ , διεγείρει την Na-K-ATPase στον νεφρό, μειώνει το Na^+ και το Cl^- στον ιδρώτα, και αυξάνει την απορρόφηση του ύδατος και των ηλεκτρολυτών σε όλες τις περιοχές του εντέρου. Επίσης προκαλεί μείωση του όγκου του αμνιακού υγρού, ενώ η υπερβολική παραγωγή αμνιακού υγρού (πολυϋδράμνιο) σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα PRL σε αυτό. (Bole-Feysot C et al. 1998).

II. Δράσεις σχετικές με την αύξηση και ανάπτυξη: Η PRL σχετίζεται με την διαδικασία της μεταμόρφωσης στους αμφίβιους οργανισμούς, την οποία και αναστέλλει. Η δράση της στη σωματική αύξηση ανώτερων οργανισμών αμφισβητείται. Ωστόσο διαδραματίζει ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη πολλών κυττάρων όπως για παράδειγμα του ήπατος, του εντερικού βλεννογόνου, των λείων μυϊκών ινών των αγγείων, των β-κυττάρων του παγκρέατος, των αστροκυττάρων, των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Επίσης σχετίζεται με την πνευμονική ωρίμανση και την παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα, και πιθανώς η PRL του αμνιακού υγρού να ρυθμίζει την ωρίμανση του εμβρυϊκού ανοσοποιητικού συστήματος. Τέλος σχετίζεται με την ανάπτυξη ορισμένων μορφών όγκων, ενώ η σχέση της με τον καρκίνο του μαστού και του προστάτη συζητείται εκτενέστερα παρακάτω (Bole-Feysot C et al. 1998).

III. Δράσεις σχετικές με την ενδοκρινολογία και τον μεταβολισμό: Η PRL αυξάνει την έκκριση της χολής και της ινσουλίνης, και αυξάνει τη γλυκοκινάση και τον μεταφορέα γλυκόζης 2. Δρα στην επινεφριδιακή στεροειδογένεση αυξάνοντας τα ανδρογόνα (διϋδροεπιανδροστερόνη, DHEA-S), την κορτιζόλη και την αλδοστερόνη. Επίσης διεγείρει την δράση της 21-α υδροξυλάσης και υπάρχουν δεδομένα για την ανασταλτική δράση των αυξημένων επιπέδων της PRL στην προκαλούμενη από την LH έκκριση της FSH (Messinis et al. 1983).

IV. Δράσεις σχετικές με τον εγκέφαλο και τη συμπεριφορά: Η PRL εμπλέκεται στην γονική συμπεριφορά πολλών ειδών, όπως τα ψάρια, τα πουλιά αλλά και τα θηλαστικά. Οι ενδοκρινολογικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια και μετά το τέλος της κύησης, συμπεριλαμβανομένης και της αύξησης των επιπέδων της PRL και των PLs, θεωρούνται υπεύθυνες για την επαγωγή της μητρικής συμπεριφοράς. Οι αντιδράσεις προσαρμογής στο στρες σχετίζονται με την PRL. Η PRL έχει κάποιες αναλγητικές ιδιότητες, ενώ τα αυξημένα επίπεδα σε γυναίκες σχετίζονται με ψυχοσωματικές αντιδράσεις όπως η ψευδοκύηση. Επίσης



τα αυξημένα επίπεδα σχετίζονται με μειωμένη libido, αύξηση του ύπνου REM και μεταβολές του κύκλου ύπνου-αφύπνισης. Έχει επίσης βρεθεί ότι σχετίζεται με τη ρύθμιση της σύστασης του ENY και έχει μιτογόνο δράση στα αστροκύτταρα (Bole-Feysot C et al. 1998). Η PRL επηρεάζει τα επίπεδα της GnRH, καθώς σε φυσιολογικά επίπεδα διεγείρει την έκκρισή της, ενώ η υπερπρολακτιναιμία προκαλεί μείωση των επιπέδων της. Πιθανώς αυτός να είναι ένας μηχανισμός μέσω του οποίου η υπερπρολακτιναιμία ασκεί αντιγοναδική δράση (Ben-Jonathan N et al. 1996).

V. Δράσεις σχετικές με την αναπαραγωγή: Αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα των λειτουργιών που έχουν αποδοθεί στην PRL.

α) γαλουχία: η πιο γνωστή δράση της PRL αφορά τον μαζικό αδέν. Η PRL αποτελεί έναν από τους παράγοντες που προκαλεί ανάπτυξη του αδέν. κατά την κύηση, και είναι απαραίτητη για την διαφοροποίηση στο τελικό στάδιο της ανάπτυξης και κατά την λοβιοκυψελιδική ανάπτυξη. Επίσης είναι απαραίτητη για την σύνθεση των πρωτεϊνών του γάλακτος, της λακτόζης και των λιπιδίων, που αποτελούν κύρια συστατικά του γάλακτος. Αντιστοίχως στα πτηνά, η PRL προκαλεί αύξηση του προλοβού. Μια αντίστοιχη δράση εντοπίζεται και στα ψάρια.

β) ωοθηκική λειτουργία: στα τρωκτικά εμφανίζει ωχρινοτρόπο και ωχρινολυτική δράση. Η ωχρινοτρόπος δράση περιλαμβάνει την διέγερση της παραγωγής προγεστερόνης από τα κύτταρα του ωχρού σωματίου. Η ωχρινολυτική δράση παρατηρείται επίσης και στα θηλαστικά. Ως τέτοιος παράγων λοιπόν η PRL παίζει ρόλο στις φυσιολογικές καταστάσεις του οίστρου, της κύησης και της γαλουχίας (Bole-Feysot C et al. 1998).

ιι) μήτρα: μεταξύ των άλλων η PRL προάγει την εμφύτευση της βλαστοκύστης, αυξάνει τους υποδοχείς της προγεστερόνης και των οιστρογόνων και την εκκριτική δραστηριότητα του μυομητρίου.

γ) όρχεις: γενικά διεγείρει τις λειτουργίες των όρχεων στα περισσότερα θηλαστικά. Επηρεάζει την παραγωγή και το μεταβολισμό ουσιών, τον ενεργειακό μεταβολισμό, τους υποδοχείς των ορμονών και τη δραστηριότητά τους, το μέγεθος του προστάτη αδέν.

Πειράματα σε ποντίκια στα οποία έλειπε ο υποδοχέας της προλακτίνης (PRLR) ανέδειξαν πολλές από τις δράσεις της PRL που σχετίζονται με την αναπαραγωγή. Θηλυκά PRLR^{-/-} έχουν διαταραχές στον κύκλο και είναι στείρα λόγω αδυναμίας της μήτρας να προσφέρει το κατάλληλο περιβάλλον για την εμφύτευση και ανάπτυξη της βλαστοκύστης. Επίσης PRLR^{-/-} ή ^{+/-} ποντίκια είχαν μειωμένη μητρική συμπεριφορά απέναντι στα νεογνήνα. Αρσενικά PRLR^{-/-} είχαν μειωμένη γονιμότητα. Θηλυκά PRLR^{-/-} δεν μπορούσαν

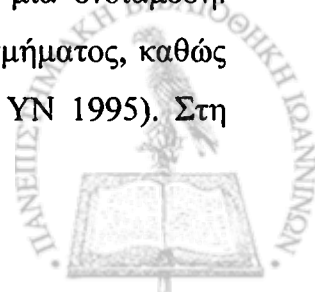
να θηλάσουν καθώς είχαν σημαντικά μειωμένες διακλαδώσεις των εκφορητικών πόρων και απουσία των κυψελίδων του μαστού (Bole-Feysot C et al. 1998, Harris J et al. 2004).

VI. Δράσεις σχετικές με ανοσορρύθμιση: Η PRL σχετίζεται με πολλές λειτουργίες σχετικά με την ρύθμιση του ανοσολογικού συστήματος. Οι πρώτες ενδείξεις για τη σχέση υπόφυσης και ανοσοποιητικού συστήματος είχαν παρατηρηθεί από τη δεκαετία του '30 και αφορούσαν την ατροφία του θύμου αδένου μετά από υποφυσεκτομή. Επίσης ανεπάρκειες της κυτταρικής και χυμικής ανοσίας σε επίμυες που είχαν υποστεί υποφυσεκτομή αναστρέφονταν μετά από τη μεταμόσχευση μοσχευμάτων της πρόσθιας υπόφυσης ή με την εξωγενή χορήγηση PRL. Ανάμεσα στις πολλές λειτουργίες της PRL που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα αναφέρονται ενδεικτικά η αύξηση τη κυτταρικής και χυμικής ανοσίας, η παραγωγή αντισωμάτων, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (μιτογόνος δράση στα λεμφοκύτταρα), η αύξηση των υποδοχέων της Il-2, η αναστολή της απόπτωσης, η ενεργοποίηση των μακροφάγων.

III. Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΗΣ ΠΡΟΛΑΚΤΙΝΗΣ

Ο υποδοχέας της PRL (PRLR) είναι μέλος της τάξης I της υπερικογένειας των υποδοχέων των κυττοκινών. Η υπερικογένεια αυτή περιλαμβάνει επίσης τους υποδοχείς της GH, της λεπτίνης, της ερυθροποιητίνης καθώς και πολλών ιντερλευκινών (Harris J et al. 2004). Στον άνθρωπο το γονίδιο του PRLR εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5 και έχει μήκος μεγαλύτερο των 100 kb. Η εναλλακτική συρραφή του γονιδίου του PRLR οδηγεί στο σχηματισμό διαφόρων μορφών του υποδοχέα, που διαφέρουν ως προς το μήκος τους. Τέτοιες ισομορφές έχουν ανιχνευθεί σε διάφορους οργανισμούς καθώς και στον άνθρωπο, όπου έχουν ανιχνευθεί 6 ισομορφές.

Ο υποδοχέας αποτελείται από 3 τμήματα: το εξωκυττάριο, τα διαμεμβρανικό και το ενδοκυττάριο. Στους επίμυες έχουν ανιχνευθεί 3 διαφορετικές ισομορφές που χαρακτηρίζονται ως βραχεία (short, 291aa), ενδιάμεση (intermediate, 393 aa) και μακρά (long, 591 aa), και διαφέρουν ως προς το μήκος του ενδοκυτταρίου τμήματος τους. Κατ' αντιστοιχία στον άνθρωπο υπάρχει μια μακρά μορφή, δυο βραχείες και μια ενδιάμεση. Επίσης υπάρχει μια μορφή στην οποία λείπει ένα μέρος του εξωκυτταρίου τμήματος, καθώς και μια διαλυτή μορφή του υποδοχέα (Clevenger CV et al. 2003, Sinha YN 1995). Στη



μακρά μορφή του υποδοχέα, στον άνθρωπο, τα 3 μέρη έχουν αντίστοιχα μέγεθος 211 aa το εξωκυττάριο, 24 aa το διαμεμβρανικό και 364 aa το ενδοκυττάριο.

Στο εξωκυττάριο τμήμα υπάρχουν 2 περιοχές, οι S_1 και S_2 οι οποίες είναι του τύπου III της φιβρονεκτίνης (III fibronectin-like domains). Η περιοχή S_1 περιέχει τα περισσότερα σημεία σύνδεσης του προσδέτη, δηλαδή της PRL (ligand contact sites). Στην περιοχή S_2 εμφανίζεται το λεγόμενο μοτίβο WS (WS motif), το οποίο αποτελείται από την αλληλουχία Trp-Ser-οποιοδήποτε αμινοξύ-Trp-Ser, και το οποίο απαντάται σταθερά σε όλα τα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων των κυττοκινών. Και οι 2 αυτές περιοχές (S_1 , S_2) είναι αναγκαίες για τη σύνδεση του υποδοχέα με την PRL, ενώ η περιοχή S_2 περιέχει και τμήματα υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση του ενός υποδοχέα με άλλον έναν παρόμοιο υποδοχέα κατά το διμερισμό του υποδοχέα.

Το διαμεμβρανικό τμήμα έχει μήκος 24 aa και οι λειτουργίες του δεν είναι διευκρινισμένες.

Στο ενδοκυττάριο τμήμα και πλησίον την κυτταρικής μεμβράνης υπάρχουν περιοχές που ονομάζονται Box 1, Variable Box 1 (V-Box), Box 2 και extended box 1 (X-Box). οι περιοχές αυτές, και κυρίως οι Box 1 και Box 2 διατηρούνται σταθερές στα διάφορα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων των κυττοκινών. Η Box1 περιέχει μια πλούσια σε προλίνη θέση σύνδεσης του τύπου -SH3 που είναι απαραίτητη για την σύνδεση της Janus κινάσης 2 (Jak 2), την ενεργοποίηση της και τη μεταβίβαση του σήματος μετά την πρόσδεση της PRL (Clevenger CV et al. 2003). Ο ρόλος των V-Box και X-Box δεν είναι επαρκώς γνωστός (Chilton N and Hewetson A. 2005).

Οι διάφορες μορφές του υποδοχέα διαφέρουν ως προς την μεταβίβαση του σήματος και την έκφραση των γονιδίων που επάγουν μετά την επίδραση της PRL (Kevin O' Neal et al., 1994).

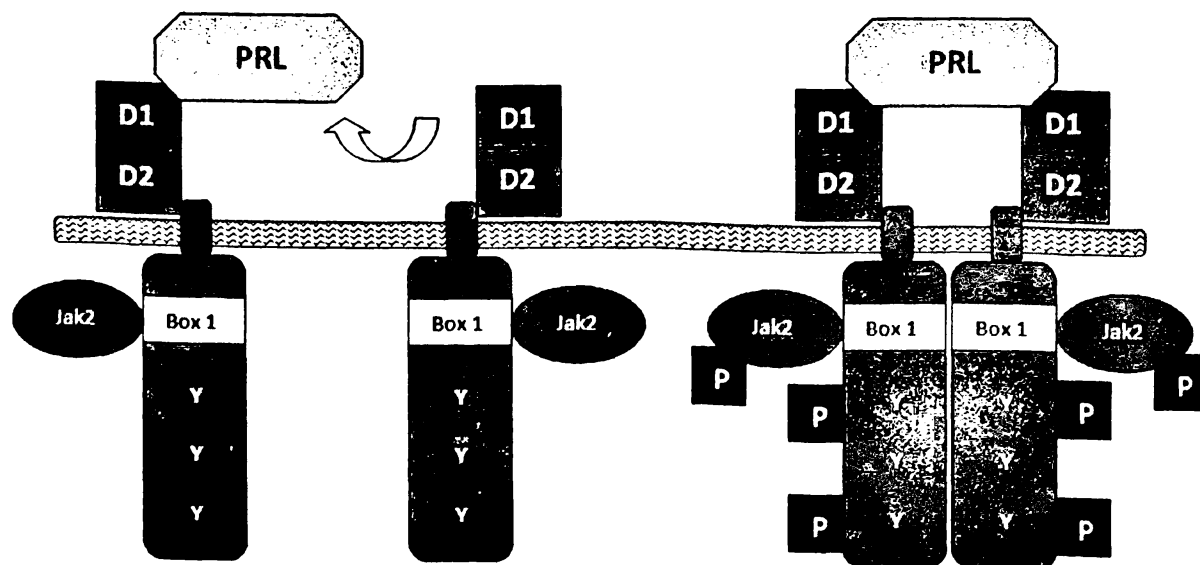
III.1. ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ PRL

Στον PRLR εκτός της PRL συνδέονται επίσης η GH και το PL, τα οποία και τον ενεργοποιούν. Το 1^ο βήμα μετά τη σύνδεση ενός μορίου PRL είναι ο διμερισμός του υποδοχέα, ο οποίος ενεργοποιεί διαφόρους 'καταρράκτες' του σήματος μέσω των οποίων η PRL επιτυγχάνει τη δράση της (Harris J et al. 2004). Οι κυριότερες από τις οδούς σηματοδότησης είναι:



A) Η οδός Jak-Stat. Η οικογένεια των κινασών Jak περιλαμβάνει 4 μέλη, τα Jak 1,2,3 και Tyk 2. Όλοι οι υποδοχείς των κυτταροκινών χρησιμοποιούν κάποιο από αυτά τα μέλη για την μετάδοση του ορμονικού σήματός τους στο εσωτερικό του κυττάρου. Η Jak 2 είναι η κύρια κινάση που σχετίζεται με την μεταγωγή του σήματος της PRL (Nancy E. Hynes et al. 1997, Bole-Feyšot C et al. 1998).

Η περιοχή Box-1/Box-2 του ενδοκυττάρου τμήματος του υποδοχέα είναι η περιοχή που αλληλεπιδρά με την Jak2. Η ενεργοποίηση της Jak2 γίνεται ως εξής: μετά τη σύνδεση της PRL στον υποδοχέα γίνεται ο διμερισμός του υποδοχέα, δηλαδή ένας δεύτερος υποδοχέας συμπλησιάζει και ενώνεται με το σύμπλεγμα προλακτίνης-υποδοχέα σχηματίζοντας έτσι ένα τριμερές σύμπλοκο δυο υποδοχέων και ενός μορίου PRL. Με τον τρόπο αυτό τα μόρια Jak2 των 2 υποδοχέων συμπλησιάζουν, αλληλοφωσφορυλιώνονται και έτσι ενεργοποιούνται. Η διαδικασία αυτή συμβαίνει ταχύτατα, σε χρόνο <1 min από τη στιγμή σύνδεσης της PRL με τον υποδοχέα. Ο ίδιος ο υποδοχέας αποτελεί επίσης υπόστρωμα για την Jak2, και φωσφορυλιώνεται από αυτή σε κατάλοιπα κυστεΐνης (Sinha YN 1995, Clevenger CV et al. 2003), (σχήμα A1).



Σχήμα A1. Η ενεργοποίηση του PRLR. Μετά τη σύνδεση ενός μορίου PRL με 2 μόρια του υποδοχέα ενεργοποιείται ο υποδοχέας, με αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση (P) των περιοχών Jak2 και του ενδοκυττάρου τμήματος του υποδοχέα στα κατάλοιπα της τυροσίνης (Y).

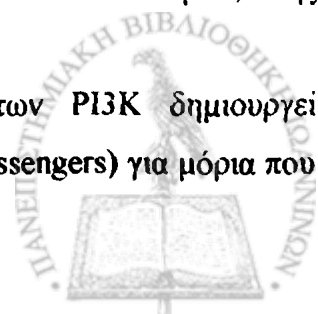


Οι φωσφορυλιωμένες από την Jak2 περιοχές του υποδοχέα αποτελούν θέσεις σύνδεσης για πρωτεΐνες με περιοχές -SH2, όπως είναι οι πρωτεΐνες Stat (Clevenger CV et al. 2003). Οι πρωτεΐνες Stat ανήκουν σε μια οικογένεια κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που αριθμεί μέχρι σήμερα 7 μέλη. Έχει βρεθεί ότι η μεταγωγή του σήματος της PRL ενεργοποιεί τις Stat1, Stat3 και Stat5α με τον ακόλουθο τρόπο: οι περιοχές του υποδοχέα που φωσφορυλιώθηκαν από την Jak2 αλληλεπιδρούν με τις -SH2 ομάδες των Stat και συνδέονται με αυτές. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες Stat φωσφορυλιώνονται από τις κινάσες Janus. Οι φωσφορυλιωμένες Stat αποσυνδέονται από τον υποδοχέα, σχηματίζουν ομοδιμερή και ετεροδιμερή μέσω της αλληλεπίδρασης της φωσφοτυροσίνης ενός μονομερούς Stat και της -SH2 περιοχής ενός άλλου μορίου Stat, και το διμερές αυτό σύμπλοκο μετακινείται στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί συγκεκριμένα στοιχεία του DNA (DNA elements) τα οποία βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων της PRL και έτσι ενεργοποιούν τη μεταγραφή των αντίστοιχων γονιδίων (Bole-Feysot C et al. 1998, Sinha YN 1995, Hynes N El et al. 1997, Henninghausen L et al. 1997).

Η οδός Jak-Stat είναι η κυριότερη οδός μεταβίβασης του σήματος που ενεργοποιείται από τον PRLR. Ωστόσο η ενεργοποιημένη Jak2 μπορεί να φωσφορυλιώσει μόρια και σε άλλες οδούς μεταβίβασης σήματος. Για παράδειγμα, η Jak2 μπορεί να αντιδράσει με πρωτεΐνες που περιέχουν -SH ομάδες όπως στην οδό MAPK, καθώς και υποστρώματα του υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS) στην οδό PI3K/Akt (Chilton B and Hewetson A 2005).

B) Η Οδός Ras-Raf-MAPK. Μια άλλη οδός που ενεργοποιείται από την PRL είναι η οδός Ras-Raf-MAPK. Οι p42/p44 MAPKs σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό που προκαλούν οι αυξητικοί παράγοντες σε πολλά βιολογικά συστήματα. Η επαγόμενη από την PRL ενεργοποίηση του Jak2 προκαλεί φωσφορυλίωση της τυροσίνης Erb2, αυξάνει τη σύνδεση του Grb2 και ενεργοποιεί την οδό Ras-MAPK. Οι p42/p44 MAPKs ασκούν την δράση τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω πολλαπλών μηχανισμών, όπως η φωσφορυλίωση των μεταγραφικών παραγόντων Ets, η αυξημένη σύνθεση της οικογένειας των γονιδίων fos (c-fos, Fra-1,2, c-jun, Jun B) και η ενεργοποίηση άλλων πρωτεϊνικών κινασών και υποστρωμάτων. Επίσης υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των οδών Stat και MAPK, καθώς οι MAPK μπορούν να προκαλέσουν φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Stat. Και άλλες οικογένειες MAPK εμπλέκονται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και τη απόπτωσης σε πολλά είδη κυττάρων.

Γ) Η Οδός PI3K (PI3 κινάσης). Η ενεργοποίηση των PI3K δημιουργεί φωσφοϊνοσιτιδία που δρουν ως δευτεροί αγγελιοφόροι (secondary messengers) για μόρια που



περιέχουν περιοχές ομολογίας πλεκστρίνης (plekstrin-homology domains). Από την κατηγορία I των PI3K παράγονται οι μεταβολίτες φωσφατιδυλινοσιτόλη (PtdIns) (3)P, PtdIns(3,4)P2 και PtdIns(3,4,5)P3, οι οποίες ρυθμίζουν οδούς σημαντικές για την ογκογένεση, περιλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού, των αλλαγών στον κυτταροσκελετό, της αναστολή της απόπτωσης και την αγγειογένεση.

Η αλληλεπίδραση του PRLR με μέλη της οικογένειας Src προκαλεί ενεργοποίηση του PI3K. Επίσης η PI3K μπορεί να ενεργοποιηθεί από πολλές οδούς που ενεργοποιούνται από την PRL, καθώς αποτελεί στόχο των Ras, Stat5, Stat3, IRS1, Gab1, Gab2, SHP-2.

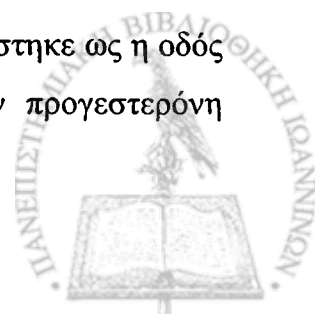
Τα παραγόμενα από την PI3K- φωσφοϊνοσιτίδια αποτελούν θέσεις σύνδεσης για την Akt (πρωτεϊνική κινάση B) και η οδός αυτή στη συνέχεια προάγει την επιβίωση των κυττάρων, αναστέλλει προ-αποπτωτικά σήματα και ρυθμίζει ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου όπως ο E2F και η κυκλίνη D1. Άλλα μόρια που επίσης ενεργοποιούνται από τους μεταβολίτες της φωσφοϊνοσιτίδης είναι τα Vav και Tec.

Δ) Άλλες ρυθμιστικές οδοί. Η ενεργοποίηση του PRLR ενεργοποιεί μόρια που αποτελούν θετικούς ή αρνητικούς ρυθμιστές και τα οποία τροποποιούν την ένταση και τη διάρκεια του προκαλούμενου από την PRL σήματος. Τέτοια μόρια είναι οι SHP, που ανήκουν στις φωσφατάσες των πρωτεϊνικών τυροσινών. Ένα από αυτά, η SHP-2 (ή αλλιώς PTP-1D) αυξορρυθμίζει το σήμα των κυττοκινών και των αυξητικών παραγόντων απομακρύνοντας ανασταλτικές φωσφοτυροσίνες. Οι φωσφατάσες των πρωτεϊνικών τυροσινών (PTPs) μπορούν επίσης να ασκήσουν αρνητική ρύθμιση σε πολλά συστήματα σήματος των κυττοκινών. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση του PTP1B μειώνει την επαγόμενη από την PRL φωσφορυλίωση των Stat 5a και 5b και την μετακίνησή τους στον πυρήνα.

Επίσης μέλη της οικογένειας των CIS (γνωστά και ως SOCS) ρυθμίζουν το σήμα των κυτταροκινών. Οι SOCS-1, SOCS-3 επάγονται από την PRL και η SOCS-1 είναι ένας ισχυρός αναστολέας της επαγόμενης από την Stat5 μεταγραφής. Οι SOCS-1, SOCS-3 συνδέονται στις Jak κινάσες και εμποδίζουν την δράση τους, ρυθμίζουν δηλαδή το βαθμό της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης των Stat.

Μια άλλη οικογένεια αναστολέων είναι η οικογένεια των PIAS, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις Stat πρωτεΐνες και εμποδίζουν τη σύνδεση αυτών στο DNA, και κατά συνέπεια και την επαγωγή της έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων.

Πρόσφατα πιθανολογείται η ύπαρξη μιας άλλης οδού, που χαρακτηρίστηκε ως η οδός Jak-RUSH, και η οποία θεωρείται ότι επάγει την εξαρτώμενη από την προγεστερόνη



ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της μητροσφαιρίνης (uteroglobin) (Chilton N and Hewetson A 2005).

Ε) Δράση της PRL στον πυρήνα. Υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν ότι η PRL μεταφέρεται εντός του πυρήνα του κυττάρου, όπου και ασκεί κάποιες λειτουργίες. Αυτή η μεταφορά διευκολύνεται από την πεπτιδυλ-προπυλ-ισομεράση κυκλοφιλίνη Β (CypB), με την οποία η PRL σχηματίζει σύμπλεγμα. Το σύμπλεγμα αυτό εντός του πυρήνα δρα ως επαγωγέας της μεταγραφής, διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση της Stat5 με το DNA και την απομάκρυνση ενός αναστολέα της Stat5, του PIAS3 (Clevenger CV et al. 2003).

ΠΨΤ. ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ PRL ΜΕ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΕΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Σε αντίθεση με άλλες ορμόνες, καμία ασθένεια στον άνθρωπο δεν έχει περιγραφεί που να σχετίζεται με γενετικές ανωμαλίες του μορίου της PRL ή του υποδοχέα της. Η μόνη πλήρως χαρακτηρισμένη διαταραχή που σχετίζεται με την PRL είναι η υπερπρολακτιναιμία και οι πιο συνηθισμένες παθολογικές εκδηλώσεις αυτής είναι η αμηνόρροια, η γαλακτόρροια και η ανικανότητα. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις για το ρόλο της PRL σε αυτοάνοσα νοσήματα (ΣΕΛ, ρευματοειδής αρθρίτιδα). Για παράδειγμα στον ΣΕΛ η υπερπρολακτιναιμία συνδυάζεται με πιο ενεργή νόσο. Επίσης πιθανολογείται σχέση με τον καρκίνο του ορθού και παχέος εντέρου και την κυστική ίνωση. Η σχέση με τον καρκίνο του μαστού και του προστάτη συζητείται εκτενέστερα στη συνέχεια. Το πολυϋδράμνιο σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα PRL στο αμνιακό υγρό. Η υποπρολακτιναιμία μπορεί αν εμφανιστεί ως ένα σπάνιο σύνδρομο, αν και ελάχιστα περιστατικά υποπρολακτιναιμίας έχουν περιγραφεί που να μην σχετίζονται με φαρμακευτική ή χειρουργική αιτιολογία. Η περίπτωση μια γυναίκας και της μητέρας της, που και οι δυο είχαν υποπρολακτιναιμία με μη ανιχνεύσιμα επίπεδα PRL που εκδηλώθηκε με αδυναμία γαλουχίας μετά τον τοκετό (puerperal alactogenesis), με φυσιολογικές τιμές στις άλλες ορμόνες της υπόφυσης υποδηλώνουν ένα γενετικό υπόβαθρο στην αιτιολογία της ασθένειας (Zargar AH 1997).



III. ΣΧΕΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΠΡΟΛΑΚΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Υπάρχουν πολλά δεδομένα και μελέτες που ερευνούν την σχέση μεταξύ της προλακτίνης και του καρκίνου του μαστού. Τα δεδομένα αφορούν επιδημιολογικές μελέτες, μελέτες σε πειραματόζωα, και in vitro πειράματα με κυτταρικές σειρές.

III.1. IN VIVO ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Η PRL επηρεάζει τόσο την έναρξη όσο και την πορεία της νεοπλασίας του μαστού στα τρωκτικά, καθώς έχει βρεθεί άμεση σχέση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων PRL και της ογκογένεσης στο μαζικό αδένα (Clevenger CV and Plank Tracey 1997, Llovera M et al. 2000B). Αρχικά παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης όγκων μαστού σε ποντίκια με μεταμοσχευμένα μοσχεύματα υπόφυσης. Θεραπεία με ρεσερπίνη ή υποθαλαμικές βλάβες της έσω εξοχής που αυξάνουν μακροχρόνια τα επίπεδα της PRL αυξάνουν επίσης και την συχνότητα των αυθορμήτως εμφανιζομένων όγκων μαστού στα ποντίκια. Στα τρωκτικά (σε αντίθεση από ότι συμβαίνει στους ανθρώπους) η έκκριση της PRL αυξάνει ως αποτέλεσμα της τεκνοποιίας και οι πολύτοκες επίμυες εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα όγκων μαστού έναντι των ατόκων της ίδιας ηλικίας.

Διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν το γονίδιο της PRL αναπτύσσουν αυτομάτως όγκους του μαστού σε ηλικία 11-15 μηνών. Κύτταρα T47D και MCF-7 μεγαλώνουν ως συμπαγείς όγκοι σε γυμνά ποντίκια (nude mice) όταν διεγερθούν από την PRL.

Επίσης στους επίμυες υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ της έκκρισης PRL και της ευαισθησίας του μαστού σε χημικά καρκινογόνα, και η υπερπρολακτιναίμια αυξάνει την ανάπτυξη των ήδη υπάρχοντων όγκου μαστού, ενώ η θεραπεία με φάρμακα που μειώνουν τα επίπεδα της PRL (πχ βρωμοκρυπτίνη) ή με αντιορό κατά της PRL εμποδίζει την ανάπτυξη αυτών των όγκων (Clevenger CV and Planc Tracey 1997, Llovera M et al. 2000B, Vonderhaar BK 1999, Vonderhaar BK 1998, Ben-Jonathan N et al. 2002).

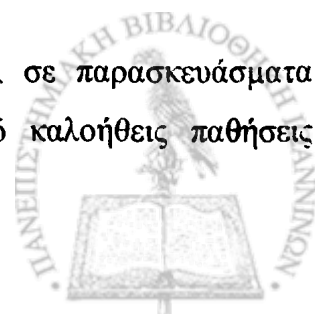


III.2. ΣΧΕΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ ΠΡΟΛΑΚΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Οι αρχικές μελέτες προσδιορισμού του υποδοχέα της προλακτίνης (PRLR) σε όγκους μαστού έδειξαν μικρά ποσοστά παρουσίας του υποδοχέα, που κυμαινόταν από 20 έως 65%. Αυτό οφείλεται σε πολλούς παράγοντες που σχετίζονται με το είδος και την ευαισθησία των διαφόρων τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν (πχ η χρήση ο-PRL, η οποία δεν συνδέεται τόσο ισχυρά με τον υποδοχέα όσο η hPRL, ή η χρήση κακής ποιότητας ¹²⁵I-PRL που χρησιμοποιήθηκε σε διάφορες ραδιοανοσολογικές μεθόδους). Ωστόσο μεταγενέστερες μελέτες ανίχνευσαν την σχεδόν καθολική παρουσία του PRLR σε δείγματα τόσο κακοήθων όγκων μαστού, όσο και σε διάφορες καλοήθεις παθήσεις. Σε μία μελέτη όπου εξετάστηκαν 69 περιπτώσεις ιστολογικών παρασκευασμάτων από περιστατικά καρκίνου μαστού, ανιχνεύτηκε με ανοσοϊστοχημεία η παρουσία του PRLR στην συντριπτική πλειοψηφία των όγκων, καθώς και σε γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς, χωρίς η έκφραση του PRLR να σχετίζεται με την παρουσία ή όχι των ER και PR ή τον ιστολογικό τύπο του καρκινώματος (διηθητικό καρκίνωμα, *in situ*, πορογενές, πορογενές με λοβιδιακά χαρακτηριστικά, λοβιδιακό, λοβιδιακό με μυελοειδή χαρακτηριστικά, λοβιδιακό με πλακώδη χαρακτηριστικά, κολλοειδές, σωληνώδες) (Reynolds C et al. 1997). Σε μια άλλη μελέτη ανιχνεύτηκε το mRNA του PRLR σε 11 καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού, και στις 6 από τις 11 ήταν αυξημένο σε σχέση με φυσιολογικά κύτταρα μαστού (Pierce SK and Chen WY 2001). Επίσης με northern blot ανιχνεύτηκε η έκφραση του mRNA του PRLR σε κυτταρικές σειρές μαστού, καθώς και σε δείγματα ιστών από 186 ασθενείς με καρκίνο μαστού. Αυτή μάλιστα η μελέτη έδειξε πως η έκφρασή του PRLR σχετίζεται με την έκφραση του ER και PgR, ενώ άλλες μελέτες το αντικρούουν (Ormandy CJ et al. 1997).

Σε μια άλλη μελέτη, σε 29 ασθενείς με καρκίνο μαστού, ινοαδενώματα ή φυσιολογικό μαστό ανιχνεύτηκε με Q-PCR σε όλα τα δείγματα το mRNA του PRLR. Μάλιστα η έκφραση του υποδοχέα ήταν πάντοτε μεγαλύτερη στα κύτταρά του όγκου έναντι των γειτονικών υγιών κυττάρων. Η ίδια διαφορά εμφανιζόταν και όταν τα δείγματα εξετάστηκαν με ανοσοϊστοχημεία. Σε αυτή τη μελέτη δεν σχετίζεται την ύπαρξη του PRLR με αυτή της ύπαρξης ER ή PR (Touraine P et al. 1998).

Με *in situ* υβριδισμό ανιχνεύεται το mRNA του PRLR σε παρασκευάσματα προερχόμενα τόσο από κακοήθεις όγκους μαστού όσο και από καλοήθεις παθήσεις



(ινοαδένωμα, θήλωμα, αδένωση, επιθηλίωση, μαστίτιδα, γυναικομαστία), χωρίς η έκφραση να σχετίζεται ή να διαφέρει ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο της βλάβης (Mertani HC et al. 1998).

Υπάρχουν επίσης δεδομένα που σχετίζουν συγκεκριμένες μορφές του υποδοχέα με τον καρκίνο του μαστού. Μία μελέτη που ανιχνεύει διαφορές μορφές του υποδοχέα της PRL σε φυσιολογικό μαζικό αδένω, ινοκυστικές αλλοιώσεις η καρκίνο μαστού και καρκινικές κυτταρικές σειρές (T47D, MCF-7) παρατηρεί ότι με RT-PCR και Southern blot ανιχνεύεται η πλήρους μήκους μορφή του υποδοχέα σε όλα τα δείγματα, όμως η ακέραιη μορφή του υποδοχέα εκφράζεται σε μεγαλύτερη αναλογία έναντι της μορφής που απουσιάζει το εξωκυττάριο τμήμα στις περιπτώσεις των όγκων όπως και στις καρκινικές κυτταρικές σειρές (Laud K et al. 2000). Σε μια άλλη μελέτη, η ανάλυση των διαφόρων μορφών του PRLR έδειξε ότι η αναλογία βραχέων μορφών έναντι της μακράς μορφής ήταν μειωμένη σε κύτταρα όγκων μαστού έναντι των γειτονικών υγιών κυττάρων (Jianping Meng et al. 2004).

Π3.3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΛΑΚΤΙΝΗΣ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Οι αρχικές μελέτες ανίχνευσης της PRL σε καρκινικά κύτταρα του μαστού χρησιμοποιούσαν ανοσοϊστοχημικές μεθόδους με αντισώματα εναντίον της PRL. Οι μέθοδοι όμως αυτές αφενός δεν ήταν ιδιαίτερα ευαίσθητες, αφετέρου δε μπορούσαν να διακρίνουν την πρόσληψη της PRL από τα κύτταρα έναντι της τοπικής παραγωγής PRL. Αντίθετα η χρήση μοριακών τεχνικών επιτρέπει τη διάκριση της de novo σύνθεσης PRL από την πρόσληψη PRL, και η παρουσία του mRNA της PRL συνήθως υποδηλώνει την τοπική παραγωγή της ορμόνης (Fields K et al. 1993). Πράγματι η σύνθεση της PRL από τα καρκινικά κύτταρα του μαστού έχει επιβεβαιωθεί τόσο με τη μέθοδο RT-PCR και την ανάλυση κατά Southern, όσο και από το γεγονός ότι το θρεπτικό υλικό από καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων μαστού (T47Dco) προκαλεί αύξηση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Nb2, τα οποία είναι πολύ ευαίσθητα ως προς την επίδραση της PRL πάνω στην αύξησή τους (Ginsburg E and Vonderhaar BK 1995).

Επίσης η παραγωγή της PRL ανιχνεύεται με RT-PCR σε φυσιολογικό μαστό όσο και σε καρκινικά κύτταρα μαστού. Μάλιστα στην συγκεκριμένη μελέτη ανιχνεύεται 5 ως 10 φορές μεγαλύτερη παραγωγή PRL στα καρκινικά κύτταρα μαστού σε σχέση με τα μη



καρκινικά (Fields K et al. 1993). Με *in situ* υβριδισμό ανιχνεύεται επίσης η παραγωγή PRL από κύτταρα όγκων μαστού (Fields K et al. 1993).

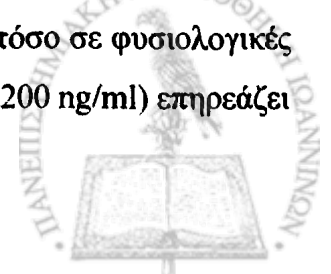
Η προσθήκη θρεπτικού υλικού από την καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων του μαστού T47Dco σε καλλιέργεια κυττάρων Nb2 λεμφώματος επίμυος προκαλεί αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του λεμφώματος, τα οποία είναι γνωστό ότι είναι πολύ ευαίσθητα στην επίδραση της PRL όσον αφορά την αύξηση τους. Μάλιστα η επίδραση αυτή αναιρείται όταν προστίθεται στο θρεπτικό υλικό αντισώματα κατά της PRL, όπως τα mAb390 και mAb631. Η ποσότητα της παραγόμενης από τα T47Dco προλακτίνης υπολογίζεται στο συγκεκριμένο πείραμα σε 14,5 pg PRL/κύτταρο. Η παραγωγή αυτή της PRL επιβεβαιώθηκε στο ίδιο πείραμα και με RT-PCR και ανάλυση κατά southern (Ginsburg E and Vonderhaar BK 1995).

III.4. ΜΙΤΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΛΑΚΤΙΝΗΣ

Στον φυσιολογικό μαζικό αδένα η PRL δρα ως απαραίτητο μιτογόνο για την λοβιοκυψελιδική ανάπτυξη και την λειτουργική διαφοροποίηση του αδένα, η δε απομάκρυνση της προκαλεί απόπτωσή και υποστροφή των κυψελίδων. Αυτό την καθιστά απαραίτητη για την ανάπτυξη και διατήρηση της μορφολογίας του μαζικού αδένα (Das Rina and Vonderhaar B 1997).

Έχει επίσης βρεθεί ότι η εξωγενής χορήγηση προλακτίνης ασκεί μιτογόνο δράση σε καρκινικούς ιστούς και καρκινικά κύτταρα μαστού *in vitro*. Τόσο ER(+) όσο και ER(-) καρκινικά κύτταρα μαστού πολλαπλασιάζονται μετά από την επίδραση της προλακτίνης. Υπό κατάλληλες συνθήκες χωρίς ορό ή με κεκαθαρισμένο με άνθρακα ορό (charcoal stripped serum, CSS) η προλακτίνη επάγει τον πολλαπλασιασμό των MCF-7 κυττάρων κατά 2,4 φορές έναντι του control σε διάστημα 3 ημερών, με τη δράση της να ξεκινά από τα 10 έως 50 ng/ml και να μεγιστοποιείται στα 100-250 ng/ml (Vonderhaar BK 1998, Vonderhaar BK 1999, Biswas R et al. 1987, Clevenger CV et al. 2003). Επίσης ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων του μαστού EFM-19 επάγεται κατά 60% έναντι του control υπό την επίδραση 50 ng/ml PRL (Freeman ME et al. 2000).

Σε μία μελέτη με κύτταρα από 17 όγκους μαστού φάνηκε με την μέθοδο σχηματισμού αποικιών σε μαλακό άγαρ (soft agar) ότι η βόειος προλακτίνη (o-PRL) τόσο σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις (20 ng/ml), όσο και σε φαρμακολογικές συγκεντρώσεις (200 ng/ml) επηρεάζει



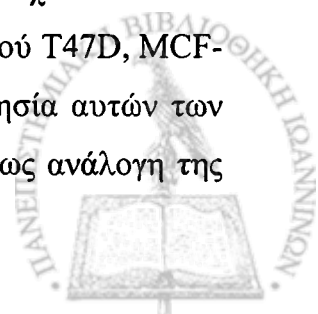
τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών, τόσο των ER(+) όσο και των ER(-), με μεγαλύτερη όμως δράση στα ER(+) (Manni A et al. 1986). Όγκοι προερχόμενοι από τα κύτταρα T47D αναπτύσσονται γρηγορότερα όταν ενοφθαλμιστούν σε γυμνούς ποντικούς εάν χορηγηθεί ταυτόχρονα και hPRL, ενώ θεραπεία με ανταγωνιστές της προλακτίνης αναστέλλει την ανάπτυξή τους (Ben-Jonathan N et al. 2002).

Η PRL επηρεάζει επίσης τα μόρια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Μόρια όπως η κυκλίνη D1 που ρυθμίζουν τη μετάβαση στην G1/S φάση του κυτταρικού κύκλου αυξάνονται μετά την επίδραση προλακτίνης. Το ίδιο συμβαίνει και για την κυκλίνη B1, και σε μικρότερο βαθμό για τις κυκλίνες A και E. Επίσης η προλακτίνη μειώνει την έκφραση του p21, όχι όμως και των p16 και p27. Όλα αυτά υποδηλώνουν την επίδραση της προλακτίνης στον κυτταρικό κύκλο. Η κυκλίνη D1 διαδραματίζει επίσης ρόλο στον καρκίνο του μαστού. Η υπερέκφρασή της σε διαγονιδιακά ποντίκια επάγει την ανάπτυξη όγκου μαστού, και η D1 υπερεκφράζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των ανθρώπινων όγκων. Θεωρείται επίσης ρυθμιστής στην v-Has-ras και την c-neu ογκογένεση, ενώ αντισώματα κατά της D1 εμποδίζουν τη δράση της προλακτίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Clevenger CV et al. 2003).

Η μιτογόνο δράση της προλακτίνης είναι επίσης εμφανής και από το γεγονός ότι αντισώματα εναντίον της προλακτίνης αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Συγκεκριμένα, τα αντισώματα κατά της προλακτίνης m631 και m290 αναστέλλουν κατά 86% και 68% αντίστοιχα την ανάπτυξη των κυττάρων T47Dco και κατά 20% και 71% αντίστοιχα την ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7.

Η υπερέκφραση του ογκογονιδίου Erb-2 είναι δυσμενής προγνωστικός παράγοντας για τον καρκίνο του μαστού. Σε δείγματα όγκων από ασθενείς με καρκίνο μαστών έχει βρεθεί ότι σε περιπτώσεις που υπερεκφραζόταν το Erb-2 είχαν υψηλότερο δείκτη πολλαπλασιασμού (proliferative index) και μεταστατική ικανότητα εάν παρήγαγαν και αυτοκρινή PRL. Επίσης η PRL βρέθηκε ότι προκαλεί φωσφορυλίωση της τυροσίνης του Erb-2 μέσω της Jak2, σύνδεση με το Grb2 και ενεργοποίηση της MAP κινάσης, και αντισώματα κατά της PRL αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού που εκφράζουν το Erb2 (Toshimasa Yamauchi et al. 2000).

Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η PRL σε δόσεις μέχρι 100 ng/ml δεν είχε στατιστικά σημαντική δράση στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού T47D, MCF-7 και Hs578T, όμως δρα ως παράγοντας επιβίωσής τους, καθώς η ευαισθησία αυτών των κυττάρων στην προκαλούμενη από το κεραμίδιο απόπτωση είναι αντιστρόφως ανάλογη της

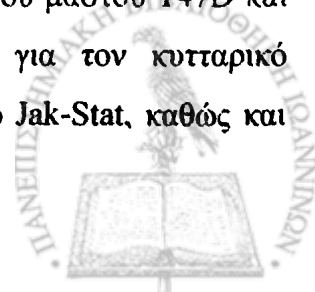


ενδογενούς παραγωγής PRL. Η εξωγενώς χορηγούμενη PRL προστατεύει επίσης από την απόπτωση, και η συγχορήγηση κεραμιδίου και αντισωμάτων κατά της PRL οδηγεί σε συνεργική αποπτωτική δράση (Perks CM et al. 2004).

Όλα τα παραπάνω (ύπαρξη υποδοχέων προλακτίνης στα κύτταρα του μαστού, έκκριση προλακτίνης από τα κύτταρα και δράση της, αναστολή της δράσης με αντισώματα εναντίον της PRL) οδηγούν στο συμπέρασμα μιας αυτοκρινούς και παρακρινούς δράσης της προλακτίνης στα κύτταρα του μαστού. Αυτή η δράση πέραν των καρκινικών εμφανίζεται και στα φυσιολογικά κύτταρα, και δεν μπορεί να χαρακτηριστεί αποκλειστικά και μόνο ως προκαρκινογόνος.

III.25. ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΜΙΤΟΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΛΑΚΤΙΝΗΣ

Η μιτογόνο δράση της PRL στον μαστό οδήγησε στην αναζήτηση μορίων που θα μπορούσαν να δράσουν ως ανταγωνιστές της PRL και να χρησιμοποιηθούν θεωρητικά στον καρκίνο του μαστού η και άλλους καρκίνους (π.χ. προστάτης), όπου η δράση της προλακτίνης είναι πλέον ανεπιθύμητη. Ως ανταγωνιστές της προλακτίνης ορίζονται κάποια ανάλογα της προλακτίνης που συνδέονται αλλά δεν ενεργοποιούν τον υποδοχέα της PRL. Μέχρι στιγμής 5 τέτοια μόρια έχουν αναφερθεί να ασκούν ανταγωνιστική δράση ως προς αυτή της προλακτίνης σε διάφορα συστήματα. Το G-120 R/K hGH (όπου η Arg ή η Lys αντικαθιστά αντίστοιχα της γλυκίνη στη θέση 120 της hGH), το G120R-hPL (Arg αντί της γλυκίνης στην θέση 120 του hPL), το G129R-hPRL (Arg αντί της γλυκίνης στην θέση 129 της hPRL, το S179D-hPRL (Asp αντί της Ser στη θέση 179), και το Δ1-9-G129R-hPRL (Arg αντί της γλυκίνης στην θέση 129 και απομάκρυνση των πρώτων 9 καταλοίπων από το N-τελικό άκρο του μορίου). Μελέτες έδειξαν ότι τα ανάλογα που βασίζονται δομικά στον hGH και το PL έχουν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών σειρών μαστού (Bole-Feysot C et al. 1998). Ο ανταγωνιστής hPRL-G129R αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων T47D, καθώς και τον επαγόμενο από την προλακτίνη πολλαπλασιασμό των ίδιων κυττάρων. Ως πιθανός μηχανισμός προτείνεται η πρόκληση απόπτωσης στα κύτταρα αυτά (Chen W et al. 1999). Ο G129R-hPRL ανταγωνιστής αναστέλλει τη δράση της προλακτίνης όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του μαστού T47D και T47Dco, καθώς και την ενεργοποίηση οδών που σηματοδοτούν για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (ενεργοποίηση των Stat5b, Stat 3 και Stat1 στην οδό Jak-Stat, καθώς και



των Erk 1 και Erk 2 στην οδό της MAP κινάσης), (Llovera M et al. 2000A). Ωστόσο συστήματα με μεγαλύτερη ευαισθησία έδειξαν ότι οι ανταγωνιστές αυτοί εμφανίζουν ορισμένες κοινές δράσεις με την προλακτίνη, και θεωρείται πλέον ότι ασκούν μια ήπια αγωνιστική δράση, η οποία όμως σε λιγότερο ευαίσθητα συστήματα δεν είναι εμφανής, με αποτέλεσμα σε αυτά τα συστήματα η δράση να παρουσιάζεται ως αμιγώς ανταγωνιστική. Ο μόνος ανταγωνιστής που μέχρι στιγμής δεν εμφανίζει δράση αγωνιστή σε καμία μελέτη είναι ο Δ1-9-G129R-hPRL.

Παρά τα *in vitro* πειραματικά δεδομένα ο ενδεχόμενος ρόλος των παραπάνω ανταγωνιστών και η εφαρμογή τους στην κλινική πράξη είναι ένα θέμα που μένει να διευκρινιστεί μελλοντικά (Goffin V et al. 2005).

III.6. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

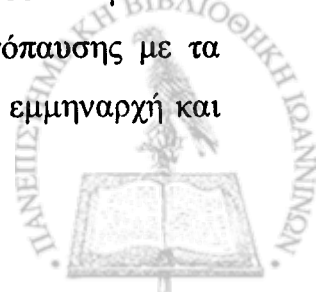
Τα επιδημιολογικά δεδομένα αφορούν τη σχέση μεταξύ των επιπέδων της PRL και της ύπαρξης παραγόντων κινδύνου για τη νόσο, τα στοιχεία από προοπτικές μελέτες και μελέτες ασθενών-μαρτύρων, καθώς και δεδομένα πάνω στη σχέση της PRL με την πρόγνωση της νόσου σε ήδη ασθενείς.

A. ΣΧΕΣΗ PRL ΜΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Υπάρχουν μελέτες που εκτιμούνε τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της PRL και γνωστών παραγόντων κινδύνου για την πρόκληση καρκίνου του μαστού, όπως:

Τεκνοποίηση και ηλικία του πρώτου τοκετού. Η τεκνοποίηση καθώς και η μικρή ηλικία κατά τον πρώτο τοκετό ασκούν μια προστατευτική δράση έναντι της ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Μετά την πρώτη κύηση παρατηρείται σε ορισμένες μελέτες μακροχρόνια μείωση των επιπέδων της προλακτίνης, που κυμαίνεται από 15 έως 50% στις διάφορες μελέτες, ενώ κάθε μετέπειτα κύηση φαίνεται να προκαλεί περαιτέρω μικρή μείωση των επιπέδων (Wennbo H et al. 1997).

Η ηλικία εμμηναρχής και εμμηνόπαυσης. Όσο μεγαλύτερη είναι η αναπαραγωγική ηλικία μιας γυναίκας, τόσο αυξάνει και ο κίνδυνος την για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Δεν έχουν αναφερθεί σχέσεις μεταξύ των ηλικιών εμμηναρχής και εμμηνόπαυσης με τα επίπεδα προλακτίνης. Όμως τα επίπεδα της προλακτίνης αυξάνουν κατά την εμμηναρχή και



μειώνονται μετά την εμμηνόπαυση, όπως και τα οιστρογόνα, επομένως η πρόωμη εμμηνарχή και η καθυστερημένη εμμηνόπαυση σχετίζονται με αυξημένη έκθεση κατά τη διάρκεια της ζωής στην προλακτίνη. Δεν έχει όμως αποδειχθεί κατά πόσο αυτά τα επίπεδα συνεισφέρουν στον κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου μαστού (Wennbo H et al. 1997).

Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού. Σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες οι περισσότερες μελέτες, αλλά όχι όλες, αναφέρουν ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα PRL κατά την ωχρινική φάση του κύκλου σε γυναίκες με θετικό οικογενειακό ιστορικό έναντι αυτών με ελεύθερο ιστορικό. Δεν βρέθηκαν τα ίδια αποτελέσματα σε εφήβους ή μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Όμως δεν έχει εκτιμηθεί η σχέση μεταξύ των επιπέδων της προλακτίνης και συγκεκριμένων γονιδιακών μεταλλάξεων, πχ BRCA 1 (Clevenger CV et al. 2003).

Μαστογραφική πυκνότητα. Η πυκνότητα του μαστού, ως περιοχές με σκιερότητα, αντανακλά περιοχές επιθηλιακού και στρωματικού ιστού στον μαστό. Υπάρχει ισχυρή θετική σχέση μεταξύ της πυκνότητας του μαστού και του κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου. Σε μελέτες φαίνεται θετική σχέση μεταξύ των επιπέδων της προλακτίνης και της πυκνότητας του μαστού, που υποδηλώνει πιθανώς την επίδραση της προλακτίνης στον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών ή και των στρωματικών κυττάρων (Clevenger CV et al. 2003).

Εθνολογικές διαφορές. Γενικά δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των γυναικών από χώρες υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (ΗΠΑ, Βρετανία) και αυτών από χώρες χαμηλού κινδύνου (Ιαπωνία, Κίνα) (Clevenger CV et al. 2003).

Διαιτητικές συνήθειες. Λίγοι διαιτητικοί παράγοντες σχετίζονται με πιθανώς αυξημένο κίνδυνο καρκίνου μαστού. Το αλκοόλ είναι ο πιο συσχετιζόμενος από αυτούς, δεν υπάρχει όμως σχέση μεταξύ κατανάλωσης αλκοόλ και επιπέδων προλακτίνης (Clevenger CV et al. 2003).

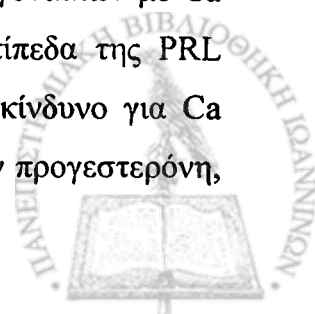
Σχέση φαρμάκων και κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Είναι γνωστό ότι μερικά φάρμακα αυξάνουν τα επίπεδα της προλακτίνης (πχ. αντισυλληπτικά, ρεσερπίνη, σιμετιδίνη, φαινοθειαζίνες), ενώ άλλα τη μειώνουν (πχ. levodopa). Σε αντίθεση με παλιότερες μελέτες, υπάρχουν αποδείξεις της σχέσης μεταξύ των επιπέδων της PRL και του καρκίνου μαστού καθώς και της σχέσης φαρμακολογικής ή τοξικολογικής αναστολής της ντοπαμίνης και καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο. Τα αντισυλληπτικά σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο, ενώ για την ρεσερπίνη δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα (βρέθηκε σχέση σε κάποιες μόνο μελέτες). Δεν ξέρουμε αν ο κίνδυνος από τα αντισυλληπτικά οφείλεται εν μέρει και στην άνοδο των επιπέδων της προλακτίνης που προκαλούν (Clevenger CV et al.

2003). Νεότερα δεδομένα ανατρέπουν την αρχική εντύπωση σχετικά με την χρήση αντιψυχωσικών φαρμάκων που δρουν ως ανταγωνιστές ντοπαμίνης και αυξάνουν τα επίπεδα της PRL, και του κινδύνου για Ca μαστού, καθώς οι αρχικές μελέτες ήταν περιορισμένες ή ανεπαρκείς. Τα νεότερα δεδομένα σχετίζουν τους ανταγωνιστές της ντοπαμίνης και την υπερπρολακτιναιμία που προκαλούν με τον καρκίνο του μαστού. Σε μια αναδρομική μελέτη κοόρτης (retrospective cohort study) 52.819 γυναικών που έλαβαν ανταγωνιστές της ντοπαμίνης (αντιψυχωσικά) και 55.289 που δεν έλαβαν βρέθηκε αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου μαστού κατά 16% στην πρώτη περίπτωση, με την σχέση να είναι επίσης δόσοεξαρτώμενη. Αυξημένος κίνδυνος υπήρχε επίσης και στην περίπτωση χρήσης αντιεμετικών που δρουν ως ανταγωνιστές της ντοπαμίνης.

Προλακτίνωμα και καρκίνος μαστού. Οι γυναίκες με προλακτινώματα έχουν αυξημένα επίπεδα PRL. Ωστόσο δεν υπάρχουν δεδομένα για τη σχέση προλακτινωμάτων και καρκίνου μαστού, αλλά μόνο σποραδικές αναφορές. Συνήθως η συχνή συνύπαρξη υπογοναδισμού έχει ως αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδα των οιστρογόνων και ανδρογόνων, πράγμα που ασκεί πιθανώς προστατευτική δράση εναντίον του καρκίνου του μαστού και ίσως εξισορροπεί το αποτέλεσμα των αυξημένων επιπέδων της προλακτίνης (Clevenger CV et al. 2003).

B. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ: ΔΕΙΚΤΟΥ-ΕΛΕΓΧΟΥ (CASE CONTROL) ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Γενικά, τα αποτελέσματα από τις μελέτες δείκτου-ελέγχου είναι μη επαρκή και αντικρουόμενα. Όσον αφορά τις προοπτικές μελέτες, υπάρχουν κάποιες με θετική συσχέτιση, όμως μη σημαντικά στατιστικά. Στην πιο μεγάλη όμως μελέτη, με 32.826 μέλη (nurse's health study cohort), εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των επιπέδων της προλακτίνης στο πλάσμα και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού, με σχετικό κίνδυνο $r.r.=2,03$ (1,24-3,31) μεταξύ γυναικών στο 25% των ανώτερων τιμών προλακτίνης και αυτών στο κατώτερο 25%. Ο κίνδυνος ήταν ανεξάρτητος από τα επίπεδα κυκλοφορούντων οιστρογόνων, ανδρογόνων, και τα επίπεδα IGF-1 (Hankinson SE et al. 1999). Σε μια ακόμη μεγάλη προοπτική μελέτη 851 μετεμμηνόπαυσιακών γυναικών με Ca μαστού, που συγκρίθηκαν με 1275 γυναίκες της ομάδας ελέγχου, τα επίπεδα της PRL (μετρούμενα πριν υπάρξει διάγνωση της νόσου) σχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο για Ca μαστού, κυρίως για όγκους με θετικούς υποδοχείς για τα οιστρογόνα και την προγεστερόνη,



χωρίς να υπάρχει σχέση με τα επίπεδα της οιστραδιόλης (P. W. Harvey 2005). Πρέπει ωστόσο να έχουμε υπόψη ότι υπάρχουν κάποια γενικά προβλήματα μεθοδολογίας στις μελέτες που εκτιμούν τα επίπεδα προλακτίνης και τα συσχετίζουν με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Για παράδειγμα, οι περισσότερες μελέτες λαμβάνουν μόνο ένα δείγμα αίματος για τον προσδιορισμό της προλακτίνης. Δεν γνωρίζουμε εάν αυτή η μεμονωμένη μέτρηση αντικατοπτρίζει τα μακροχρόνια επίπεδα της ορμόνης. Επίσης πρέπει το δείγμα να λαμβάνεται πάντα κατά την ίδια χρονική στιγμή λόγω του κιρκάδιου ρυθμού στην έκκριση της προλακτίνης. Επίσης δεν γνωρίζουμε εάν τα επίπεδα της PRL στον όρο αντικατοπτρίζουν τα επίπεδα στους ιστούς. Άλλο ένα πρόβλημα που υπάρχει στις μελέτες δείκτη-ελέγχου είναι ότι πολλοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων και των ψυχολογικών, επηρεάζουν την έκκριση της προλακτίνης, και επίσης τα επίπεδα μετά την διάγνωση της νόσου δεν αντικατοπτρίζουν πάντα τα επίπεδα πριν.

Γ. ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΡΟΛΑΚΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Μία μελέτη συσχετίζει τα υψηλά προεγχειρητικά επίπεδα με κακή πρόγνωση, ενώ μια άλλη με καλύτερη πρόγνωση. Αναφέρεται υπερπρολακτιναιμία σε ποσοστό 44% των γυναικών με μεταστατικό καρκίνο μαστού κατά την πορεία της νόσου (Vonderhaar BK 1998, Vonderhaar BK 1999). Επίσης τα βασικά επίπεδα της προλακτίνης στον ορό είναι αυξημένα σε μία υποομάδα γυναικών με αυξημένο κίνδυνο οικογενούς καρκίνου του μαστού. Σε μια άλλη μελέτη οι συγκεντρώσεις της PRL μεταξύ 46 γυναικών με Ca μαστού, 40 υγιών και 33 με άλλου τύπου Ca, έδειξε ότι οι ασθενείς με Ca μαστού είχαν υψηλότερη PRL από τις άλλες ομάδες, καθώς και ότι οι μεταστάσεις αναπτύχθηκαν σε όλες τις γυναίκες με υπερπρολακτιναιμία, ενώ στο 1/3 αυτών με φυσιολογικά επίπεδα δεν αναπτύχθηκαν. Έτσι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η υπερπρολακτιναιμία μπορούσε να αποτελέσει δείκτη της εξέλιξης της νόσου καθώς και δείκτη πτωχής πρόγνωσης (P. W. Harvey 2005).

Ο κιρκάδιος ρυθμός έκκρισης της προλακτίνης διαφέρει μεταξύ ομάδων υψηλού έναντι ομάδων χαμηλού κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Σε μία μελέτη η υπερπρολακτιναιμία σχετίζεται με αυξημένη επιθετικότητα του όγκου, πρόωρη υποτροπή ή μεταστάσεις και πτωχή πρόγνωση σε ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες. Σε αντίθεση, σε μία άλλη μελέτη η αύξηση της PRL που προκαλείται από την εγχείρηση σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση. Ωστόσο μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί καμία θετική συσχέτιση μεταξύ φαρμακευτικής μείωσης των επιπέδων της παραγόμενης από την υπόφυση PRL και

διαγνωστικών ή προγνωστικών παραγόντων στον καρκίνο του μαστού για τον άνθρωπο (Vonderhaar BK 1998, Vonderhaar BK 1999).

ΠΗ. ΣΧΕΣΗ ΠΡΟΛΑΚΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

ΠΗ1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η οργανογένεση και η εκκριτική δραστηριότητα που προστάσια αδένα βρίσκεται υπό τον έλεγχο διάφορων ορμονών, με τα ανδρογόνα να έχουν το κατ' εξοχήν ρόλο. Από την ορμονολογική επίδραση εξαρτάται επίσης η ανάπτυξη και η πορεία του καρκίνου του προστάτη, γεγονός στο οποίο στηρίζεται μέρος της θεραπευτικής αντιμετώπισης της πάθησης. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η πάθηση ελέγχεται στα αρχικά της στάδια με την αντιανδρογονική θεραπεία, ωστόσο από ένα σημείο και μετά οι όγκοι γίνονται μη ανδρογονοεξαρτώμενοι, γεγονός που υποδηλώνει το ρόλο και άλλων τροφικών παραγόντων στην αύξησή τους.

Το γεγονός ότι με την πάροδο της ηλικίας τα επίπεδα των ανδρογόνων μειώνονται σταδιακά, ενώ αντίθετα τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του προστάτη αυξάνονται, οδήγησε στην έρευνα για την ανεύρεση και άλλων παραγόντων πέραν των ανδρογόνων που διαδραματίζουν ενδεχομένως ρόλο στην παθογένεια και την πορεία της νόσου.

Ένας παράγοντας που έχει πολλαπλή δράση στον προστάτη είναι η προλακτίνη. Διαδραματίζει ρόλο στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων του, συμβάλλει σε διαδικασίες όπως η συγκέντρωση ψευδαργύρου και κιτρικού εντός του αδένα, ενώ υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν τον ενδεχόμενο ρόλο της σε καταστάσεις όπως η καλοήθης υπερτροφία και ο καρκίνος του προστάτη (Reiter E et al. 1999).

Μελέτες δείχνουν ότι ενώ με την πάροδο των ετών τα επίπεδα της τεστοστερόνης στον άνθρωπο μειώνονται σταδιακά, αυτά της PRL αυξάνονται, όπως αντιστοίχως αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας το ποσοστό εμφάνισης βλαβών όπως η υπερπλασία ή ο καρκίνος του προστάτη (Feldman HA et al. 2002). Ωστόσο, δεν παρατηρείται καμία συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της PRL στον ορό και του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη στον άνθρωπο σύμφωνα με τις περισσότερες προοπτικές ή δείκτου-ελέγχου επιδημιολογικές μελέτες (Stattin P et al. 2001).



Διάφορα πειραματικά δεδομένα πάνω στη πιθανή σχέση μεταξύ της προλακτίνης και της καρκινογένεσης στον προστάτη αδένα είναι τα παρακάτω:

ΠΗ2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ PRL ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

Με μεθόδους όπως η RT-PCR και το southern blot ανιχνεύεται η έκφραση του PRLR τόσο σε φυσιολογικά κύτταρα προστάτη όσο και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (LNCap, PC3, DU145, MDA-MB 468). Σε μια μελέτη ανευρίσκεται πολύ μικρότερη έκφραση στις καρκινικές κυτταρικές σειρές σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα. (Pierce SK and Chen WY 2001, Fabien Van Coppenolle et al. 2004). Επίσης με ανοσοϊστοχημεία και western blot ανιχνεύεται ο PRLR στον οπίσθιο και τον πλάγιο λοβό του προστάτη των επίμυων, η έκφραση του οποίου βρίσκεται ότι ρυθμίζεται από ορμόνες όπως η T, η E αλλά και η ίδια η PRL (Nevalainen MJ et al. 1996). Με in situ υβριδισμό ανιχνεύεται ο PRLR στον φυσιολογικό ανθρώπινο προστάτη, σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του από την εμβρυική μέχρι τη ενήλικη ζωή, καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η υπερπλασία και ο καρκίνος, και επίσης ανιχνεύεται και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές όπως η LNCap και η PC3. Η έκφραση το υποδοχέα εμφανίζεται αυξημένη σε δυσπλαστικές αλλοιώσεις ενώ σε υψηλού βαθμού αλλοιώσεις (high grade) υπάρχουν περιοχές όπου η έκφραση του υποδοχέα είναι μειωμένη. Η ανίχνευση του PRLR σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του προστάτη, από τον εμβρυικό μέχρι τον ενήλικο υποδηλώνει ενδεχομένως τον ρόλο της PRL στην ανάπτυξη και την διαφοροποίηση του οργάνου. Το γεγονός της αυξημένης έκφρασης του υποδοχέα στις δυσπλαστικές περιοχές μπορεί να υποδηλώνει κάποιο ρόλο της PRL στην καρκινογένεση του προστάτη, καθώς η δυσπλασία αποτελεί πρόδρομη του καρκίνου κατάσταση. Η μειωμένη τέλος έκφραση του υποδοχέα σε περιοχές των χαμηλών διαφοροποίησης καρκίνων ενδεχομένως αντικατοπτρίζει την ύπαρξη κυττάρων τα οποία κατά την πορεία της νόσου έγιναν σταδιακά ανεξάρτητα όσον αφορά την δράση της PRL σε αυτά (Leav I et al. 1999).

ΠΗ3. Η ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ PRL ΣΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

Όσον αφορά την δράση της PRL στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυτταρικών σειρών του προστάτη, υπάρχουν μελέτες σύμφωνα με τις οποίες η PRL ασκεί θετική δράση



στον πολλαπλασιασμό αυτών των κυτταρικών σειρών, ενώ άλλες μελέτες αμφισβητούν αυτή την δράση (Fabien Van Coppenolle et al. 2004, Untergasser G et al. 1999)

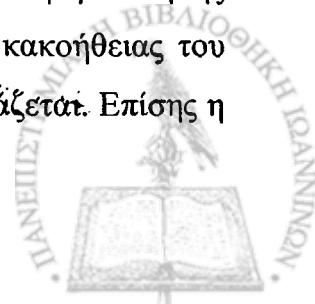
Σε μια άλλη μελέτη όπου ο PRLR ανιχνεύεται στις καρκινικές σειρές LNCap, PC3 και DU145, η PRL σε συγκεντρώσεις 0,1-100 ng/ml δεν φαίνεται να επιδρά στον πολλαπλασιασμό των παραπάνω κυττάρων, αλλά φαίνεται να εμποδίζει την προκαλούμενη από το TRAIL απόπτωση των PC3, και η φωσφορυλίωση των Akt/PKB προτείνεται ως μια πιθανή οδός μέσω της οποίας η PRL ασκεί αυτή την αντιαποπτωτική δράση (Wang AM et al. 1989).

Κύτταρα DU145 και PC3 που εκφράζουν την 23 kDa PRL δεν εμφανίζουν διαφορές στην ανάπτυξή τους έναντι των κυττάρων μαρτύρων, όμως όταν εκφράζουν την 16 kDa PRL η ανάπτυξή τους αναστέλλεται. Επίσης κύτταρα DU145 που εκφράζουν την 16 kDa PRL όταν ενοφθαλμιστούν σε ποντίκια αναπτύσσουν όγκους σε μικρότερη συχνότητα και μικρότερου μεγέθους έναντι των κυττάρων μαρτύρων. Το ίδιο αποτέλεσμα ισχύει και για τα κύτταρα PC3 (Jeri Kim et al. 2003). Η ανάπτυξη των DU145 στην καλλιέργεια αναστέλλεται επίσης από την προσθήκη του ανταγωνιστή της PRL S179D PRL (Xu X et al. 2001).

Τα κύτταρα DU145 όταν ενοφθαλμιστούν σε ποντίκια αναπτύσσουν όγκους, των οποίων το μέγεθος είναι αυξημένο όταν χορηγηθεί ταυτόχρονα και PRL, ενώ η χορήγηση του S179D PRL μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης, το ρυθμό ανάπτυξης και το μέγεθος αυτών των όγκων (Xu X et al. 2001). Σε ποντίκια που λείπει το γονίδιο της προλακτίνης (PRL knock-out mice), παρατηρείται μειωμένο βάρος στον κοιλιακό προστάτη (ventral prostate, VP) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, αποτέλεσμα που συμβαδίζει με το γεγονός ότι η προλακτίνη ενισχύει την δράση των ανδρογόνων στον προστάτη, πέρα από την καθεαυτή δράστης συγκεκριμένο όργανο. (Steger R. W. et al. 1998).

Η PRL προκαλεί αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του ανθρωπίνου προστάτη, με βάση μετρήσεις της σύνθεσης DNA με την μέθοδο της [³H] θυμιδίνης. Η ταυτόχρονη ανίχνευση με ανοσοϊστοχημεία και RT-PCR της σύνθεσης του PRLR και της PRL από τα ίδια κύτταρα, σε συνδυασμό με την δράση της σε αυτά, συνηγορούν υπέρ μιας αυτοκρινούς-παρακρινούς δράσης της ορμόνης στα κύτταρα αυτά (Nevalainen MT et al. 1997).

Μια πρόσφατη μελέτη συσχετίζει τη έκφραση της PRL με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου κατά Gleason (Gleason score), και όσο μεγαλύτερος ο βαθμός κακοήθειας του όγκου (όγκοι χαμηλής διαφοροποίησης), τόσο περισσότερη η PRL που εκφράζεται. Επίσης η



ενεργοποίηση του Stat 5 δρα ως παράγων επιβίωσης για τον προστάτη και ανιχνεύεται περισσότερο σε καρκίνους χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης (Hongzhen Li et al. 2004).

III.4. ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΠΡΟΛΑΚΤΙΝΑΙΜΙΑΣ *in vivo*

Κατά την πρόκληση υπερπρολακτιναιμίας με ενέσεις σουλπιρίδης σε επίμυες παρατηρείται μετά από 30 και 60 ημέρες αύξηση του πλάγιου λοβού του προστάτη (LP), με πρόκληση φλεγμονωδών αλλοιώσεων και υπερπλασίας, κυρίως αδενώδους και σε μικρότερο βαθμό ινομυϊκής. Η δράση αυτή της υπερπρολακτιναιμίας απαιτεί την παρουσία ανδρογόνων και πιθανώς να οφείλεται στην αναστολή της απόπτωσης, καθώς ανιχνεύεται υπερέκφραση του αντιαποπτωτικού γονιδίου Bcl-2 (Fabien Van Coppenolle et al. 2001).

Η δράση της υπερπρολακτιναιμίας έχει μελετηθεί επίσης σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν το γονίδιο της PRL. Διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν το Mt-rPRL γονίδιο εμφανίζουν σημαντική αύξηση του προστάτη αδένου, που οφείλεται τόσο σε αυξημένη έκκριση όσο και σε υπερπλασία όλων των λοβών του αδένου, και μέσω RT-PCR επιβεβαιώθηκε στα ποντίκια αυτά η έκφραση τόσο της PRL όσο και του PRLR (Wennbo H et al. 1997).

Διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν το Pb-rPRL γονίδιο εμφάνιζαν σημαντική αύξηση του προστάτη αδένου, που χαρακτηρίζεται κυρίως από υπερπλασία του στρώματος σε όλους τους λοβούς, διατεταμένους πόρους και εστίες αδενώδους δυσπλασίας. Επίσης εμφανίζεται αύξηση των ER στο στρώμα και αύξηση των AR στο επιθήλιο. Η αύξηση το στρώματος που παρατηρήθηκε είναι μια κατάσταση που ομοιάζει με την καλοήγη υπερπλασία του προστάτη (BPH) στους ανθρώπους. Οι περιοχές δυσπλασίας παρουσιάζουν χαρακτήρες χαμηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (low grade PIN). Τα συγκεκριμένα διαγονιδιακά ποντίκια δεν εμφανίζουν αύξηση των επιπέδων της τεστοστερόνης στον ορό, ούτε παθολογικά επίπεδα προλακτίνης στον ορό, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι μεταβολές που παρατηρούνται οφείλονται στην τοπική μόνο δράση της τοπικά παραγόμενης PRL με αυτοκρινή-παρακρινή τρόπο (Kindblom J et al. 2003). Στα Pb-PRL διαγονιδιακά ποντίκια παρατηρείται μειωμένη αποπτωτική δραστηριότητα και αύξηση της δραστηριότητας γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την αναδόμηση των ιστών (tissue remodeling). Γενικά ανιχνεύονται ομοιότητες στην έκφραση γονιδίων μεταξύ των PRL-διαγονιδιακών ποντικών και



παθολογικών καταστάσεων στον άνθρωπο, όπως είναι η BPH και ο καρκίνος (Karin Dillner et al. 2003).

Η μελέτη φαινοτύπων σε ποντίκια που έλειπε ο PRLR έδειξε ότι τα συγκεκριμένα πειραματόζωα είχαν αυξημένο μέγεθος του προστάτη αδένα χωρίς όμως μεταβολή της μορφολογίας του, καθώς και ότι η καρκινογένεση που προκαλείται στον προστάτη από τον ιό των πιθήκων 40 (simian virus, SV40) ήταν μειωμένη, όπως και τα ποσοστά PIN στον κοιλιακό λόβό. Άλλο ένα αποτέλεσμα του PRLR^{-/-} ήταν η μειωμένη γονιμότητα (Robertson Fiona G. et al. 2003).

Μια μικρή μελέτη σχετικά με την χρήση ταμοξιφαίνης σε ασθενείς με ορμονικά ανθιστάμενο καρκίνο του προστάτη έδειξε ότι ασθενείς με αυξημένα επίπεδα PRL ανταποκρίθηκαν σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με αυτούς με φυσιολογικά επίπεδα, καθώς επίσης και ότι η μείωση των επιπέδων της PRL ήταν σημαντικότερη στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία έναντι αυτών που δεν ανταποκρίθηκαν. Ωστόσο ο μικρός αριθμός ασθενών της μελέτης δεν επιτρέπει ασφαλή συμπεράσματα για το εάν η μείωση της PRL οφείλεται στην δράση της ταμοξιφαίνης στην έκκριση της ή είναι το αποτέλεσμα μειωμένης έκκρισης από τα καρκινικά κύτταρα (Lissoni P et al. 2005).

Μια άλλη υπόθεση υποστηρίζει ότι εφόσον η αντιανδρογονική θεραπεία προκαλεί υπερπρολακτιναιμία σε έναν σημαντικό αριθμό ασθενών, πιθανώς το τροφικό ερέθισμα της υπερπρολακτιναιμίας επιτρέπει σε κάποια κύτταρα να επιβιώνουν και να συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται παρά την έλλειψη των ανδρογόνων. Αυτά τα κύτταρα, αποκτούν στην πορεία τις μεταλλάξεις εκείνες που τους επιτρέπουν να μεθίστανται και να αναπτυχθούν σε απομακρυσμένες θέσεις. Αυτός θα μπορούσε να είναι ένας θεωρητικός μηχανισμός που εξηγεί γιατί τα προεγχειρητικά επίπεδα της PRL δεν έχουν προγνωστική αξία, αλλά τα μετεγχειρητικά είναι προγνωστικά (Robertson Fiona G. et al. 2003).



IV. Ν-ΑΚΕΤΥΛ-ΚΥΣΤΕΙΝΗ (NAC)

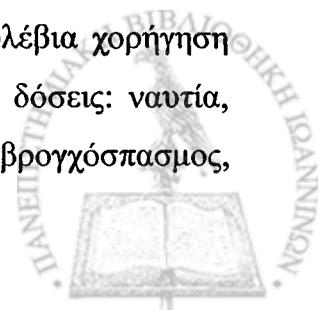
IVΑ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Ν-ακετυλ-κυστεΐνη (NAC) αποτελεί την ακετυλιωμένη μορφή του αμινοξέος L-κυστεΐνη. Είναι μια θειόλη με μοριακό τύπο $C_5H_9NO_3S$ και $MB=163,2$. Έχει αρχικά χρησιμοποιηθεί ως βλεννολυτικός παράγοντας σε διάφορες αναπνευστικές παθήσεις. Ωστόσο, το γεγονός ότι αποτελεί πρόδρομη ουσία της γλουταθειόνης, σε συνδυασμό με τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες οδήγησε στην μελέτη της δράσης της NAC πάνω σε πολλές παθήσεις στις οποίες το οξειδωτικό στρες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, όπως είναι για παράδειγμα το σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, η HIV λοίμωξη, το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας, αυτοάνοσες παθήσεις αλλά και ο καρκίνος.

Φαρμακοκινητική: Η NAC χορηγούμενη από το στόμα απορροφάται ταχέως, και υφίσταται εκτεταμένο μεταβολισμό κατά την πρώτη δίοδο από τα κύτταρα του λεπτού εντέρου και το ήπαρ, με αποτέλεσμα την ενσωμάτωσή της στις πεπτιδικές αλυσίδες πρωτεϊνών και την δημιουργία πολλών μεταβολιτών. Μικρό μόνο ποσοστό ακέραιας NAC φτάνει στο πλάσμα και τους ιστούς, καθώς η βιοδιαθεσιμότητά της είναι μεταξύ 4-10%. Τα μέγιστα επίπεδα στο πλάσμα ανιχνεύονται περίπου 1h μετά την χορήγηση από το στόμα. Ο χρόνος ημιζωής στο πλάσμα είναι περίπου 2,15h και σε 10-12h μετά τη χορήγηση είναι μη ανιχνεύσιμη. Η κυστεΐνη όπως και η γλουταθειόνη είναι κάποιοι από τους μεταβολίτες της, στους οποίους οφείλονται πολλές από τις δράσεις της (Kelly G S. 1998).

Τοξικότητα της NAC και ανεπιθύμητες ενέργειες: Η NAC είναι ένα γενικά ασφαλές φάρμακο. Μελέτες σε πειραματόζωα υπολόγισαν την LD50 της χορηγούμενης από το στόματος NAC να είναι >10 g/kg ΣΒ σε μύες και επίμυες. Μετά την ενδοφλέβια χορήγηση είναι αντίστοιχα 4,6 g/kg στους μύες και 2,8 g/kg στους επίμυες (Silvio De Flora et al. 2001A). Επίσης μελέτες σε πειραματόζωα δεν έδειξαν παρενέργειες σε δόσεις 250 mg/kg, ούτε τερατογόνο δράση σε δόσεις 2000 mg/kg.

Στον άνθρωπο έχει χορηγηθεί ασφαλώς κατά την κύηση, σύμφωνα με αναφορές και μελέτες περιστατικών μετά από υπερδοσολογία ακεταμινοφαΐνης. Η ενδοφλέβια χορήγηση σπάνια προκαλεί αλλεργικές αντιδράσεις. Άλλες παρενέργειες σε μεγάλες δόσεις: ναυτία, έμετος, γαστρεντερικές διαταραχές, εξάνθημα, κνησμός, αγγειοοίδημα, βρογχόσπασμος,



ταχυκαρδία, υπόταση ή και υπέρταση. Σε χρόνια ηπατική βλάβη αυξάνονται τα επίπεδα του φαρμάκου στο πλάσμα.

Μετά από μελέτη σε υγιείς εθελοντές βρέθηκε ότι σε δόσεις έως 1,2 g/d μπορεί να δρα ως προ-οξειδωτικό, να μειώνει τα επίπεδα της GSH και να αυξάνει την οξειδωμένη GSH. Δεν συνίσταται λοιπόν η χορήγησή της σε υγιείς που δεν έχουν αυξημένο οξειδωτικό στρες (Kelly G S. 1998).

Μηχανισμός δράσης: Η δραστηριότητα της NAC αποδίδεται πρωτίστως στην ικανότητά της να ανάγει την εξωκυττάρια κυστίνη σε κυστεΐνη, και να δρα ενδοκυττάρια ως πηγή σουλφυδρυλικών ενώσεων (πηγή -SH μεταβολιτών) (Kelly G S. 1998). Ως πηγή σουλφυδρυλικών ομάδων, η NAC επάγει την ενδοκυττάρια σύνθεση της GSH, ενισχύει την δράση της γλουταθειόνης-S-τρανσφεράσης, επάγει την αποτοξίκωση στο ήπαρ αναστέλλοντας το βιομετασχηματισμό των ξеноβιοτικών και είναι ισχυρή πυρηνόφιλη (nucleophile) ουσία, ικανή να εκκαθαρίσει ελεύθερες ρίζες, καθώς δρα απευθείας στις δραστικές ρίζες του οξυγόνου. Επίσης δρα ως παράγοντας που προφυλάσσει έναντι της ακτινοβολίας Kelly G S. 1998).

Επίσης η NAC διεγείρει την δράση κυτταροπλασματικών ενζύμων που εμπλέκονται στην αναγωγή της NADPH, την αναγωγή της GSH και την αναγωγική αποτοξίκωση των ξеноβιοτικών (Kelly G S. 1998).

Η NAC ως πρόδρομος της γλουταθειόνης: Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλ-κυστεΐνυλ-γλυκίνη, GSH) είναι η πιο άφθονη χαμηλού μοριακού βάρους θειόλη στα κύτταρα και αποτελεί το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό και εκκαθαριστή στον οργανισμό. Το μεγαλύτερο ποσοστό της (85-90%) βρίσκεται στο κυτταροδιάλυμα, ενώ το υπόλοιπο σε διάφορα οργανύλια. Η εξωκυττάρια συγκέντρωσή της είναι χαμηλή, με εξαίρεση την χολή που περιέχει μεγάλες συγκεντρώσεις (Guoyao Wu et al. 2004). Η GSH οξειδώνεται σε δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG). Η οξείδωση της GSH σε GSSG γίνεται είτε με απευθείας αλληλεπίδραση με ελεύθερες ρίζες, ή πιο συχνά, όταν η GSH δρα ως συμπάροντας για αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως οι υπεροξειδάσες της GSH κατά την αναγωγή του H_2O_2 . Επομένως η GSH εμφανίζεται ως μονομερές ή διμερές, όπου το μονομερές (GSH) αποτελεί την ανηγμένη μορφή ενώ το διμερές (GSSG) την οξειδωμένη (Guoyao Wu et al. 2004). Ο λόγος [GSH]:[GSSG] χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου (cellular redox state), και είναι >10 σε φυσιολογικές συνθήκες (Guoyao Wu et al. 2004). Η σύνθεση της GSH από το γλουταμινικό, την κυστεΐνη και την γλυκίνη καταλύεται από δύο ένζυμα του κυτταροδιαλύματος, την γ-

γλουταμυλ-κυστεΐνη συνθετάση (GCS) και την συνθετάση της GSH (Guoyao Wu et al. 2004).

Η κυστεΐνη οξειδώνεται σε κυστίνη στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Τόσο η κυστίνη όσο και η κυστεΐνη μεταφέρονται με μηχανισμούς μεταφοράς στο εσωτερικό του κυττάρου, όπου η κυστίνη ανάγεται σε κυστεΐνη (Guoyao Wu et al. 2004).

Το γλουταμινικό ανταγωνίζεται την κυστίνη για τον ίδιο μεταφορέα. Έτσι σε καταστάσεις με αυξημένο εξωκυττάριο γλουταμινικό (π.χ. προχωρημένος καρκίνος, HIV λοίμωξη) αναστέλλεται η πρόσληψη της κυστίνης εξαιτίας του γλουταμινικού, με αποτέλεσμα την μειωμένη σύνθεση της GSH (Guoyao Wu et al. 2004).

Η κυστεΐνη είναι το αμινοξύ που περιορίζει και καθορίζει το ρυθμό στην σύνθεση της GSH στα κύτταρα, και παράγοντες που αυξάνουν την πρόσληψη κυστεΐνης από τα κύτταρα, (πχ ινσουλίνη, αυξητικοί παράγοντες), αυξάνουν την σύνθεση της GSH. Ομοίως, η αυξημένη πρόσληψη ουσιών πρόδρομων της κυστεΐνης, όπως η NAC αυξάνουν την σύνθεση της GSH και προλαμβάνουν την πτώση των επιπέδων της που συμβαίνει σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως το AIDS (Guoyao Wu et al. 2004).

IVB. ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ NAC ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

1) ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ

Η NAC χρησιμοποιείται ως βλεννολυτικό, καθώς οι σουλφυδρυλικές ομάδες της αντιδρούν με δισουλφιδικούς δεσμούς της βλεννοπρωτεΐνης, διασπώντας την σε μικρότερα, λιγότερο κολλώδη σωματίδια. Επίσης η NAC δρα ως αποχρεμπτικό διεγείροντας την δράση των κροσσών και το γαστροπνευμονικό αντανακλαστικό του πνευμονογαστρικού, βοηθώντας και έτσι στην απομάκρυνση της βλέννης από τους αεραγωγούς. Στην χρόνια βρογχίτιδα η παρατεταμένη θεραπεία με NAC μειώνει τις εξάρσεις και βελτιώνει τα συμπτώματα, χωρίς σημαντική αύξηση των παρενεργειών. Σε μια μελέτη η NAC βρέθηκε να μειώνει την συχνότητα των επανεισαγωγών στο νοσοκομείο, ενώ μια άλλη μελέτη σε ασθενείς με χρόνια βρογχίτιδα, σοβαρή απόφραξη των αεραγωγών και κυστική ίνωση έδειξε ότι υπήρξε μικρή αλλά όχι στατιστικά σημαντική μείωση των εξάρσεων της νόσου (Kelly G S. 1998). Επίσης



πειραματικά έχει δράση στο σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας, χωρίς όμως να έχει βρεθεί επιβεβαιωμένο κλινικό όφελος (Kelly G S. 1998, Mirja-Liisa Aitio 2005).

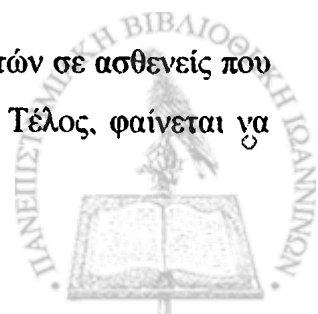
2) HIV ΛΟΙΜΩΞΗ

Οι ασθενείς με HIV έχουν χαμηλά επίπεδα GSH και κυστεΐνης και βρίσκονται σε χρόνιο οξειδωτικό στρες. Επίσης έχουν αυξημένη απώλεια ισοδύναμου του θεικού άλατος (sulphate equivalent), αντίστοιχο με ποσό 4 g κυστεΐνης/d. Υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ έλλειψης GSH και μειωμένης επιβίωσης στο AIDS. Σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα GSH στα CD4 T- κύτταρα στην αρχική φάση της νόσου η τριετής επιβίωση είναι 60-80%, ενώ σε αυτούς με χαμηλά μόνο 20%. Η NAC αυξάνει τα επίπεδα της GSH στα T-κύτταρα. Είναι βέβαια άγνωστο κατά πόσο η NAC συμβάλλει στην αύξηση της προσδοκώμενης επιβίωσης, καθώς στην σημερινή εποχή της αντιρετροϊκής θεραπείας η χορήγηση NAC ως μονοθεραπείας δεν μπορεί να εφαρμοστεί και να αξιολογηθεί, και μόνο ως συμπληρωματική θεραπεία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί (Mirja-Liisa Aitio 2005). Ερευνητικές μελέτες έδειξαν ότι η NAC μπορεί αν αυξήσει την ανοσία των T κυττάρων, διεγείροντας τον σχηματισμό αποικιών από αυτά και μπλοκάροντας την έκφραση του NFκB. Σε μια διπλή-τυφλή μελέτη η NAC επιδρά θετικά τόσο στα επίπεδα κυστεΐνης στο πλάσμα όσο και στον αριθμό των CD4+ λεμφοκυττάρων. Επίσης, ίσως η NAC μετριάξει την βαρύτητα των επεισοδίων γρίπης και ίσως είναι αποτελεσματική στην σοβαρή ελονοσία (Mirja-Liisa Aitio 2005).

3) ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΗ ΑΠΟ ΑΚΕΤΑΜΙΝΟΦΑΙΝΗ ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Η πιο ευρέως αποδεκτή χρήση της NAC είναι η χρήση της ως αντίδοτο για την δηλητηρίαση από ακεταμινοφαίνη, όπου αποτελεί δεδομένη πρακτική. Η τοξικότητα της ακεταμινοφαίνης οφείλεται σε έναν μεταβολίτη της που ελαττώνει την GSH στα ηπατοκύτταρα και προκαλεί ηπατοκυτταρική βλάβη και θάνατο. Η NAC χορηγούμενη ενδοφλεβίως εντός των πρώτων 48h (και κυρίως τις πρώτες 8-10h) προστατεύει από την ηπατοτοξικότητα. Είναι επίσης δραστική σε δηλητηριάσεις από βαρέα μέταλλα και άλλες ουσίες, όπου δρα ως χηλικός παράγοντας, σύμφωνα με μελέτες σε πειραματόζωα ή μεμονωμένες αναφορές περιστατικών (Kelly G S. 1998).

Επίσης ίσως προστατεύει από την καταστολή του μυελού των οστών σε ασθενείς που λαμβάνουν χρυσό για την αντιμετώπιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Τέλος, φαίνεται να



είναι ωφέλιμη στην ηπατική βλάβη που προκαλείται μετά από δηλητηρίαση με μανιτάρια *Amanita Phalloides* (Mirja-Liisa Aitio 2005).

4) ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ

Η χρήση της NAC ενδέχεται να είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση καρδιακών παθήσεων καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι η NAC μειώνει τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης του πλάσματος και μειώνει τα επίπεδα της λιποπρωτεΐνης α κατά 70%. Επειδή αυξάνει τα επίπεδα της GSH των ιστών, ίσως να είναι χρήσιμη στην θεραπεία της βλάβης που προκαλείται κατά την ισχαιμία και την επαναιμάτωση, γιατί η ισχαιμία προκαλεί μείωση των ενδοκυττάρων – SH και GSH, και η επαναιμάτωση μπορεί αν οδηγήσει σε οξειδωτική βλάβη. Η συγχρόνηση NAC έχει βρεθεί να συμβάλει σε καλύτερη διατήρηση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Επίσης φαίνεται να ενισχύει την αγγειοδιασταλτική δράση του NO και αν έχει αντιαιμοπεταλιακή δράση (Kelly G S. 1998). Συγχρόνηση νιτρογλυκερίνης και NAC βελτιώνει την θεραπεία της ασταθούς στηθάγχης, αυξάνει όμως και τις παρενέργειες (Kelly G S. 1998). Συνολικά πάντως τα αποτελέσματα από την χρήση της NAC σε διάφορες καρδιολογικές παθήσεις δεν είναι τόσο θεαματικά όσο είχε αρχικά εκτιμηθεί. (Mirja-Liisa Aitio 2005).

Όσον αφορά την καρδιοχειρουργική, μικρές μελέτες δείχνουν ενδεχόμενα καλά αποτελέσματα στην καρδιοπνευμονική παράκαμψη. Η NAC ενδεχομένως να είναι ωφέλιμη για ορισμένους μηχανισμούς (π.χ. ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από ισχαιμία-επαναιμάτωση), ενώ για ορισμένους άλλους, όπως π.χ. λοίμωξη, μπορεί αν είναι επιζήμια.

5) ΝΕΦΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Η NAC εμφανίζεται σε πολλές μελέτες ως χρήσιμη έναντι της νεφροπάθειας που προκαλείται από τα σκιαγραφικά, και σε ορισμένες μελέτες φαίνεται να μειώνει την διάρκεια της νοσηλείας λόγω νεφροτοξικότητας. Υπάρχουν όμως και μελέτες που αμφισβητούν την όποια ωφέλεια (Maureen T et al. 2004). Επίσης χορηγούμενη ενδοφλεβίως κατά την αιμοδιύλιση βελτιώνει τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης, και ίσως είναι χρήσιμη στην αντιμετώπιση του ηπατονεφρικού συνδρόμου (Mirja-Liisa Aitio 2005, Maureen T et al. 2004).



6) ΑΛΛΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ

Η χρήση της NAC μπορεί να είναι ενδεχομένως ωφέλιμη σε παθήσεις όπως το σύνδρομο Sjogren, η μυοκλονική επιληψία, η γρίπη, η ηπατίτιδα C. Στο σύνδρομο Sjogren μπορεί να επιφέρει βελτίωση των οφθαλμικών συμπτωμάτων όπως η ξηρότητα, η ευερεθιστότητα, και συμπτωμάτων όπως η ξηρότητα του στόματος και η δύσοσμη απόπνοια (Kelly G S. 1998).

IVΓ. ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ NAC ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Η NAC έχει αυξητικές δράσεις για διάφορα είδη κυττάρων και σε πολλά συστήματα εμποδίζει την απόπτωση. Για παράδειγμα, η απόπτωση των κυττάρων ωοθήκης των Chinese hamster που προκαλείται από το sodium butyrate αναστέλλεται από την NAC. Το ίδιο ισχύει και για την απόπτωση στα Β-κύτταρα. Σε απουσία NGF οι νευρώνες υφίστανται απόπτωση που αναστέλλεται από την NAC. Εμποδίζει επίσης την απόπτωση που προκαλείται από τον καπνό του τσιγάρου, και γενικά η μελέτη πολλών παραγόντων που προκαλούν απόπτωση έδειξε ότι η NAC στην πλειοψηφία των περιπτώσεων την αναστέλλει. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που συμβαίνει το αντίθετο, όπως π.χ. στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων (Zafarullah M et al. 2003).

Επίσης επάγει απόπτωση σε πολλά κακοήθως εξαλλαγμένα κύτταρα, αλλά όχι στα φυσιολογικά (Silvio De Flora et al. 2001A). Σε άλλα πειράματα η NAC προκαλεί απόπτωση μέσω της επαγωγής της έκφρασης του p53 (Ming Liu et al. 1998). Πιθανώς σε μειωμένες δόσεις η NAC να επάγει την ανάπτυξη των κυττάρων, ενώ σε μεγαλύτερες να επάγει απόπτωση (Zafarullah M et al. 2003).

Πέραν του μηχανισμού της απόπτωσης η NAC επιδρά και πάνω στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό κύκλο. Για παράδειγμα, αναστέλλει τα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος στην G1 φάση, και αυξάνει το p21 (Zafarullah M et al. 2003). Επίσης επάγει τα p16, p21 και επιμηκώνει την μετάβαση από την G1 φάση σε διάφορα κυτταρικά συστήματα, ανεξαρτήτως της έκφρασης του p53, με έναν μηχανισμό που είναι ανεξάρτητος της GSH (Silvio De Flora et al. 2001A, Ming Liu et al. 1999).



IVΔ) ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ NAC ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

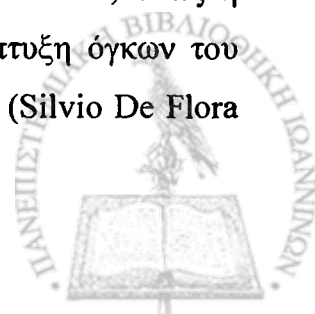
IVΔ1) ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Η NAC έχει πολλούς μηχανισμούς και προστατευτικές δράσεις έναντι της βλάβης του DNA και της καρκινογένεσης, οι οποίοι σχετίζονται με την πυρηνοφιλία (nucleophilicity), την αντιοξειδωτική δράση, την ρύθμιση του μεταβολισμού, την δράση στα μιτοχόνδρια, την τροποποίηση του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA, τη μείωση της βιολογικής δράσης των καρκινογόνων, την αναστολή της γονοτοξικότητας και της εξαλλαγής των κυττάρων, την τροποποίηση της έκφρασης γονιδίων και διαφόρων οδών μεταβίβασης του σήματος, τη ρύθμιση της επιβίωσης των κυττάρων και της απόπτωσης, την αντιφλεγμονώδη δράση, την αντιαγγειογενετική δράση, την αναστολή της διήθησης και της μετάστασης, την επίδραση στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, την αναστολή των προκαρκινικών και καρκινικών βλαβών, την προστασία έναντι των ανεπιθύμητων ενεργειών άλλων χημειοπροστατευτικών παραγόντων (Silvio De Flora et al. 2001A).

Πιο αναλυτικά οι δράσεις αυτές μπορούν να χωριστούν στις εξής κατηγορίες:

ι) προστατευτική δράση έναντι καρκινογόνων παραγόντων

In vitro μελέτες έδειξαν ότι η NAC έχει απευθείας αντιμεταλλαξιογόνο δράση και αντικαρκινογόνες ιδιότητες, ενώ αναστέλλει και την μεταλλαξιογόνο και καρκινογόνο δράση ορισμένων ουσιών in vivo (Kelly G S. 1998). Πειράματα σε πειραματόζωα που εκτέθηκαν σε καπνό τσιγάρου έδειξαν ότι η NAC αναστέλλει την δημιουργία συνδέσεων με ομοιοπολικούς δεσμούς στο DNA (DNA adducts) που προκαλεί ο καπνός, και εμποδίζει την κυτταρογενετική βλάβη που προκαλεί ο καπνός σε διάφορα είδη κυττάρων των τρωκτικών, όπως π.χ. τα μακροφάγα των πνευμονικών κυψελίδων, τα ερυθροκύτταρα στον μυελό των οστών ή και στο περιφερικό αίμα. Επίσης μειώνει την μεταλλαξιογόνο ικανότητα των ROS και την δραστικότητα μεταλλαξιογόνων συστατικών που βρίσκονται στον καπνό, όπως η φορμαλδεΰδη, και οι μεταβολίτες της ουρεθάνης, και μειώνει την ανάπτυξη όγκων του πνεύμονα και άλλων οργάνων μετά την επίδραση διαφόρων καρκινογόνων (Silvio De Flora et al. 2001A).



Η NAC επάγει τα ένζυμα αποτοξίκωσης της μεταβολικής φάσης II και η επιδιόρθωση των βλαβών του DNA κατόπιν ακτινοβολίας και διαφόρων καρκινογόνων επάγεται από θειόλες όπως η NAC και η GSH (Goran Bjelakovic et al. 2004, Silvio De Flora et al. 2001A). Δρώντας συνεργικά με το ασκορβικό οξύ μειώνει την ικανότητα της ουρεθάνης στην δημιουργία όγκων του πνεύμονα στα ποντίκια. (Silvio De Flora et al. 2001B, Zafarullah M et al. 2003). Επίσης αναστέλλει την επαγόμενη από τον καπνό έκφραση των πρώιμων γονιδίων όπως το c-fos, το οποίο εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (Silvio De Flora et al. 2001A).

ii) δράση στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων

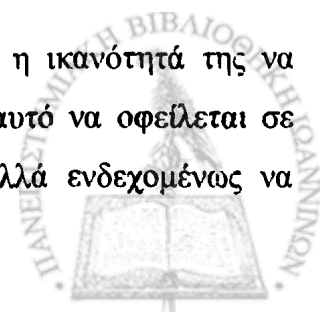
Η NAC αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και την ανάπτυξη διαφόρων όγκων σε πειραματικό επίπεδο. In vitro αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ανθρωπίνου μελανώματος, του προστάτη και του αστροκυτώματος. In vivo μειώνει την ανάπτυξη των πρωτοπαθών όγκων (μελάνωμα, καρκίνωμα πνεύμονα), αυξάνει την λανθάνουσα περίοδο των όγκων και μειώνει τον σχηματισμό αυτόματων μεταστάσεων, ενώ δρα συνεργικά με την δοξορουβικίνη στη μείωση του μεγέθους και της συχνότητας εμφάνισης όγκων και μεταστάσεων στα ποντίκια (Silvio De Flora et al. 2001B). Η NAC μειώνει την συχνότητα υποτροπής των αδενωματωδών πολυπόδων του παχέος εντέρου, και σε ασθενείς με πολύποδες μειώνει τον δείκτη πολλαπλασιασμού τους (proliferative index), ο οποίος είναι προγνωστικός βιολογικός δείκτης για αύξηση του καρκίνου του παχέος εντέρου (Zafarullah M et al. 2003, Silvio De Flora et al. 2001A).

iii) κυτταροπροστατευτικές δράσεις

Η NAC εμφανίζει κυτταροπροστατευτικές ιδιότητες, καθώς τόσο σε κυτταροκαλλιέργειες όσο και σε μελέτες με πειραματόζωα προστατεύει τα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά όχι τα καρκινικά, από την τοξικότητα της χημειοθεραπείας και της ακτινοθεραπείας, και μειώνει την καρδιοτοξικότητα της δοξορουβικίνης σε ποντίκια (Kelly G S. 1998).

iv) αναστολή της διείσδυσης και της μετάστασης των όγκων

Μια άλλη ιδιότητα της NAC σε πειραματικό επίπεδο είναι η ικανότητά της να αναστέλλει την διείσδυση και την μετάσταση των όγκων. Πιθανώς αυτό να οφείλεται σε αναστολή των ζελατινολυσών από την σουλφυδρυλική της ομάδα, αλλά ενδεχομένως να



εμπλέκεται και η αντιοξειδωτική της δράση (Silvio De Flora et al. 2001B). Πειραματικά η NAC ανέστειλε την διεισδυτική ικανότητα των ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστεως, μειώνοντας την παραγωγή και την δραστικότητα της MMP-9 (Zafarullah M et al. 2003). Μειώνει την διεισδυτική και μεταστατική ικανότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων in vivo αναστέλλοντας την μετατροπή της προεπρωζελατινάσης (MMP-2) σε ενεργό προζελατινάση καθώς και την ενζυμική της δράση, και επίσης προλαμβάνει την αγγειογένεση, χωρίς να επάγει απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. (Zafarullah M et al. 2003, Silvio De Flora et al. 2001B). Επίσης αναστέλλει τις κολλαγενάσες τύπου IV, και προλαμβάνει την διείσδυση και την μετάσταση σε πειραματόζωα, μόνη ή σε συνδυασμό με δοξορουβικίνη (Silvio De Flora et al. 2001A).

v) δράση στην απόπτωση

Η NAC φαίνεται ότι διαδραματίζει ρόλο και στην διαδικασία της απόπτωσης. Στα κύτταρα του παχέος εντέρου η NAC μειώνει τις ROS και αυξάνει την έκφραση του προαποπτωτικού γονιδίου bax και την αποτελεσματικότητα της 5-φθοριοουρακίλης. Αυξάνει την μετάφραση του RNA του p53, τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε εξαλλαγμένα κύτταρα, το οποίο μπορεί να επάγει απόπτωση, αν και οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι αναστέλλει της απόπτωση. Συμπερασματικά, η NAC ενδεχομένως να έχει τόσο προκαρκινικές όσο και αντικαρκινικές ιδιότητες (Zafarullah M et al. 2003).

vi) δράσεις της NAC οφειλόμενες στο ρόλο της GSH στον καρκίνο

Η GSH διαδραματίζει πολλούς και σημαντικούς ρόλους στα κύτταρα (πίνακας 2), η δε έλλειψή της οδηγεί σε οξειδωτικό στρες και παίζει ρόλο στην παθογένεια πολλών νόσων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου.



Ρόλοι της GSH στους οργανισμούς**αντιοξειδωτική άμυνα**

- εκκαθάριση ελευθέρων ριζών και άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου
- απομάκρυνση υπεροξειδίων του υδρογόνου και των λιπιδίων
- πρόληψη της οξειδωσης των βιομορίων

μεταβολισμός

- σύνθεση των λευκοτριενίων και των προσταγλανδινών
- μετατροπή της φορμαλδεΐδης σε φορμικό
- παραγωγή D-γαλακτικού από τη μεθυλγλυοξάλη
- σχηματισμός μερκαπτουρικού από ηλεκτρόφιλες ουσίες
- σχηματισμός συνδέσεων γλουταθειόνης-NO
- αποθήκευση και μεταφορά της κυστεΐνης

ρύθμιση

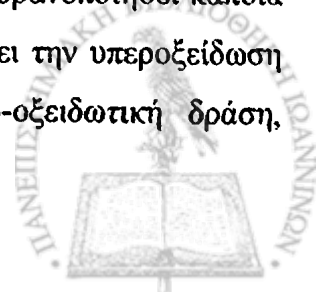
- ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας
- μεταβίβασης του σήματος και έκφρασης γονιδίων
- Σύνθεσης DNA, πρωτεϊνών και προτεόλυση
- Κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης
- Παραγωγής κυτταροκινών και ανοσολογικής ανταπόκρισης
- Πρωτεϊνικής γλουταθειονιοποίησης
- Λειτουργίας και ακεραιότητας των μιτοχονδρίων

Πίνακας 2: Ρόλοι της γλουταθειόνης στους οργανισμούς

Ο μεταβολισμός της GSH μπορεί να διαδραματίσει τόσο προστατευτικό όσο και παθογενετικό ρόλο στον καρκίνο. Η GSH στα καρκινικά κύτταρα σχετίζεται με α) καρκινογενετικούς μηχανισμούς, β) την ευαισθησία στα κυτταροστατικά φάρμακα, την ιονίζουσα ακτινοβολία και διάφορες κυττοκίνες, γ) την σύνθεση του DNA δ) τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Ganesaratnam K. Balendiran et al. 2004, Jose M. Estrela et al. 2006).

Πιο αναλυτικά,

Οι ROS και RNS παίζουν ρόλο στην αιτιολογία του καρκίνου εξαιτίας παραγόντων όπως η UV ηλιακή ακτινοβολία, τα χημικά καρκινογόνα, διαιτητικοί παράγοντες, χρόνια φλεγμονή. Εξαιτίας των αναγωγικών της ιδιοτήτων η GSH μπορεί να αδρανοποιήσει κάποια καρκινογόνα, να προφυλάξει το DNA από ελεύθερες ρίζες, να προλάβει την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Από την άλλη όμως, η GSH εμφανίζει και προ-οξειδωτική δράση,



αλληλεπιδρώντας με μεταλλικά ιόντα. (Ganesaratnam K. Balendiran et al. 2004, Jose M. Estrela et al. 2006).

Η GSH διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αποτοξίκωση πολλών ουσιών, καθώς η σύζευξη με την GSH είναι μια βασική αντίδραση της μεταβολικής φάσης II στα θηλαστικά. Η σύζευξη αυτή καταλύεται από τα ένζυμα τρανσφεράσες της GSH (GST). Ο πολυμορφισμός στα αλληλία που κωδικοποιούν τις GST και οδηγεί σε GST με μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα, οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη πολλών μορφών καρκίνου (πνεύμονα, ουροδόχου κύστεως, στομάχου, παχέος εντέρου και ορθού, δέρματος, μαστού, νεφρών, ήπατος και προστάτη). Ωστόσο, η υπερέκφραση των GST και τα αυξημένα επίπεδα της GSH σχετίζονται από την άλλη με αυξημένη αντίσταση στα διάφορα χημειοθεραπευτικά φάρμακα και τα επίπεδα της GSH ανιχνεύονται αυξημένα σε πολλά είδη ανθεκτικών στην θεραπεία καρκίνων (Ganesaratnam K. Balendiran et al. 2004, Jose M. Estrela et al. 2006).

Επίσης η GSH, μεταβάλλοντας την οξειδοαναγωγική κατάσταση (redox status), επηρεάζει την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, με αποτέλεσμα το αυξορρυθμισμό ή μειορρυθμισμό της έκφρασης των γονιδίων (Jose M. Estrela et al. 2006).

Η GSH και η κυστεΐνη ρυθμίζουν την ανακύκλωση των πρωτεϊνών, την σύνθεση του DNA και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε πολλούς ιστούς. Τα επίπεδα της GSH διακυμαίνονται στον κυτταρικό κύκλο και μπορεί να σχετίζονται με την ικανότητα για ανάπτυξη του όγκου. Επίσης έχει βρεθεί τα επίπεδα της GSH να συνδέονται άμεσα με την μεταστατική ικανότητα καρκινικών κυττάρων B16 (κύτταρα μελανώματος) όταν ενοφθαλμίζονται σε ποντικούς, και κύτταρα με αυξημένα επίπεδα GSH μεθίστανται πιο εύκολα. Σε κύτταρα κακοήθους μελανώματος έχει παρατηρηθεί αυξημένη συγκέντρωση GSH στα καρκινικά κύτταρα, αύξηση της ποσότητας GSH σε μελανοκύτταρα ποντικών μετά την εξαλλαγή τους με το C-H-ras ογκογονίδιο και ελάττωση της μεταστατικής διασποράς σε έλλειψη της GSH (Jose M. Estrela et al. 2006).

Επίσης η GSH ρυθμίζει τους μηχανισμούς της απόπτωσης που ρυθμίζεται από τα μιτοχόνδρια. Δεδομένα δείχνουν ότι η ελάττωση της GSH μπορεί να έχει θεραπευτική δράση ευαισθητοποιώντας τα κύτταρα που υπερεκφράζουν το Bcl-2 ώστε να υποστούν απόπτωση. Επίσης τα αυξημένα επίπεδα Bcl-2 συσχετίζονται με αυξημένα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH (Jose M. Estrela et al. 2006).



IVΔ2. ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ NAC ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ

Παρά τα πολλά και ελπιδοφόρα δεδομένα σε πειραματικό επίπεδο, τα αποτελέσματα από την κλινική χρήση της NAC όσον αφορά την θεραπεία ασθενών με καρκίνο υπήρξαν σε μεγάλο βαθμό απογοητευτικά.

Μελέτες σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο έδειξαν ότι η χορήγηση NAC είχε θετική επίδραση στο οξειδωτικό στρες και τα αυξημένα επίπεδα δεικτών φλεγμονής (Mirja-Liisa Aitio 2005). Επίσης η NAC μειώνει την συχνότητα υποτροπής των αδеноματωδών πολυπόδων του παχέος εντέρου, και σε ασθενείς με πολύποδες μειώνει τον δείκτη πολλαπλασιασμού (proliferative index) των ο οποίος είναι προγνωστικός βιολογικός δείκτης (biomarker) για αύξηση του καρκίνου του παχέος εντέρου (Zafarullah M et al. 2003, Silvio De Flora et al. 2001A). Όμως καμία τυχαioποιημένη μελέτη δεν έδειξε αποτελεσματικότητα όσον αφορά την χρήση αντιοξειδωτικών όπως η ρετινόλη (βιταμίνη A), το β-καροτένιο, η NAC ή το σελήνιο στην πρόσληψη του Ca πνεύμονας, τόσο στην πρωτογενή όσο και στην τριτογενή πρόληψη (M J. Kelley and D C. McCrory 2001). Ο συνδυασμός NAC και βιταμίνης A για 2 χρόνια δεν εμφάνιζε κανένα όφελος στην χορήγηση ασθενών με Ca πνεύμονα, κεφαλής ή τραχήλου, όσον αφορά την υποστροφή του όγκου ή την εμφάνιση άλλων πρωτοπαθών όγκων, σύμφωνα με την μελέτη EUROSCAN, μια μεγάλη τυχαioποιημένη μελέτη (Mirja-Liisa Aitio 2005).



V. N-(2-ΜΕΡΚΑΠΤΟΠΡΟΠΙΟΝΥΛ)ΓΛΥΚΙΝΗ

VA. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η N-(2-μερκαπτοπροπιονυλ)γλυκίνη (MPG), ή αλλιώς τιοπρονίνη, δημιουργείται από πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ του θειογαλακτικού οξέος και γλυκίνης, και έχει την ιδιότητα να απελευθερώνει -SH ομάδες (Gulizar Atmaca 2004). Χορηγείται στην θεραπεία της κυστινουρίας, στην ρευματοειδή αρθρίτιδα, σε ηπατικές διαταραχές και δηλητηριάσεις από βαρέα μέταλλα (π.χ. μόλυβδο), ως βλεννολυτικό σε αναπνευστικές παθήσεις. Επίσης έχει βρεθεί να είναι αποτελεσματική στην αναστολή της γαλουχίας. Η χορήγηση τιοπρονίνης (250 και 500 mg/d για 14 ημέρες) σε γυναίκες που θηλάζανε είχαν ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων της PRL και την διακοπή της παραγωγής γάλακτος χωρίς ιδιαίτερες παρενέργειες, και συγκριτικά λιγότερες από την βρωμοκρυπτίνη όσον αφορά την ναυτία και τον έμετο. Επομένως η τιοπρονίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενδεχομένως για την διακοπή της γαλουχίας (C. Akrivis et al. 2000).

Φαρμακοκινητική-παρενέργειες: Ποσοστό 48% της προσλαμβανόμενης δόσης απεκκρίνεται στα ούρα εντός 4 ωρών από την λήψη και ένα 78% στις 72 ώρες. Έχει παρόμοιες ανεπιθύμητες ενέργειες και προφυλάξεις με την πενικιλλαμίνη. Οι πιο συχνές είναι από το δέρμα και τους βλεννογόνους (στοματίτιδα, κνησμός, ερύθημα, πέμφιγα). Επίσης έχουν αναφερθεί αιματολογικές παρενέργειες (λευκοπενία, θρομβοκυτταροπενία, ηωσινοφιλία), γαστρεντερικές διαταραχές (διάρροια, ναυτία, έμετος ανορεξία, κοιλιακό άλγος, μετεωρισμός), ηπατοτοξικότητα, πρωτεϊνουρία μέχρι και νεφρωσικό σύνδρομο, αιματουρία, αρθραλγία και λεμφαδενοπάθεια, υπογευσία, ένδεια βιταμίνης Β6, ίκτερος, σύνδρομο μυασθένειας, πνευμονοτοξικότητα, με βρογχιολίτιδα, αιμόπτυση, αλλεργικές αντιδράσεις.

VB. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ MPG

ΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΚΑΡΔΙΑ

Η MPG εμφανίζει καρδιοπροστατευτικές δράσεις, που οφείλονται στην ικανότητα της να εκκαθαρίζει τις ελεύθερες ρίζες. Πειραματικά εκκαθαρίζει ελεύθερες ρίζες ενδοκυττάρια



και στα μιτοχόνδρια της καρδιάς μετά από επαναιμάτωση και βελτιώνει την μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση στην απομονωμένη και αιματούμενη καρδιά επίμυος. Αναστέλλει την οξείδωση των σουλφυδρυλίων των ιστών, των διαλυτών πρωτεϊνών και των λιπιδίων που συνδέονται με την βλάβη λόγω ισχαιμίας-επαναιμάτωσης στους πνεύμονες (Gulizar Atmaca 2004).

Η χορήγηση MPG σε ποντίκια εμποδίζει την υπερτροφία του μυοκαρδίου που προκαλείται πειραματικά μετά από την περιίδεση της αορτής, καθώς και από την παραγωγή ελευθέρων ριζών λόγω της περιίδεσης (Moto-o Date et al. 2002). Βοηθάει επίσης στην διατήρηση της λειτουργίας του μυοκαρδίου μετά από ισχαιμία-επαναιμάτωση σύμφωνα με πειράματα σε καρδιές κουνελιών (New Zealand white rabbits) (Ananth M. Prasan et al. 2002).

ΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΗΠΑΡ

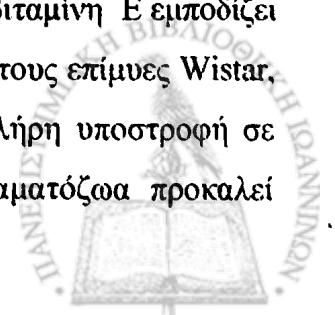
Το MPG ασκεί επίσης προστατευτική δράση στο ηπατικό παρέγχυμα. Είναι γνωστό ότι ουσίες που απελευθερώνουν σουλφυδρυλικές ομάδες παίζουν ρόλο στην προστασία των φυσιολογικών παραγόντων αποτοξίκωσης, των απαραίτητων ενζύμων για τον ηπατικό μεταβολισμό, την αδρανοποίηση διαφόρων εξωγενών και ενδογενών τοξικών που προκαλούν ηπατική βλάβη (Sujata Ohri et al. 2002).

Είναι ισχυρός αναστολέας της σύνθεσης του υπεροξειδίου, και μπορεί αν έχει προστατευτική δράση στο ηπατικό παρέγχυμα, όταν αυτό υποβάλλεται σε ισχαιμία και επαναιμάτωση. Η προφύλαξη που ασκεί στο ήπαρ κατά την ισχαιμία και την επαναιμάτωση έχει επίσης επιβεβαιωθεί, τόσο σε επίμυες όσο και σε σκύλους, με βάση μετρήσεις των AST, ALT και ιστολογική εξέταση του ηπατικού παρεγχύματος (Emilio Elias ABDO et al. 2003).

Έχει προστατευτική δράση έναντι του δραστικού μεταβολίτη της ακεταμινοφαίνης. Μειώνει το ανάκτηση του βάρους του ήπατος μετά από ηπατεκτομή, την έκφραση των πρωτο-ογκογονιδίων c-fos και c-myc, και μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στο αναγεννώμενο ήπαρ. (Gulizar Atmaca 2004, Sujata Ohri et al. 2002).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ MPG ΚΑΙ ΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ

Η προληπτική χορήγηση MPG σε συνδυασμό με βιταμίνη C και βιταμίνη E εμποδίζει μερικώς την προκαλούμενη από το βενζο-α-πυρένιο (BaP) ογκογένεση στους επίμυες Wistar, ενώ η θεραπευτική χορήγηση των ίδιων αντιοξειδωτικών οδηγεί σε πλήρη υποστροφή σε ποσοστό 16,8% των προκαλούμενων όγκων, στα δε υπόλοιπα πειραματόζωα προκαλεί



στατιστικά σημαντική αύξηση της επιβίωσης έναντι της ομάδας ελέγχου (A. Evangelou et al. 1997). Σε ποντίκια που εμφανίζανε διάχυτους ενδοπεριτοναϊκούς όγκους η χορήγηση MPG σε συνδυασμό με το χημειοθεραπευτικό νεοκαρζινοστατίνη αύξανε την επιβίωση, σε σύγκριση με την χορήγηση μόνο νεοκαρζινοστατίνης (Andrei L et al. 2002). Επίσης η χορήγηση MPG μαζί με σισπλατίνη μειώνει περαιτέρω την ανάπτυξη των όγκων που προκαλούνται σε ποντίκια μετά την υποδόρια εμφύτευση λευχαιμικών κυττάρων P388, σε σύγκριση με την χορήγηση σισπλατίνης μόνο (Maofu Fu 2004).

Η MPG εμφανίζει μια παράδοξη επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Jurkat όπου σε μικρές δόσεις αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους, προκαλώντας απόπτωση ή νέκρωση, ενώ σε μεγαλύτερες δεν έχει επίδραση, γεγονός που ενδεχομένως οφείλεται στην αναστολή της SOD από το MPG και από την μια και την αντιοξειδωτική της δράση από την άλλη, με την μια ή την άλλη δράση να υπερέχει αντίστοιχα, ανάλογα με την συγκέντρωση της θειόλης (Daniel Hernandez-Saavedra et al. 2003).

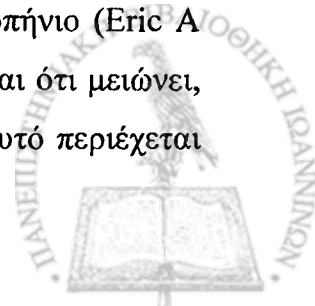
Σε αντίθεση με την NAC, η MPG δεν έχει μελετηθεί στον ίδιο βαθμό όσον αφορά τις ενδεχόμενες αντικαρκινικές τις ιδιότητες, σχετικά δε με τον ρόλο της στον καρκίνο του μαστού και του προστάτη δεν υπάρχουν δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία.



VI. ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Επιδημιολογικά δεδομένα από περισσότερες από 250 μελέτες δείχνουν ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης -ορισμένων μορφών καρκίνου σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με την κατανάλωση λαχανικών και φρούτων που περιέχουν σημαντικά αντιοξειδωτικά μικροσυστατικά, φυτοχημικά και ίνες. Η αντίστροφη αυτή σχέση παρατηρείται για τους καρκίνους του στόματος και του φάρυγγα, του οισοφάγου, του πνεύμονα, του στομάχου, του παχέος εντέρου και του ορθού, ενώ τα οφέλη για ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους όπως του μαστού και του προστάτη δεν είναι το ίδιο εμφανή. Η κατανάλωση καρότων και πράσινων λαχανικών που είναι πλούσια σε καροτενοειδή σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο για καρκίνο μαστού, και παρατηρείται μια μείωση του κινδύνου για καρκίνο προστάτη σε όσους καταναλώνουν κίτρινα λαχανικά και τομάτες, τροφές που είναι πλούσιες σε λυκοπίνη. Επίσης το πράσινο τσάι που είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου μαστού και προστάτη (Hamilton W et al. 2006, Borek Carmia 2004).

Αντιθέτως με τα παραπάνω, μια πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση και μετά-ανάλυση των κλινικών δοκιμών της χρήσης αντιοξειδωτικών (β-καροτένιο, βιταμίνη Α, C, E και σελήνιο) στην πρόληψη έναντι του καρκίνου του πεπτικού συστήματος (οισοφάγου, στομάχου, παχέος εντέρου, παγκρέατος, ήπατος) έδειξε ότι η χρήση των αντιοξειδωτικών δεν είχε καμία ευεργετική επίδραση, σε ορισμένες δε περιπτώσεις είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της θνησιμότητας. Εξαιρεση αποτελούσε το σελήνιο, το οποίο εμφάνιζε προστατευτική δράση έναντι της εμφάνισης καρκίνου του ΓΕΣ. Ωστόσο σε πολλές από αυτές τις μελέτες που εξετάστηκαν χρησιμοποιήθηκαν αντιοξειδωτικά σε δόσεις πολύ μεγαλύτερες των συνιστώμενων ημερησίων δόσεων, γεγονός που ίσως είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των παρενεργειών (Goran Bjelakovic et al. 2004). Επίσης μελέτες δείχνουν ότι το σελήνιο μειώνει την συχνότητα καρκίνου του δέρματος και του προστάτη, τόσο στον άνθρωπο όσο και σε διάφορα πειραματικά μοντέλα. Η βιταμίνη E φαίνεται να μειώνει την συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του προστάτη, και φαίνεται πως η βιταμίνη D ασκεί προστατευτική δράση έναντι του καρκίνου του προστάτη, όπως και το λυκοπίνη (Eric A Klein 2005). Η υψηλή κατανάλωση τομάτας (σε μαγειρευμένη μορφή) φαίνεται ότι μειώνει, έστω σε μικρό βαθμό, την επίπτωση του καρκίνου του προστάτη και ίσως αυτό περιέχεται



και στο περιεχόμενο λυκοπήνιο. Μία μεγάλης κλίμακας μελέτης με σελήνιο και βιταμίνη E στη πρόληψη του καρκίνου του προστάτη θα ολοκληρωθεί το 2013 (Hamilton W et al. 2006). Υπάρχουν ενδείξεις ότι το β-καροτένιο, το λυκοπήνιο και το ολικό καροτένιο ενδεχομένως προσφέρουν προστασία έναντι του καρκίνου του μαστού. Η κατανάλωση βιταμίνης E έχει βρεθεί να μειώνει τον κίνδυνο υποτροπής του καρκίνου του μαστού (Hamilton W et al. 2006, Borek Carmia 2004).

Επίσης η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία προκαλούν μείωση των ενδογενών αντιοξειδωτικών, και η χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών μειώνει ορισμένες από τις παρενέργειες αυτών των θεραπειών. Από την άλλη όμως, η δράση μερικών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και αυτή της ακτινοθεραπείας στηρίζονται στην δημιουργία ελευθέρων ριζών, και επομένως υπάρχει το ερώτημα κατά πόσο η χρήση αντιοξειδωτικών μειώνει ενδεχομένως το θεραπευτικό αποτέλεσμα των θεραπειών αυτών (Borek Carmia 2004).



VII. Ο ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

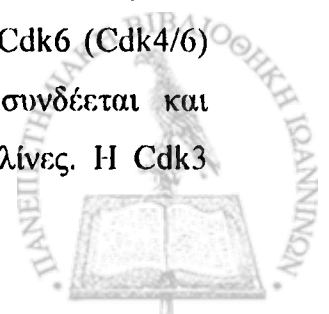
VIIA. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο κυτταρικός κύκλος ορίζεται ως η περίοδος η οποία μεσολαβεί από την στιγμή που θα προκύψει ένα νέο κύτταρο, ως αποτέλεσμα κυτταρικής διαίρεσης, μέχρι τη στιγμή που αυτό θα διαιρεθεί για να σχηματίσει δύο θυγατρικά κύτταρα. Χωρίζεται στις εξής φάσεις: Μίτωση, φάση G₁, φάση S και φάση G₂. Μία ειδική κατάσταση της G₁ είναι η G₀. Η φάση G₁ είναι η περίοδος ανάμεσα στην μίτωση και τον διπλασιασμό του DNA, η φάση S είναι η περίοδος διπλασιασμού του DNA, και η φάση G₂ είναι η περίοδος ανάμεσα στο τέλος της φάσης S και την αρχή της μίτωσης.

Συγκεκριμένες διεργασίες που ονομάζονται σημεία ελέγχου (checkpoints), ρυθμίζουν την μετάβαση από τη μια φάση του κύκλου στην επόμενη. Τέσσερα τέτοια σημεία έχουν περιγραφεί αναλυτικά: Το σημείο περιορισμού (restriction point) στην φάση G₁, τα σημεία ελέγχου βλαβών του DNA, και το σημείο ελέγχου στην μετάφαση (επίσης ονομάζεται σημείο ελέγχου συνάθροισης της ατράκτου, spindle assembly checkpoint).

Η μετάβαση από την μια φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη ρυθμίζεται από ένα σύνολο ενζύμων, κινασών και φωσφατασών. Στον άνθρωπο έχουν ανιχνευτεί περισσότερες από 10 κινάσες που ρυθμίζουν την μετάβαση αυτή. Από μόνες του είναι ανενεργείς, και για να ενεργοποιηθούν απαιτείται η σύνδεση τους με ρυθμιστικές υπομονάδες που ονομάζονται κυκλίνες, εξ' αιτίας της κυκλικής συσσώρευσής του και στην συνέχεια αποικοδόμησής τους κατά τη διάρκεια του κύκλου. Λόγω της εξάρτησής τους από τις κυκλίνες οι κινάσες αυτές ονομάζονται CDK (Cyclin Dependent Kinases). Συνεπώς, οι κύριοι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου είναι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες που περιέχουν μια ρυθμιστική υπομονάδα (κυκλίνη) και μια καταλυτική (Cdk).

Στα ανθρώπινα κύτταρα η οικογένεια των Cdk αποτελείται από 20 περίπου πρωτεΐνες, και περιλαμβάνεται 11 Cdk (Cdk1- Cdk11), πρωτεΐνες όπως οι Pctaire 1-3, Pflaire 1-2, Pitslre, Cdc2L5, Crk7, Ccrk, και επιπλέον 5 πρωτεΐνες Cdkl (Cdk11-5). Πέντε από τις Cdk (Cdk 1,2,3,4,6) σχετίζονται συνήθως με τον κυτταρικό κύκλο. Οι Cdk4 και Cdk6 (Cdk4/6) συνδέονται και ενεργοποιούνται από τις κυκλίνες τύπου D, η Cdk2 συνδέεται και ενεργοποιείται από τις A- και E- κυκλίνες, η Cdk1 από τις A-και B- κυκλίνες. Η Cdk3



συνδέεται με τις E-, A- και C- κυκλίνες, αλλά ο ρόλος της δεν είναι σαφώς διευκρινισμένος (Marcos Malumbres 2005).

Από τις Cdk που εκφράζονται σε σημαντικά επίπεδα στα περισσότερα κύτταρα των θηλαστικών και παίζουν ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η Cdk 1 ρυθμίζει την μετάβαση από την φάση G₂ στην φάση M, η Cdk 2 ρυθμίζει την μετάβαση από την φάση G₁ στην φάση S και από την φάση G₂ στην φάση M, και οι Cdk 4,6 την μετάβαση από το σημείο περιορισμού.

Όσον αφορά τα μόρια των κυκλινών, τουλάχιστον 16 κυκλίνες έχουν ανιχνευθεί στον άνθρωπο. Οι A, B δρουν στην φάση S, την G₂ και την αρχή της μίτωσης, ενώ οι D και E είναι κυκλίνες της G₁ φάσης. Μετά την σύνδεση μιας Cdk με μια κυκλίνη απαιτείται για την πλήρη ενεργοποίηση του διμερούς αυτού μορίου μια ακόμη κινάση που ονομάζεται CAK (CDK-Activating Kinase). Στα θηλαστικά η CAK αποτελείται από την Cdk7-κυκλίνη H (Richard G. Pestell et al. 1999).

Υπάρχουν 2 μηχανισμοί αδρανοποίησης των Cdk: 1) Κατά την φάση G₂ οι Cdk αδρανοποιούνται από την φωσφορυλίωσή τους από τις πρωτεϊνικές κινάσες Wyt και Wee1. Τρεις Cdc25 φωσφατάσες αναστέλλουν αυτές τις φωσφορυλιώσεις. Η Cdc25A εμπλέκεται στην ρύθμιση της μετάβασης από την φάση G₁ στην S, ενώ οι Cdc25B και Cdc25C δρουν στην μετάβαση από την φάση G₂ στην M. Η Cdc25c αποτελεί στόχο του σημείου ελέγχου του DNA (DNA checkpoint) στην φάση G₂. 2) Ένας δεύτερος μηχανισμός αδρανοποίησης των Cdk αποτελείται από τη σύνδεσή τους με μόρια της οικογένειας CKI (Cyclin dependent Kinase Inhibitors) και Ink4 (Inhibitor of Cdk 4). Τα μόρια CKI ονομάζονται συνήθως με βάση το μοριακό τους βάρος ως p21^{Cip1/Waf1}, p27^{Kip1} και p57^{Kip2}. Τα μέλη της οικογένειας των Ink4 (p15^{Ink4b}, p14^{Ink4}, p18^{Ink4c} και p19^{Ink4d}) απενεργοποιούν τις Cdk4 και Cdk6, προκαλώντας έτσι αναστολή του κύκλου στην φάση G₁.

Μετά τον διαχωρισμό των χρωματίδων, το κύτταρο πρέπει να μεταβεί σε μια κατάσταση με χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας των Cdk. Η απενεργοποίηση των Cdk γίνεται μέσω του πρωτεολυτικού μηχανισμού της ουβικουΐτινης, η οποία στοχεύει τις κυκλίνες τύπου A και B, και μιας πρωτεΐνης που λέγεται securin. Η καταστροφή των κυκλινών απενεργοποιεί τις Cdk1 και Cdk2, επιτρέποντας έτσι σε διάφορες φωσφατάσες να δράσουν και να οδηγήσουν στο τέλος της μίτωσης.

Ένας ειδικός παράγοντας της ρύθμισης της πρωτεόλυσης των κυκλινών είναι ένα σύμπλεγμα που αποτελείται από 10-12 υπομονάδες που ονομάζονται APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome).



VII.B. Η ΦΑΣΗ G_1 ΚΑΙ Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Κατά την φάση G_1 το κύτταρο λαμβάνει μια σημαντική απόφαση: εάν θα συνεχίσει σε έναν ακόμη κύκλο πολλαπλασιασμού, ή θα παραμείνει στάσιμο, προσωρινά ή μόνιμα, μεταβαίνοντας στην φάση G_0 . Για να προχωρήσει το κύτταρο στον επόμενο κύκλο απαιτούνται ερεθίσματα από το εξωκυττάριο περιβάλλον ή από τους αυξητικούς παράγοντες, και πρέπει το κύτταρο να περάσει το σημείο περιορισμού της G_1 φάσης, το οποίο ελέγχει το μέγεθος του κυττάρου, την κατάσταση των χρωμοσωμάτων και το εξωτερικό περιβάλλον. Το σημείο περιορισμού ορίζεται ως το σημείο πέρα από το οποίο ο κυτταρικός κύκλος θα προχωρήσει και χωρίς να είναι απαραίτητη η παρουσία μιτογόνων παραγόντων. Το σημείο αυτό αποτελεί μια μοριακή πύλη η οποία βασίζεται στην πρωτεΐνη ευαισθησίας στο ρετινοβλάστωμα (pRb) και την οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων E2F. Ο παράγων E2F συνδέεται στο DNA, στην περιοχή των υποκινητών των γονιδίων που ελέγχει, ως ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο μαζί με την υπομονάδα DP1. Η μη φωσφορυλιωμένη pRb συνδέεται με το σύμπλεγμα E2F/DP1. Η pRb επιστρατεύει αποακετυλάσες των ιστονών, με αποτέλεσμα την αποακετυλίωσή τους και την συμπύκνωση της δομής της χρωματίνης. Έτσι καταστέλλεται η έκφραση των αναγκαίων για τον κυτταρικό κύκλο γονιδίων.

Οι Cdk φωσφορυλιώνουν την pRb και έτσι την αποδεσμεύουν από τον E2F/DP1. Τα κύρια ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την φωσφορυλίωση του pRb είναι τα συμπλέγματα Cdk4/6-κυκλίνη D1, Cdk2-κυκλίνη E και Cdk2-κυκλίνη A. Τον απελευθερωμένο πλέον E2F/DP1 είναι ισχυρός μεταγραφικός παράγοντας και επάγει την έκφραση γονιδίων και των αντίστοιχων πρωτεϊνών που οδηγούν το κύτταρο στη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου, όπως οι πρωτεΐνες για τη σύνθεση του DNA, οι κυκλίνες A και E, ο Cdk1 κ.α. (Σχήμα A2). Επίσης μαζί επάγεται περαιτέρω και η σύνθεση του ίδιου του E2F. (Charles J. Sherr 1996).

Τα μέλη της οικογένειας Cip/Kip (p21, p27, p57) μπορούν να απενεργοποιήσουν τα διάφορα συμπλέγματα Cdk/κυκλινών, και κυρίως όμως αυτά που περιέχουν την Cdk2, (όπως το σύμπλεγμα Cdk2/κυκλίνη E). Με αυτό τον τρόπο παίζουν ρόλο στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου μετά από βλάβη του DNA, ενώ η υπερέκφρασή τους οδηγεί σε αναστολή της φάσης G_1 , G_2 ή S. Σε κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας, τα επίπεδα του p27^{Kip1} είναι υψηλά. Επειδή το p27 είναι ανασταλτικό του συμπλέγματος Cdk/κυκλίνη E, η απομάκρυνσή



του από το σύμπλεγμα είναι αναγκαία για την είσοδο στην S φάση (Richard G. Pestell et al. 1999).

Το p21 σε μικρές συγκεντρώσεις, σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση Cdk 4-κυκλίνης D, ενισχύει έτσι την δράση του συμπλέγματος, ενώ σε μεγαλύτερες αναστέλλει την δράση του (Andrei L et al. 2002, Richard G. Pestell et al. 1999).

Η επίδραση αυξητικών παραγόντων, μέσω της οδού Ras-Raf-MAPK προκαλεί αύξηση της σύνθεσης της κυκλίνης D και του p21^{Kip1}. Τα p21 και p27 ενώνονται με το σύμπλεγμα Cdk4/6-κυκλίνη D, και αυτό έχει τις εξής συνέπειες: α) τα p21, p27 ενισχύουν με αυτόν τον τρόπο τη δράση του συμπλέγματος Cdk4/6-κυκλίνη D, και το σύμπλοκο Cdk4/6-κυκλίνη D-p21^{Cip1}/p27^{Kip1} φωσφορυλιώνει το pRb. Αυτό οδηγεί σε απελευθέρωση του E2F που μεταξύ των άλλων επάγει την σύνθεση των κυκλινών A, E. β) το σύμπλεγμα Cdk4/6-κυκλίνη D δρα ως 'σφουγγάρι' που κατακρατεί τα p21 και p27, και έτσι αίρεται η αναστολή τους στο σύμπλεγμα Cdk2-κυκλίνης E, και απελευθερώνεται η ενεργή Cdk2-κυκλίνη E, η οποία φωσφορυλιώνει περαιτέρω την pRb, με αποτέλεσμα την ακόμη μεγαλύτερη ενεργοποίηση του E2F.

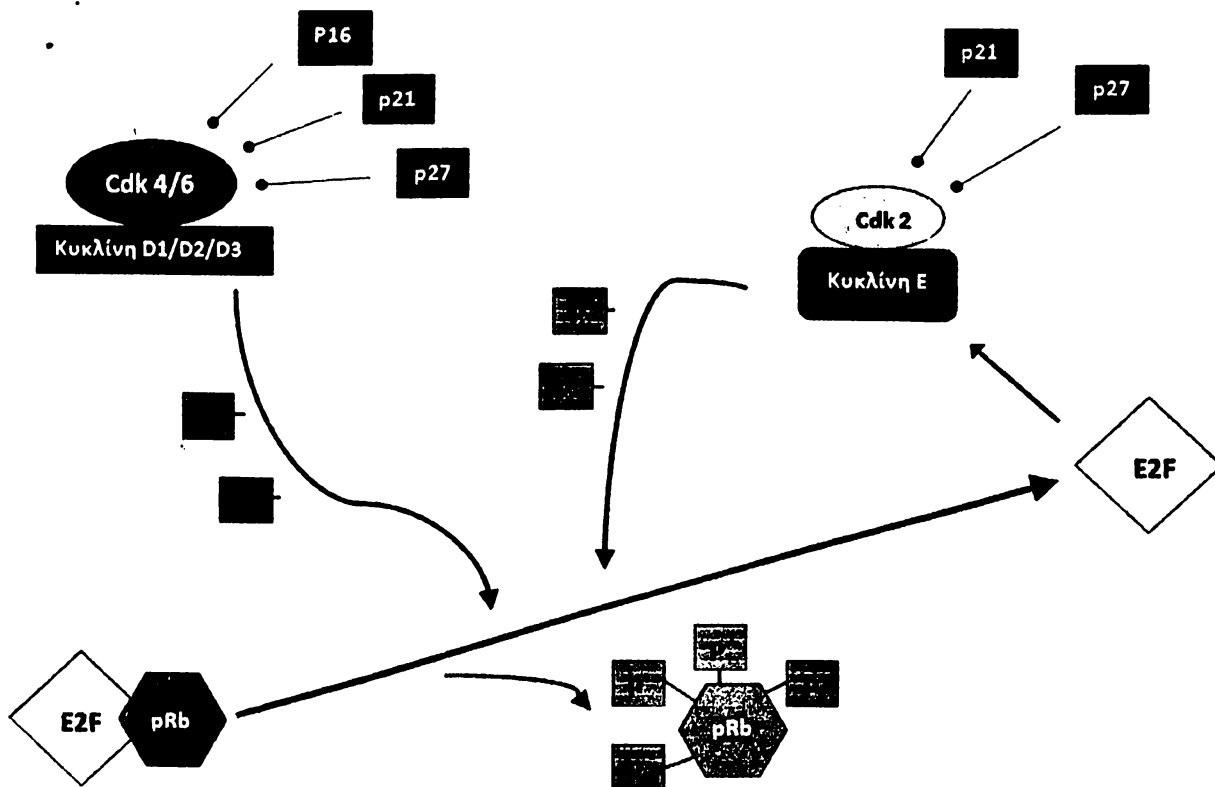
Το σύμπλεγμα Cdk-κυκλίνη E είναι μέγιστα ενεργό στην φάση G₁/S. Το πέρασμα από το σημείο περιορισμού προάγεται λοιπόν από τις D-κυκλίνες στην μέση G₁ φάση και την κυκλίνη E στην όψιμη G₁ φάση (Harris J et al. 2004). Επίσης, η ενεργή Cdk2-κυκλίνη E έχει την ικανότητα να φωσφορυλιώνει το p27 και να προκαλεί την αποδόμησή του. Δηλαδή το p27^{Kip1} αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα Cdk/κυκλίνη E με 2 τρόπους: α) ενώνεται μαζί του και το εμποδίζει να φωσφορυλιώσει υποστρώματα όπως το pRb β) αποτελεί το ίδιο υπόστρωμα για την Cdk2/κυκλίνη E, φωσφορυλιώνεται από αυτή και αποικοδομείται (Richard G. Pestell et al. 1999, Charles J. Sherr 1996).

Τα συμπλέγματα Cdk –κυκλίνη A και Cdk-κυκλίνη B ενεργοποιούνται μετά την Cdk-κυκλίνη D με αποτέλεσμα η pRb να παραμένει φωσφορυλιωμένη κατά την πορεία του κύκλου, αρχικά από την Cdk2-κυκλίνη A και κατόπιν από την Cdk1-κυκλίνη B, μέχρι το τέλος την μίτωσης (Charles J. Sherr, and James M. Roberts 1999). Κατόπιν αποφωσφορυλιώνεται στην είσοδο στην G₁ φάσης, επανασυνδέεται με το E2F και το απενεργοποιεί.

Άλλο ένα σημείο ελέγχου στην G₁ φάση είναι το σημείο ελέγχου της ακεραιότητας του DNA, στην όψιμη G₁ φάση. Η πρωτεΐνη p53 είναι σημαντική για την λειτουργία αυτού του σημείου ελέγχου: δρα ως μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιεί μερικά γονίδια, μεταξύ των οποίων και αυτά του αναστολέα των Cdk, p21^{Cip1}. Το p53 σε μεγάλες

συγκεντρώσεις είναι τοξικό για το κύτταρο, γι' αυτό τα επίπεδά του ρυθμίζονται από μια πρωτεΐνη που ονομάζεται mdm2. Η mdm2 προάγει την αποικοδόμηση του p53 από το σύστημα πρωτεασώματος της ουβικουΐνης, και διατηρεί τα επίπεδα του p53 χαμηλά κάτω από φυσιολογικές συνθήκες λειτουργίας του κυττάρου. Το p21 επάγεται από εξαρτώμενους και ανεξάρτητους από το p53 μηχανισμούς. Στους περισσότερους ιστούς ο μηχανισμός είναι ανεξάρτητος (Andrei L et al. 2002). Σε μερικά συστήματα το p21 είναι αναστολέας της προκαλούμενης από το p53 απόπτωσης, αλλά και της ανεξάρτητης από το p53 απόπτωσης, ενώ σε άλλα συστήματα προκαλεί απόπτωση (Andrei L et al. 2002).

Όσον αφορά την αποδόμηση των κυκλινών, οι G₁ κυκλίνες αποδομούνται από την ουβικουΐνη με την μεσολάβηση του συμπλέγματος SCF, ενώ οι μιτωτικές κυκλίνες μέσω του συμπλέγματος από το APC (anaphase-promoting complex) (Andrew W. Murray 2004).



Σχήμα Α2. Ο βασικός μηχανισμός ενεργοποίησης του E2F στην G1 φάση.



VIIΓ. Η ΦΑΣΗ S ΚΑΙ Ο ΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στα θηλαστικά το πρώτο σύμπλεγμα Cdk-κυκλίνης που είναι σημαντικό για την είσοδο στην φάση S είναι το σύμπλεγμα Cdk2-κυκλίνη E, του οποίου τα επίπεδα είναι μέγιστα κατά τη μετάβαση G₁/S. Αυτή η κινάση φωσφορυλιώνει την pRb περαιτέρω, με αποτέλεσμα ο E2F να διεγείρει την μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στον διπλασιασμό του DNA. Επίσης η Cdk-κυκλίνη E φωσφορυλιώνει το p27, κάνοντάς το στόχο για το σύμπλεγμα SCF, το οποίο το οδηγεί σε αποικοδόμηση. Στη συνέχεια η κυκλίνη E αποικοδομείται μόλις τα κύτταρα μουν στην φάση S.

Ένα άλλο σύμπλεγμα απαραίτητο για την είσοδο στην φάση S είναι το σύμπλεγμα Cdk2-κυκλίνη A.

VIIΔ. Η ΦΑΣΗ G₂ ΚΑΙ Ο ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΣΤΗΝ ΜΙΤΩΣΗ

Η κύρια Cdk των θηλαστικών στην φάση G₂ είναι η Cdk1, η οποία αλληλεπιδρά με την κυκλίνη B1 και σχηματίζει το σύμπλεγμα Cdk1-κυκλίνη B1. Τα θηλαστικά εκτός της B1 έχουν και άλλες 2 κυκλίνες B-τύπου, τις B2 και B3. Η Cdk1 συνδέεται πέραν της κυκλίνης B1 και με την κυκλίνη A. Η κυκλίνη B1 συντίθεται αρχικά στην φάση S, και αυξάνει η συγκέντρωσή της καθώς το κύτταρο προχωρεί στην G₂, εμφανίζει μέγιστη συγκέντρωση στην μετάφαση και πτώση μετά την ανάφαση.

Καθώς τα κύτταρα προχωρούν από την G₂ στην μίτωση, η Cdk1 αφότου συνδεθεί με τις κυκλίνες, ενεργοποιείται από μια πρωτεϊνική κινάση, την CAK, η οποία είναι η Cdk-κυκλίνη H, ενώ απενεργοποιείται από μια άλλη κινάση, την Wee1.

Η Cdk-κυκλίνη B1 ενεργοποιείται στην πρόφαση από την Cdc25 πρωτεϊνική φωσφατάση, η οποία απομακρύνει τις ανασταλτικές φωσφατάσες T14 και Y15 από το σύμπλεγμα. Το σύμπλεγμα Cdk-κυκλίνη B1 μπορεί να μετακινείται εντός και εκτός πυρήνα. Η Cdc25 φωσφατάση πυροδοτεί την μετάβαση στην G₂/M και είναι στην πραγματικότητα μια οικογένεια από 3 πρωτεΐνες: τις Cdc25A, Cdc25B και Cdc25C. Δύο γεγονότα πυροδοτούν την έναρξη της μίτωσης: α) η φωσφορυλίωση της Cdc25C, που οδηγεί σε συγκέντρωσή της στον πυρήνα β) η φωσφορυλίωση της κυκλίνης B1 από την Cdc25C που



οδηγεί σε συγκέντρωση του Cdk1-κυκλίνη B1 στον πυρήνα. Κατόπιν το Cdk1-κυκλίνη B1 προκαλεί διάσπαση του πυρηνικού φακέλου και είσοδο στην μίτωση.

Στην όψιμη S και στην G₂ φάση η ενεργοποίηση της Cdc25B ενεργοποιεί την Cdk1-κυκλίνη A, η οποία ενεργοποιεί την έναρξη της πρόφασης, βοηθάει στην μετάβαση G₂/M και εμφανίζει μέγιστη συγκέντρωση λίγο πριν την μέγιστη συγκέντρωση της Cdk1-κυκλίνη B1.

Στη φάση G₂ υπάρχει ακόμη ένας σημείο ελέγχου, το σημείο ελέγχου της δομής του DNA (DNA structure checkpoint), το οποίο διακόπτει την μίτωση εάν το DNA έχει βλάβες ή ο διπλασιασμός του είναι ατελής. Σε αυτή την περίπτωση οι κινάσες αυτού του σημείου ελέγχου φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες που σταματούν τον κύκλο. Η πιο γνωστή από αυτές τις κινάσες είναι η ATM, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο που είναι ελαττωματικό στην νόσο αταξίας-τελαγγειεκτασίας. Άλλη μια κινάση που εμπλέκεται στο σημείο ελέγχου της φάσης G₂ είναι η ATR. Σε περίπτωση βλάβης στο DNA οι ATM/ATR φωσφορυλιώνουν το p53 και την πρωτεϊνική κινάση Chk1 (checkpoint kinase 1). Η Chk1 ενεργοποιείται από την φωσφορυλίωση και με την σειρά της φωσφορυλιώνει την Cdc25C. Αυτό έχει ως συνέπεια την αναστολή της δράσης της Cdc25C, και την δημιουργία μιας θέσης στο μόριό της για την σύνδεσή της με μια πρωτεΐνη της οικογένειας των 14-3-3 πρωτεϊνών. Η σύνδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απομόνωση της Cdc25C στο κυτταρόπλασμα.

Επίσης το p53 επάγει το p21, το οποίο μπλοκάρει την Cdk1-κυκλίνη A και την Cdk1-κυκλίνη B1 σε μικρότερο βαθμό. Το p53 επάγει επίσης και την 13-3-3σ πρωτεΐνη, η οποία ενώνεται με το σύμπλεγμα Cdk1-κυκλίνη B1 και το κρατάει εκτός πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα. Το ATM/ATR ενεργοποιεί επίσης την Chk2, η οποία φωσφορυλιώνει την Wee1, που απενεργοποιεί την Cdk1-κυκλίνη B1. Στο σύμπλεγμα 13-3-3σ/Cdk1-κυκλίνη B1 ενσωματώνεται και η ανασταλτική κινάση Wee1, η οποία εξασφαλίζει επίσης την αδρανοποίηση του συμπλέγματος Cdk1-κυκλίνης B1. Όλα αυτά καθυστερούν στην συνέχιση του κυτταρικού κύκλου, δίνοντας χρόνο στο κύτταρο να επιδιορθώσει τις βλάβες στο DNA προτού προχωρήσει στην μίτωση.

VIIΕ. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ, ΚΥΚΛΙΝΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

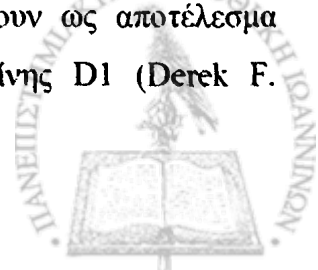
Μια θεμελιώδης διαταραχή των καρκινικών κυττάρων είναι η απορρύθμιση του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, με συνέπεια τα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται



ανεξέλεγκτα. Τα κύτταρα εμφανίζουν επίσης αδυναμία διακοπής του κυτταρικού κύκλου σε περίπτωση βλαβών του DNA ή παρουσίας άλλων ανασταλτικών παραγόντων. Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις καρκίνου εμφανίζονται βλάβες στους μηχανισμούς ελέγχου της προόδου από την G1 στην S φάση, στον μηχανισμό δηλαδή που ονομάζεται οδός της pRb, όπως είναι για παράδειγμα η παθολογική λειτουργία των συμπλεγμάτων κυκλίνης D-Cdk 4/6. Άλλες παθολογικές μεταβολές είναι η ενίσχυση του γονιδίου της κυκλίνης D1 και η υπερέκφραση της πρωτεΐνης. Η εμπλοκή της κυκλίνης D1 στην καρκινογένεση έχει περιγραφεί καλύτερα από κάθε άλλη περίπτωση στον καρκίνο του μαστού, όπου ένα 15-20% των όγκων εμφανίζει ενίσχυση του γονιδίου της κατά 3-10 φορές περισσότερο από το φυσιολογικό. Η ενίσχυση (amplification) του γονιδίου της D1 εμφανίζεται πέρα από το μαστό και σε άλλα είδη καρκίνου, όπως της κεφαλής, του τραχήλου, του οισοφάγου.

Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι η D1 ανιχνεύεται αυξημένη σε ποσοστό περίπου 50% των όγκων μαστού, και επομένως η αύξηση οφείλεται και σε άλλους μηχανισμούς πέραν του αυξημένου αριθμού αντιγράφων του γονιδίου της, όπως είναι μεταγραφικοί και μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί. Εμφανίζει ογκογονική δράση η οποία όμως είναι ασθενής και απαιτείται και η δράση και άλλων ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων για να εκφραστεί πλήρως, διότι στα διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζεται η κυκλίνη D1 αναπτύσσονται καλά διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα του μαστού, και σε χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από ότι απαιτείται συνήθως για άλλα ογκογονίδια. Πιο συγκεκριμένα, διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν την κυκλίνη D1 αναπτύσσουν καρκίνους του μαστού σε ποσοστό 75%, αλλά μετά από μια περίοδο περίπου 18 μηνών, σε σχέση με τα γονίδια c-neu, Ha-ras και c-myc, τα οποία επάγουν όγκους σε διαστήματα 3, 6 και 11 μηνών αντίστοιχα, όταν υπερεκφράζονται. Η κυκλίνη D1 υπερεκφράζεται συχνότερα σε όγκους με υψηλά επίπεδα ER. Η ιδιότητά της να δρα πιθανώς ως ρυθμιστής του ER εξηγεί ενδεχομένως και το μεγάλο ποσοστό συνέκφρασής τους, και παρά τη σχέση τους, οι πιο πολλές μελέτες δεν σχετίζουν τα επίπεδα της D1 με την πρόγνωση (C. Elizabeth Caldon 2006, Amit Desphande et al. 2005, Diana M. Barnes and Cheryl E. Gillett, 1998)

Τα επίπεδα του mRNA της κυκλίνης D1 ανευρίσκονται συχνά αυξημένα στον καρκίνο του προστάτη και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Επίσης ανωμαλίες που παρατηρούνται στον καρκίνο του προστάτη όπως η υπερέκφραση του Erb-2, η απώλεια του PTEN, τα αυξημένα επίπεδα β-catenin και μεταλλάξεις του AR έχουν ως αποτέλεσμα αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων λόγω αύξησης της κυκλίνης D1 (Derek F. Amanatullah et al. 2000).



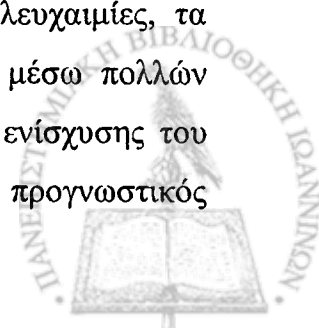
Οι κυκλίνες D2 και D3 εμφανίζουν ενίσχυση και υπερεκφράζονται σε πολλούς καρκίνους. Η D2 εμπλέκεται στις λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες από B- κύτταρα, στα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, τη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, τον καρκίνο των όρχεων και των ωοθηκών. Η D3 υπερεκφράζεται στο γλοιοβλάστωμα, τον καρκίνο του νεφρού και του παγκρέατος και τις κακοήθειες από τα B- κύτταρα. Η κυκλίνη D2 υπερεκφράζεται σχετικά σπάνια στον καρκίνο του μαστού, και όταν υπερεκφράζεται προκαλεί καρκίνους μαστού σε μικρότερο ποσοστό σε σχέση με άλλα ογκογονίδια, σε ποσοστό 19%. Η υπερέκφραση της D3 συνδέεται με ανάπτυξη υψηλού βαθμού κακοήθειας καρκίνων του μαστού. Παρότι λοιπόν και οι 3 κυκλίνες τύπου D προκαλούν καρκίνο του μαστού στα πειραματόζωα όταν εκφράζονται, υπάρχουν διαφορές μεταξύ τους. Αυτό αντανακλάται και στους διαφορετικούς φαινοτύπους των όγκων που προκαλούν, καθώς οι D1 και D2 προκαλούν αδενοκαρκινώματα ενώ η D3 κυρίως καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων (C. Elizabeth Caldon 2006, Amit Desphande et al. 2005).

Πέρα από τη δράση της στον κυτταρικό κύκλο, η κυκλίνη D1 φαίνεται πως έχει και άλλες λειτουργίες, και πως σχετίζεται άμεσα με την ρύθμιση ποικίλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι C/EBPβ, STAT3, DMP1, DETA2/Neurb. Ο πολυμορφισμός του γονιδίου της επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο. Συμπερασματικά λοιπόν η D1 εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο, αλλά επίσης και στην δράση άλλων μεταγραφικών παραγόντων, και στην κακοήθη εξαλλαγή (KE Knudsen et al. 2006).

Σε πολλές κακοήθειες η δράση του CDK4 είναι αυξημένη εξαιτίας απώλειας, μετάλλαξης ή 'σιωπής' του γονιδίου που κωδικοποιεί τον αναστολέα της CDK4, p16^{INK4a}. Για παράδειγμα, το p16^{INK4a} ανευρίσκεται συχνά απών στα μελανώματα.

Απώλεια του pRb παρατηρείται χαρακτηριστικά στο ρετινοβλάστωμα, αλλά και στο οστεοσάρκωμα, τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (Amit Desphande et al. 2005).

Το σύμπλοκο Cdk2-κυκλίνη E είναι ένας ακόμη από τους παράγοντες της οδού της pRb και αποτελεί έναν από τους κύριους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου που απορρυθμίζεται συχνά στα καρκινικά κύτταρα. Η κυκλίνη E έχει μελετηθεί εκτενώς στον καρκίνο και υπερεκφράζεται σε πολλά είδη όγκων, όπως ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα, του τραχήλου, του ενδομητρίου, του ΓΕΣ, τα λεμφώματα, οι λευχαιμίες, τα σαρκώματα. Η αυξημένη έκφραση της κυκλίνης E μπορεί να προκληθεί μέσω πολλών μηχανισμών: λόγω αύξησης του E2F στις διαταραχές της οδού pRb, λόγω ενίσχυσης του γονιδίου της E, ή λόγω ελαττωματικής προτεόλυσής της. Έχει χαρακτηριστεί προγνωστικός



δείκτης και σχετίζεται με την επιβίωση στον καρκίνο του μαστού, τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, το καρκίνωμα του λάρυγγα. Όσον αφορά την ογκογονική ικανότητα της κυκλίνης E, φαίνεται ότι δεν οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στην απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, αλλά και σε άλλους μηχανισμούς, όπως είναι η αστάθεια στο γονιδίωμα που προκαλεί. Μόνο ένα 10% των πειραματόζων που υπερεκφράζουν την κυκλίνη E αναπτύσσουν όγκους μαστού, σε διάστημα 8-13 μηνών, υποδηλώνοντας ότι η κυκλίνη E είναι πιο ασθενές ογκογονίδιο σε σχέση με τις κυκλίνες D. Επειδή φαίνεται ότι απαιτείται και η συνεργασία άλλων παραγόντων για να επιτευχθεί η ογκογονική δράση μπορεί να ειπωθεί ότι η κυκλίνη E αποτελεί απλά ένα βήμα σε μια διαδικασία πολλών σταδίων. Η κυκλίνη E αποτελεί προγνωστικό παράγοντα για τον καρκίνο του μαστού, και αυξημένη έκφρασή της σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση. Η συνύπαρξη χαμηλών επιπέδων p27Kip1 έχει μεγαλύτερη προγνωστική σημασία από την υπερέκφραση της κυκλίνης E μόνο (C. Elizabeth Caldon et al. 2006, H. C Hwang and Bruce E Clurman 2005).

Ενώ στα φυσιολογικά κύτταρα η κυκλίνη B1 αθροίζεται κυρίως στην G₂-M φάση, στα καρκινικά κύτταρα υπερεκφράζεται καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου και βρίσκεται συγκεντρωμένη στο κυτταρόπλασμα (A. M Egloff et al. 2006).

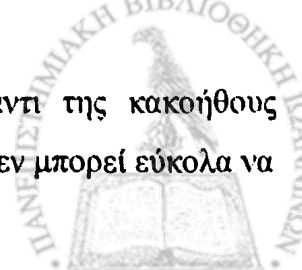
Η κυκλίνη A συχνά υπερεκφράζεται στην οξεία μυελοειδή λευχαιμία, όπου σχετίζεται με κακή πρόγνωση, καθώς και στον καρκίνο των όρχεων (A. M Egloff et al. 2006).

Ο ρόλος του p27 έχει μελετηθεί στον καρκίνο του μαστού. Καρκίνοι μαστού εμφανίζουν συχνά μειωμένα επίπεδα p27 σε σχέση με το υγιές επιθήλιο. Γενικά, μειωμένη έκφραση του p27 σχετίζεται με υψηλό βαθμό κακοήθειας και αρνητικούς υποδοχείς οιστρογόνων (C. Elizabeth Caldon et al. 2006). Τα αυξημένα επίπεδα του p27 σχετίζονται με αυξημένη περίοδο ελεύθερης νόσου και αυξημένη επιβίωση σε ασθενείς με Ca μαστού. Τα επίπεδα του p27 ανευρίσκονται αυξημένα σε όγκους με βραδύ ρυθμό πολλαπλασιασμού, υποδηλώνοντας το ρόλο του p27 ως αναστολέα του κυτταρικού κύκλου (Diana M. Barnes and Cheryl E. Gillett 1998).

Μειωμένη έκφραση του p27Kip1 παρατηρείται μεταξύ των άλλων και στον καρκίνο του προστάτη, και σχετίζεται με μειωμένη απάντηση στη θεραπεία, αυξημένο σκορ κατά Gleason, επιθετικές μεταστάσεις και πτωχή πρόγνωση (Derek F. Amanatullah et al. 2000).

Ο ρόλος του p21 στην έκβαση του καρκίνου του μαστού δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένος (C. Elizabeth Caldon et al. 2006).

Μελέτες σχετίζουν την έκφραση του p16 με αντίσταση έναντι της κακοήθους εξαλλαγής. Ωστόσο η σχέση μεταξύ έκφρασης του p16 και πρόγνωσης δεν μπορεί εύκολα να



προσδιοριστεί, και περιπλέκεται από το γεγονός ότι το p16 υπερεκφράζεται σε απώλεια ή ελάττωση του pRb. Γενικά, η υπερέκφραση του p16 σχετίζεται με κακή πρόγνωση (C. Elizabeth Caldon et al. 2006).



VIII. ΣΚΟΠΟΣ

Είναι γνωστό ότι ο καρκίνος του μαστού και του προστάτη είναι ορμονοεξαρτώμενοι, και μεταξύ άλλων παραγόντων καρκινογένεσης στην παθογένειά τους ενοχοποιείται και η προλακτίνη. Επειδή διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι σουλφυδρυλικές ενώσεις εμφανίζουν αντικαρκινογόνο δράση, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης της προλακτίνης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού και του προστάτη, και η επίδραση σουλφυδρυλικών ενώσεων στην δράση της προλακτίνης επί των παραπάνω κυτταρικών σειρών.



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ο ΠΡΟΪΟΝΤΑΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΕΙΝΑΙ Ο ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ. Ο ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΕΙΝΑΙ Ο ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ.

2. Ο ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΕΙΝΑΙ Ο ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ.

3. Ο ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΕΙΝΑΙ Ο ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ.



B. FIANCO MENDO



ΙΧ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΙΧΑ. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δυο ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων, τα κύτταρα MCF-7 του μαστού και τα κύτταρα DU-145 του προστάτη.

Τα κύτταρα MCF-7 είναι καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού που απομονώθηκαν από μια πλευριτική μετάσταση σε μια ασθενή 69 ετών με αδenoκαρκίνωμα μαστού. Διατηρούν αρκετά από τα χαρακτηριστικά των διαφοροποιημένων επιθηλιακών κυττάρων του μαστού και εκφράζουν τους υποδοχείς των οιστρογόνων. Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων τους κυμαίνεται από την υπερτριπλοειδία μέχρι την υποτετραπλοειδία, με την αναλογία 2S να εμφανίζεται σε ποσοστό περίπου 1%. Ο χρόνος διπλασιασμού τους είναι περίπου 29 ώρες. Τα κύτταρα DU-145 είναι ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα προστάτη που απομονώθηκαν από μια εγκεφαλική μετάσταση σε έναν ασθενή με καρκίνο προστάτη. Είναι μια υποτριπλοειδική κυτταρική σειρά. Οι πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά των κυττάρων προήλθαν από την Αμερικανική Συλλογή Κυτταρικών Καλλιιεργειών (American Type Culture Collection, ATCC), όπου και περιγράφονται αναλυτικά.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Για την διατήρηση και την ανάπτυξη των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma D5671), με συγκέντρωση 4,5 g/L D-γλυκόζη, εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου (fetal calf serum, PAA A15-043), 100 mU/ml πενικιλίνη, 10 μg/ml στρεπτομυκίνη (PAA P11-010) και 0,584 g/L L-γλουταμίνη (PAA M 11-004, LabClinics).

Για τη διενέργεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς phenol red (Sigma D1145), προκειμένου να αποφευχθεί η ασθενής οιστρογονική δράση της συγκεκριμένης ουσίας. Επίσης τα πειράματα έγιναν σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, προκειμένου να αποφευχθεί η επίδραση των αυξητικών παραγόντων και των ορμονών που



αυτός περιέχει, συμπεριλαμβανομένης και της PRL. Το θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς phenol red περιείχε 4,5 g/L D-γλυκόζη, 0,584 g/L L-γλουταμίνη και εμπλουτίστηκε ώστε να περιέχει 5μM ανθρώπινη ινσουλίνη (Sigma I9278), 0,1% w/v αλβουμίνη ανθρώπινου ορού (Sigma A6909) και 10 μg/ml τρανσφερίνη (Sigma T8158).

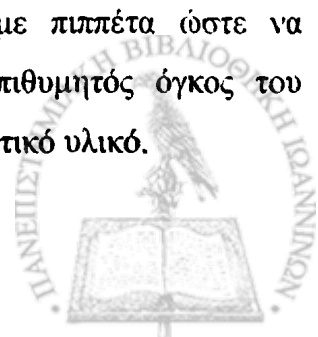
Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος PBS παρασκευάστηκε με διάλυση δισκίων PBS (Sigma P4417) σε δις αποσταγμένο νερό, σε αναλογία ενός δισκίου ανά 200 ml νερού, ώστε να προκύψει διάλυμα με τελικές συγκεντρώσεις 0,01 M phosphate buffer, 0,0027 M potassium chloride, 0,137 M sodium chloride, pH=7,4 στους 25 °C. Το διάλυμα αποστειρώθηκε αμέσως μετά την παρασκευή του σε αυτόκαυστο, στους 121 °C, και διατηρήθηκε στους 4 °C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

Για την αποκόλληση των κυττάρων από τα τρυβλία χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θρυψίνης/EDTA 0,05% και 0,02% w/v αντίστοιχα, σε PBS χωρίς Ca^{+2} και Mg^{+2} (LabClinics PAA L11-004).

3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥΣ

Όλες οι διαδικασίες της καλλιέργειας των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό χώρο υπό στείρες συνθήκες εργασίας. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε ειδικό επωαστικό κλίβανο υπό κατάλληλες συνθήκες υγρασίας, θερμοκρασίας 37 °C και ατμόσφαιρας 5% CO₂. Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν σε εστία κάθετης νηματικής ροής (tissue culture lamina flow hood), προκειμένου να αποφευχθεί η όποια επιμόλυνση από μικροοργανισμούς. Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα τρυβλία και υλικά μιας χρήσης.

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν προσκολλημένα σε μονοστοιβάδες (ταπήτιο) σε τρυβλία διαμέτρου 90 mm και θρεπτικό υλικό DMEM με 10% FCS. Όταν καταλαμβάνανε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου γινόταν ανακαλλιέργειά τους σε νέα τρυβλία. Κατά τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας τα κύτταρα εκπλένονταν δυο φορές με διάλυμα PBS 37 °C, και στη συνέχεια επώάζονταν για 5 λεπτά με ποσότητα 1 ml διαλύματος θρυψίνης/EDTA, ώστε να καλύπτεται όλη η επιφάνεια του τρυβλίου, προκειμένου να αποκολληθούν τα κύτταρα. Μετά την αποκόλληση των κυττάρων προστίθεται θρεπτικό υλικό με ορό ώστε να ανασταλεί η δράση της θρυψίνης και το κυτταρικό εναιώρημα αναδεύονταν με πιπέτα ώστε να διασπαστούν τα συσσωματώματα των κυττάρων. Στη συνέχεια επιθυμητός όγκος του διαλύματος μεταφερόταν σε νέα τρυβλία όπου προστίθετο φρέσκο θρεπτικό υλικό.

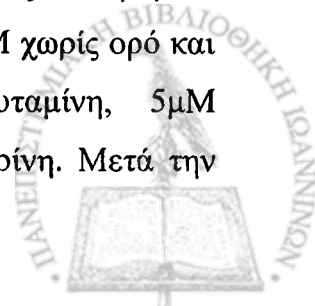


Για τη μακροχρόνια διατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η ψύξη τους σε υγρό άζωτο, σε θερμοκρασία $-192\text{ }^{\circ}\text{C}$ και μέσο αποθήκευσης που αποτελούνταν από 90% FCS και 10% DMSO (Sigma D2650). Κατά τη διαδικασία αυτή, τρυβλία με κύτταρα σε εκθετική φάση ανάπτυξης εκπλύθηκαν δυο φορές με διάλυμα PBS και επώαστηκαν με θρυψίνη για 5 min. Μετά την προσθήκη θρεπτικού υλικού και τη διάσπαση των συσσωματωμάτων με την πιπέτα το εναιώρημα τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο φυγοκεντρικό σωλήνα falcon και φυγοκεντρήθηκε στις 2000 rpm για 3 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε με αναρρόφηση το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 ml μέσου αποθήκευσης και μεταφέρθηκε σε αμπούλες ψύξης (cryovials). Οι αμπούλες τοποθετήθηκαν σε λουτρό πάγου για 20 λεπτά, μετά μεταφέρθηκαν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 24 ώρες, και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στους σε δοχείο υγρού αζώτου στους $-192\text{ }^{\circ}\text{C}$ για μακροχρόνια αποθήκευση. Με αυτό τον τρόπο επιτεύχθηκε σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία απόψυξης των κυττάρων οι αμπούλες μεταφέρθηκαν από τους $-192\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε υδατόλουτρο $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ όπου παρέμειναν 1-2 λεπτά μέχρι να ξεπαγώσει το περιεχόμενό τους. Στη συνέχεια το περιεχόμενο μεταφέρθηκε σε τρυβλίο όπου προστέθηκε θρεπτικό υλικό με 10% FCS και τοποθετήθηκε στον επωαστικό κλίβανο.

Για την καταμέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer chamber). Μετά την τρυψινοποίηση των κυττάρων όγκος 10 μl από το εναιώρημα τοποθετήθηκε στο αιμοκυτταρόμετρο και καταμετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων στα τετράγωνα της πλάκας με πλευρά 1 mm και αντίστοιχο όγκο $0,1\text{ mm}^3$, και στη συνέχεια υπολογίστηκε η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό διάλυμα.

4. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ ΜΕ TRYPAN BLUE

Η μελέτη της επίδρασης των διαφόρων ουσιών στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων έγινε αρχικά με την δημιουργία καμπυλών ανάπτυξης και προσδιορισμού των βιώσιμων κυττάρων με τη χρωστική trypan blue. Κύτταρα MCF-7 τοποθετήθηκαν σε πολυτρυβλία 24 θέσεων και επιφάνειας 2 cm^2 έκαστο, σε αρχική συγκέντρωση 3×10^4 κύτταρα/τρυβλίο, με 1 ml θρεπτικό υλικό DMEM + 10% FCS ανά τρυβλίο. Μετά από 24 ώρες τα τρυβλία εκπλύθηκαν για 2 φορές με PBS και προστέθηκε 1 ml θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς ορό και χωρίς phenol red, το οποίο περιείχε 4,5 g/L D-γλυκόζη, 0,584 g/L γλουταμίνη, 5 μM ινσουλίνη, 0,1% w/v αλβουμίνη ανθρωπίνου ορού και 10 $\mu\text{g/ml}$ τρανσφερρίνη. Μετά την



πάροδο άλλων 48 ωρών το θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και χωρίς phenol red ανανεώθηκε και προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις PRL (100-500 ng/ml), NAC (1-20 mM), MPG (0,5-2,5 mM) ή συνδυασμός αυτών. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τις υπό μελέτη ουσίες για 72 ώρες. Στη συνέχεια εκπλύθηκαν με PBS και επωάστηκαν με 100 μl θρυψίνης/EDTA για 10 min. Ακολούθως προστέθηκαν 900 μl θρεπτικού υλικού DMEM + 10% FCS και τα κύτταρα εναιωρήθηκαν στο μέσο και μεταφέρθηκαν σε φυγοκεντρικούς σωλήνες erpendorff. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκείμενου, επαναιώρηση των κυττάρων σε 50 μl PBS και προσθήκη 50 μl trypan blue. Η συγκεκριμένη χρωστική έχει την ιδιότητα να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες των νεκρών κυττάρων και να τους προσδίδει ένα μπλε χρώμα, ενώ αντίθετα τα ζωντανά κύτταρα δεν βάφονται από αυτή. Τα κύτταρα παρέμειναν στο μίγμα PBS/trypan blue για 10 λεπτά και στη συνέχεια επαναιωρήθηκαν και μια μικρή ποσότητα εναιωρήματος μεταφέρθηκε σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer όπου μετρήθηκαν τα ζωντανά και νεκρά κύτταρα στο μικροσκόπιο. Για κάθε διαφορετική συνθήκη χρησιμοποιήθηκαν 4 τρυβλία στο πολυτρυβλίο και όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον 3 φορές.

ΙΧΒ. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Κύτταρα τα οποία αναπτύχθηκαν σε τρυβλία και επωάστηκαν με τις υπό μελέτη ουσίες εκπλύθηκαν δυο φορές με διάλυμα 1mM EDTA pH=8,0 σε PBS θερμοκρασίας 4 °C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 3 ml διαλύματος 1mM EDTA σε PBS και τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο με τη χρήση ειδικού πλακιδίου σιλικόνης και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 rpm για 2 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 ml διαλύματος EDTA/PBS και τοποθετήθηκε σε σωλήνα erpendorff. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 3000 rpm για 5 λεπτά στους 4 °C. Ακολούθως το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και προστέθηκε διάλυμα RIPA (150 mM NaCl, 1% Triton-X100, 1% sodium deoxycholate, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH=7,5) που περιείχε αναστολείς πρωτεασών (2mM PMSF, 50mM NaF, 1 mM NaVO₄, 10 μg/ml leupeptin, 10 μm/ml leupstatin, 1mM EDTA), σε ποσότητα 50 μl διαλύματος ανά 10⁶ κύτταρα. Το κυτταρικό εναιώρημα αναδεύτηκε ισχυρά με σύριγγα και επωάστηκε για 20 λεπτά σε δοχείο με πάγο, στους 4 °C. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 14.000 rpm για 20 λεπτά στους 4 °C. Μετά το τέλος της

φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο που αποτελεί το εκχύλισμα των πρωτεϊνών μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο erpendorff και τοποθετήθηκε για αποθήκευση στους -80°C .

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο εκχύλισμα των κυττάρων υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Μετά την αλλαγή του χρώματος μετατοπίζεται το μέγιστο της απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 στα 595 nm. Η απορρόφηση του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο στα 595 nm.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών, 5μl του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος μεταφέρθηκε σε 795 μl δις αποσταγμένο νερό, σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα erpendorff. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl αντιδραστηρίου Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad). Το περιεχόμενο αναδεύτηκε και επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η απορρόφηση του μίγματος πρωτεΐνης-χρωστικής μετρήθηκε στα 595 nm σε φασματοφωτόμετρο (SHIMADZU UV-1601). Η αναγωγή της απορρόφησης στην ποσότητα πρωτεΐνης στο δείγμα έγινε με τη χρησιμοποίηση πρότυπης καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε με βάση την απορρόφηση διαλυμάτων γνωστών ποσοτήτων BSA (Sigma).

ΙΧΓ. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ SDS-PAGE.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου επιτρέπει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Laemmli (Laemmli, 1970) σε σύστημα δυο πηκτών, της πηκτής επιστοίβαξης και της πηκτής διαχωρισμού, τοποθετημένων μεταξύ δυο κάθετων γυάλινων πλακών. Ο σχηματισμός των δύο πηκτών στηρίζεται στον πολυμερισμό ενός μίγματος ακρυλαμιδίου και N, N'-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμιδίου μετά τη προσθήκη υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) και του καταλύτη τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED). Για τον προσδιορισμό των



πρωτεϊνών κυκλίνη B1, κυκλίνη D1, κυκλίνη E και E2F χρησιμοποιήθηκε πηκτή 10 %, ενώ για τον προσδιορισμό των p21 και p27 πηκτή 15 %.

Για την παρασκευή 15 ml πηκτής 15% αναμίχθηκαν 3,4 ml dd H₂O, 7,5 ml μίγματος ακρυλαμίδιου (30% ακρυλαμίδιο, 0,8% N, N'-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο), 3,8 ml Tris-HCl 1,5 M pH=8,8, 0,15 ml SDS 10%, 0,15 ml ammonium persulphate 10% και 6 μl TEMED (Sigma). Για την παρασκευή 15 ml πηκτής 10% αναμίχθηκαν 5,9 ml dd H₂O, 5,0 ml μίγματος ακρυλαμίδιου (30% ακρυλαμίδιο, 0,8% N, N'-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο), 3,8 ml Tris-HCl 1,5 M pH=8,8, 0,15 ml SDS 10%, 0,15 ml ammonium persulphate 10% και 6 μl TEMED (Sigma). Η ανάμιξη των υλικών πραγματοποιήθηκε σε σωληνάριο τοποθετημένο σε πάγο. Μετά την προσθήκη του TEMED το διάλυμα τοποθετήθηκε ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά προκειμένου να συμβεί ο πολυμερισμός.

Από κάθε πρωτεϊνικό δείγμα όγκος διαλύματος που να περιέχει 30 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των κυττάρων MCF-7 αναμίχθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (4x) (0,233 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,04 w/v κυανού της βρωμοφαινόλης, 12 w/v SDS, 40% v/v γλυκερόλη, 20% v/v μερκαπτοαιθανόλη), σε αναλογία 3 όγκων πρωτεϊνικού διαλύματος προς έναν όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης. Παρουσία μερκαπτοαιθανόλης και SDS διασπώνται οι γέφυρες -S-S- και το SDS ενώνεται με τις πρωτεΐνες, δημιουργώντας ανιονικά σύμπλοκα στα οποία ο λόγος του ανιονικού φορτίου της πρωτεΐνης προς τη μάζα της είναι σταθερός, επιτρέποντας έτσι τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος αλλά και το μέγεθος των πόρων της πηκτής.

Μετά την προσθήκη του διαλύματος φόρτωσης το μίγμα υπέστη βρασμό για 5 λεπτά στους 100 °C. στη συνέχεια τα δείγματα φορτώθηκαν στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini Protean II, Bio-Rad Laboratories, USA). Επίσης τοποθετήθηκε ένα δείγμα από μίγμα πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών (Fermentas SM 0441) που περιείχε λυσοζύμη (~20 kDa), β-λακτογλοβουλίνη (~26 kDa), ανθρακική ανυδράση (~34 kDa), ωλευκωματίνη (~47 kDa), βόειο λευκωματίνη (~86 kDa) και β-γαλακτοσιδάση (~120 kDa).

Στη συνέχεια τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πεδίο 100 V με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (0,025 M Tris, 0,192 M γλυκίνης, 0,1 w/v SDS), για 2-2,5 ώρες, ανάλογα με τη συγκέντρωση σε ακρυλαμίδιο της πηκτής διαχωρισμού.

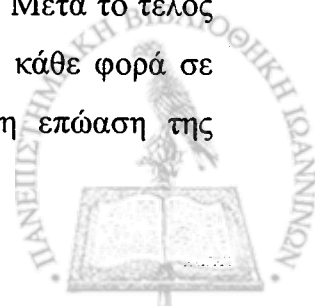


ΙΧΔ. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOT)

Μετά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών στην πηκτική πολυακρυλαμιδίου και το διαχωρισμό ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν από την πηκτική σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Hybond-C Extra, Amersham), με ηλεκτροφόρηση για μια ώρα σε πεδίο 90 V με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς (0,025 M Tris, 0,192 M γλυκίνης 20% v/v μεθανόλη) σε συσκευή Mini Transblot (Bio-Rad Laboratories, USA) και θερμοκρασία 4 °C (με την τοποθέτηση της συσκευής σε δοχείο με πάγο).

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης μεταφοράς η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης τοποθετήθηκε σε διάλυμα 5% w/v σκόνης άπαχου γάλακτος σε διάλυμα TBST (10 mM Tris-HCl pH=7,5, 150 mM NaCl, 0,05% v/v Tween 20), όπου επώαστηκε ολονυκτίως υπό ανάδευση στους 4 °C. Η πηκτική επώαστηκε για 2 ώρες υπό ανάδευση σε διάλυμα Coomassie Brilliant Blue (0,25 w/v coomassie brilliant blue, 9,2 w/v οξικό οξύ, 45,4 v/v μεθανόλη) και στη συνέχεια αποχρωματίστηκε υπό ανάδευση σε διάλυμα αποχρωματισμού (25% μεθανόλη και 7% οξικό οξύ).

Μετά την επώαση στο διάλυμα γάλακτος 5% η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εκπλύθηκε σε διάλυμα TBST για 5 λεπτά και στη συνέχεια επώαστηκε με τα διάφορα αντισώματα. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη αραιώθηκαν σε διάλυμα 1% w/v σκόνης άπαχου γάλακτος σε TBST, και οι αντίστοιχες αραιώσεις τους είναι: αντί-κυκλίνη D1 (Novocastra NCL-CYCLIN D1) 1:100, αντί-κυκλίνη B1 (Novocastra NCL-CYCLIN B1) 1:400, αντί-κυκλίνη E (Novocastra NCL-CYCLIN E1) 1:150, αντί- E2F-1 (KH95):sc-251 (Santa Cruz Biotechnology) 1:500, αντι-p27 (Novocastra NCL-p27) 1:200, αντι-p21 (187): sc-817 (Santa Cruz Biotechnology) 1:1000, αντί-ακτίνη β (A 5441, Sigma) 1:15.000. Η επώαση με τα αντισώματα διήρκησε για όλη τη νύχτα, υπό ανάδευση στους 4 °C για όλα τα αντισώματα πλην της ακτίνης, όπου η επώαση διήρκησε 2 ώρες. Μετά την επώαση με το πρώτο αντίσωμα οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές από διάστημα 5 λεπτών την κάθε φορά σε διάλυμα 1% w/v σκόνης άπαχου γάλακτος σε TBST, και στη συνέχεια επώαστηκαν με το δεύτερο αντίσωμα (anti-mouse) της Pierce συνδεδεμένο με την υπεροξειδάση του ραπανιού, σε αραιώση 1:5000 και χρόνο επώασης 1,5 ώρα. Μετά το τέλος της επώασης η μεμβράνη εκπλύθηκε 3 φορές από διάστημα 5 λεπτών την κάθε φορά σε διάλυμα 1% w/v σκόνης άπαχου γάλακτος σε TBST και ακολούθησε η επώαση της



μεμβράνης με διάλυμα χημειοφωταύγειας (Amersham) για 2 λεπτά και η εμφάνιση του πρωτεϊνικού αποτυπώματος με την έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ ακτίνων X (Kodak).



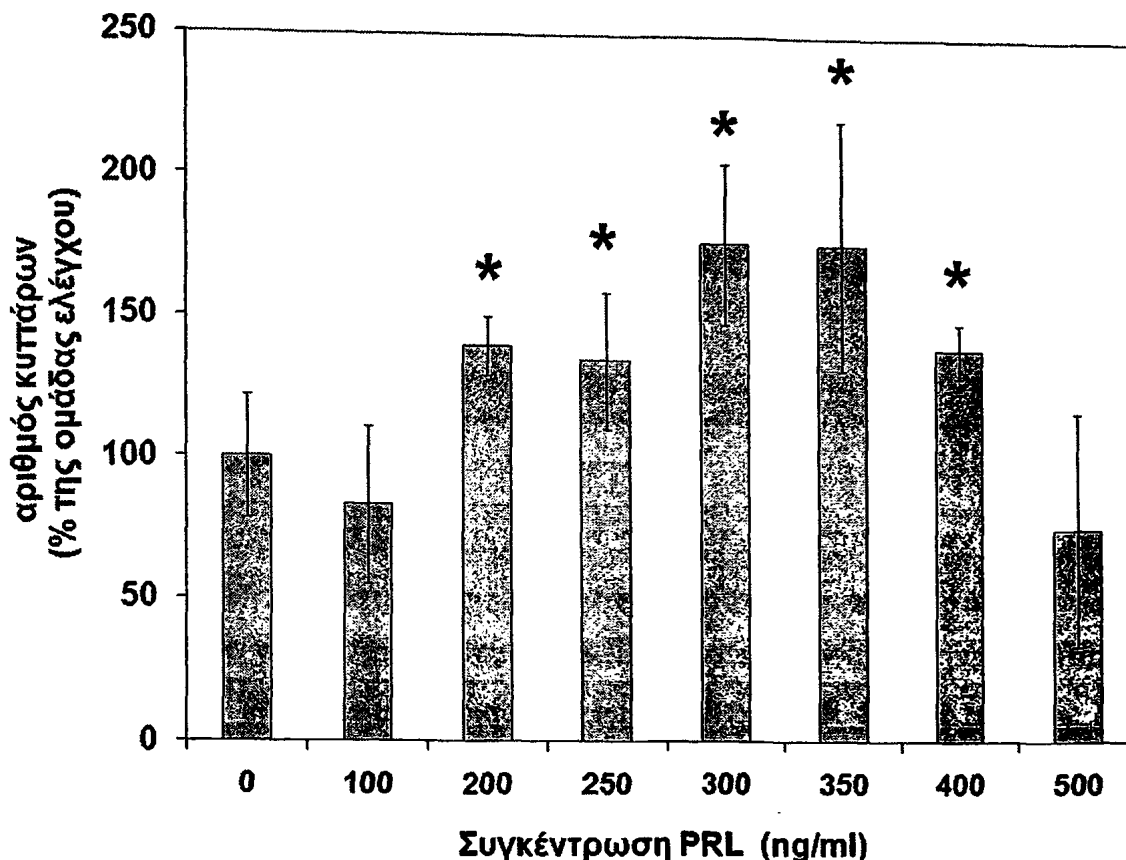
Χ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΧΑ. Η επίδραση της PRL, της NAC, της MPG και του συνδυασμού τους στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7

ΧΑ1. Η επίδραση της PRL στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της προλακτίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7, τα κύτταρα επώαστηκαν με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις PRL (50-500 ng/ml). Πριν την προσθήκη της PRL τα κύτταρα παρέμειναν σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και χωρίς phenol red για διάστημα 48 ωρών, προκειμένου να αποφευχθεί η επίδραση των θρεπτικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένης και της προλακτίνης, που ο ορός περιέχει, καθώς και η ασθενής οιστρογονική δράση του phenol red. Στη συνέχεια προστέθηκε η προλακτίνη στις υπό μελέτη συγκεντρώσεις. Η επίδραση συγκρίθηκε έναντι του πολλαπλασιασμού των MCF-7 κυττάρων σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού (ομάδα ελέγχου) μετά από διάστημα επώασης 72 ωρών με μέτρηση των κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer κατόπιν χρώσης τους με trypan blue. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα Β1, η PRL επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7 έναντι της ομάδας ελέγχου, και η δράση είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) για τιμές 200-400 ng/ml PRL, με το μέγιστο αποτέλεσμα να παρατηρείται στις συγκεντρώσεις 300-350 ng/ml PRL. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η δράση της PRL μειώνεται. Είναι ένα φαινόμενο που έχει περιγραφεί και πιθανότατα ευθύνεται στον κορεσμό όλων των υποδοχέων της PRL από τα μόριά της, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν ελεύθεροι υποδοχείς ώστε να σχηματίσουν τα διμερή που απαιτούνται προκειμένου να μεταβιβαστεί το σήμα της ορμόνης ενδοκυττάρια.





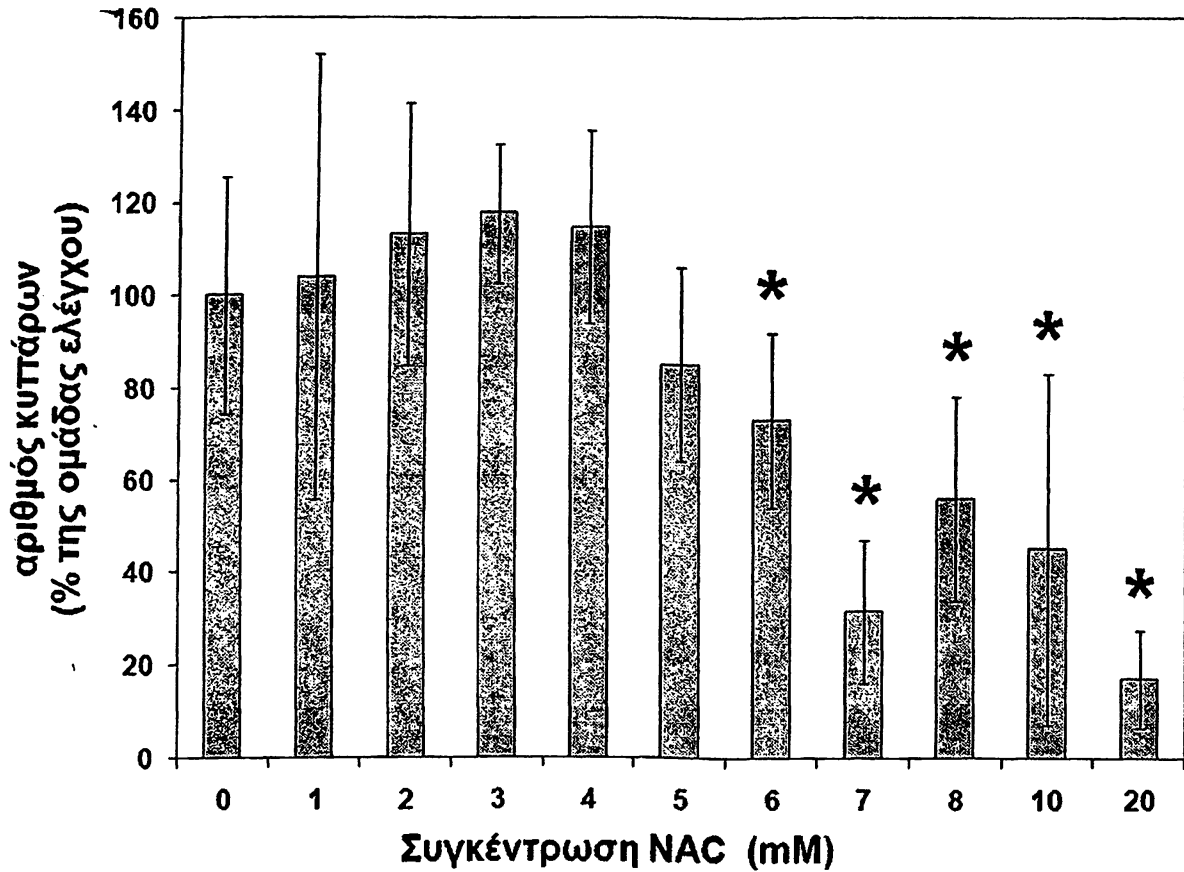
Συγκέντρωση PRL (ng/ml)	0	100	200	250	300	350	400	500
Μέσος αριθμός κυττάρων %	100	83	139,40	134,53	176,28	175,97	138,96	75

Σχήμα Β1: η επίδραση της PRL στον πολλαπλασιασμό των MCF-7 κυττάρων μετά από 72 ώρες. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο \pm SE. Το * συμβολίζει διαφορά στατιστικά σημαντική έναντι της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$).

ΧΑ2. Η επίδραση της NAC στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της NAC στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7, διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις NAC (1-20 mM) προστέθηκαν σε κύτταρα MCF-7 που προηγουμένως επώαστηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και χωρίς phenol red. Ο αριθμός των κυττάρων μετρήθηκε σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer 72 ώρες μετά την προσθήκη της ουσίας. Η επίδραση της NAC στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων έναντι της ομάδας ελέγχου φαίνεται στο Σχήμα Β2. Συγκεκριμένα, η NAC σε μικρές συγκεντρώσεις 1-4 mM επάγει σε μικρό βαθμό τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7,

όμως η επίδραση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική ($P>0,05$). Σε συγκεντρώσεις 5-20 mM η NAC αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, και η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική για συγκεντρώσεις NAC >6 mM ($P<0,05$).



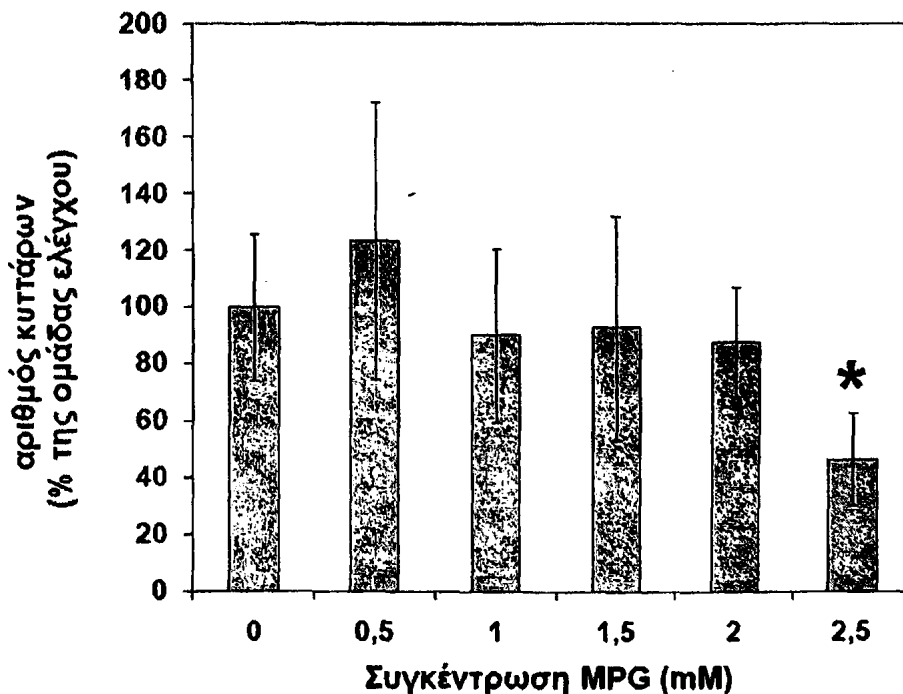
Συγκέντρωση NAC (mM)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	10	20
Μέσος αριθμός κυττάρων %	100	103,91	113,14	117,71	114,63	85,06	72,91	31,62	55,98	45,04	17,04

Σχήμα B2: η επίδραση της NAC στον πολλαπλασιασμό των MCF-7 κυττάρων μετά από 72 ώρες. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο \pm SE. Το * συμβολίζει διαφορά στατιστικά σημαντική έναντι της ομάδας ελέγχου ($p<0,05$).



ΧΑ3. Η επίδραση της N-2-(Μερκαπτοπροπιονυλ)-γλυκίνης στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της MPG στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7, διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις MPG (0,5-2,5 mM) προστέθηκαν σε κύτταρα MCF-7 που προηγουμένως αναπτύχθηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Η επίδραση της MPG στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μετά από 72 ώρες έναντι της ομάδας ελέγχου φαίνεται στο Σχήμα Β3. Συγκεκριμένα, η MPG σε συγκέντρωση 0,5 mM επάγει σε μικρό βαθμό τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7, όμως η επίδραση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική ($P>0,05$). Σε συγκέντρωση 2,5 mM η MPG αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, και η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($P<0,05$). Σε συγκεντρώσεις 1-2 mM δεν ασκεί ιδιαίτερη επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.



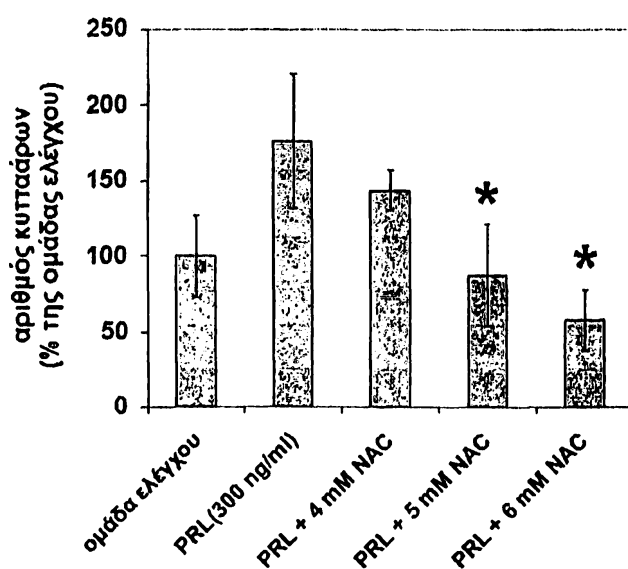
Συγκέντρωση MPG (mM)	0	0,5	1	1,5	3	2,5
Μέσος αριθμός κυττάρων %	100	123,27	90,20	93,08	87,91	46,48

Σχήμα Β3: η επίδραση της MPG στον πολλαπλασιασμό των MCF-7 κυττάρων μετά από 72 ώρες. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο \pm SE. Το * συμβολίζει διαφορά στατιστικά σημαντική έναντι της ομάδας ελέγχου ($p<0,05$).



ΧΑ4. Η επίδραση της NAC στον επαγόμενο από την PRL πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της NAC στον επαγόμενο από την PRL πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7 προστέθηκαν ταυτόχρονα στο θρεπτικό υλικό PRL και NAC. Η PRL προστέθηκε σε συγκέντρωση που προκαλεί την μέγιστη αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (300 ng/ml), ενώ για την NAC μελετήθηκαν 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις: i) συγκέντρωση 4 mM NAC, η οποία προκαλεί μικρή αλλά όχι στατιστικά σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού των MCF-7, ii) συγκέντρωση 5 mM NAC, η οποία προκαλεί μικρή αλλά όχι στατιστικά σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των MCF-7, iii) συγκέντρωση 6 mM NAC, η οποία προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7. Όπως φαίνεται στο Σχήμα Β4, η δράση της PRL αναστέλλεται με την παρουσία και των 3 διαφορετικών συγκεντρώσεων της NAC. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της NAC, τόσο μεγαλύτερη η αναστολή της δράσης της PRL, η οποία είναι στατιστικά σημαντική για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 5 mM NAC.



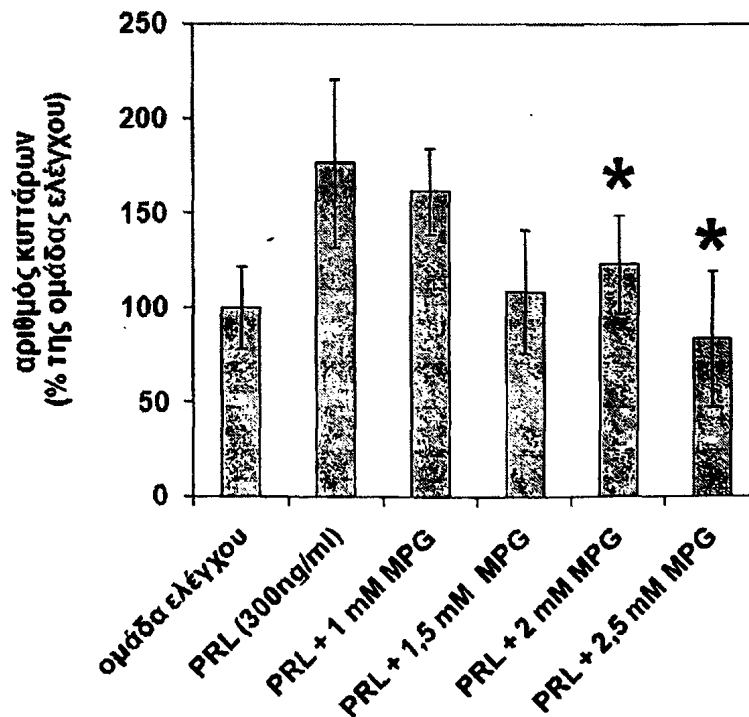
Συγκεντρώσεις PRL + NAC	Ομάδα ελέγχου	PRL (300 ng/ml)	PRL + 4 mM NAC	PRL + 5 Mm NAC	PRL + 6 mM NAC
Μέσος αριθμός κυττάρων %	100	176,28	86,04	143,58	87,48

Σχήμα Β4: η επίδραση της NAC στον επαγόμενο από την PRL πολλαπλασιασμό των MCF-7 κυττάρων μετά από 72 ώρες. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο \pm SE. Το * συμβολίζει διαφορά στατιστικά σημαντική έναντι της δράσης 300 ng/ml PRL.



ΧΑ5. Η επίδραση της MPG στον επαγόμενο από την PRL πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της MPG στον επαγόμενο από την PRL πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7 προστέθηκαν ταυτόχρονα στο θρεπτικό υλικό PRL και MPG. Η PRL προστέθηκε σε συγκέντρωση που προκαλεί την μέγιστη αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (300 ng/ml), ενώ για την MPG μελετήθηκαν συγκεντρώσεις από 1-2,5 mM. Όπως φαίνεται στο Σχήμα Β5, η MPG σε συγκεντρώσεις 1,5- 2,5 mM ανταγωνίζεται την επίδραση της PRL στον πολλαπλασιασμό των MCF-7 κυττάρων. Στις συγκεντρώσεις 2mM και 2,5mM MPG η διαφορά στον πολλαπλασιασμό είναι στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με την δράση της PRL.



Συγκεντρώσεις PRL + MPG	Ομάδα ελέγχου	PRL (300 ng/ml)	PRL + 1 mM MPG	PRL + 1,5 Mm MPG	PRL + 2 mM MPG	PRL + 2,5 mM MPG
Μέσος αριθμός κυττάρων %	100	176,28	161,57	108,44	123,38	83,60

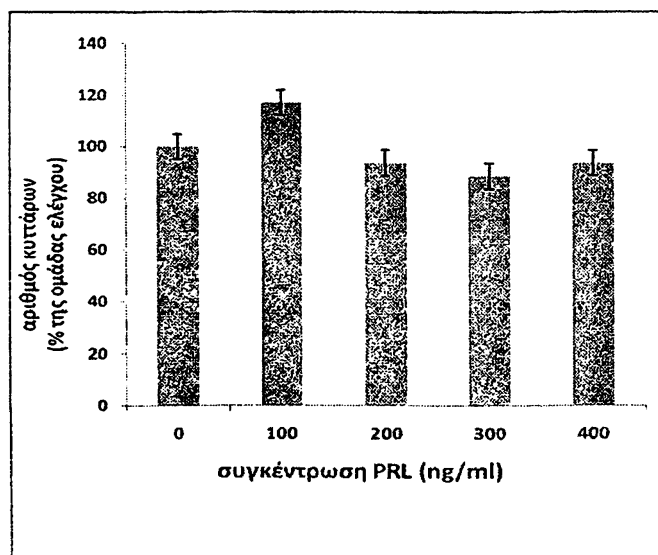
Σχήμα Β5: η επίδραση της MPG στον επαγόμενο από την PRL πολλαπλασιασμό των MCF-7 κυττάρων μετά από 72 ώρες. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο \pm SE. Το * συμβολίζει διαφορά στατιστικά σημαντική έναντι της δράσης 300 ng/ml PRL.



XB. Η επίδραση της PRL, της NAC , της MPG και του συνδυασμού τους στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτη DU-145

XB1. Η επίδραση της PRL στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτη DU-145

Η επίδραση της PRL στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων DU-145 μελετήθηκε υπό τις ίδιες συνθήκες που έγινε και η μελέτη της επίδρασης της PRL στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Τα κύτταρα παρέμειναν για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς phenol red και χωρίς ορό και κατόπιν προστέθηκε σε αυτά η PRL σε δόσεις 100-400 ng/ml. Ύστερα από επώαση 72 ωρών εκτιμήθηκε ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων με μέτρησή του σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, κατόπιν χρώσης με trypan blue. Όπως φαίνεται και στο σχήμα B6, η PRL σε δόση 100 ng/ml επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, σε μικρό όμως βαθμό. Αντίθετα, η δράση της εξαφανίζεται σε μεγαλύτερες δόσεις.



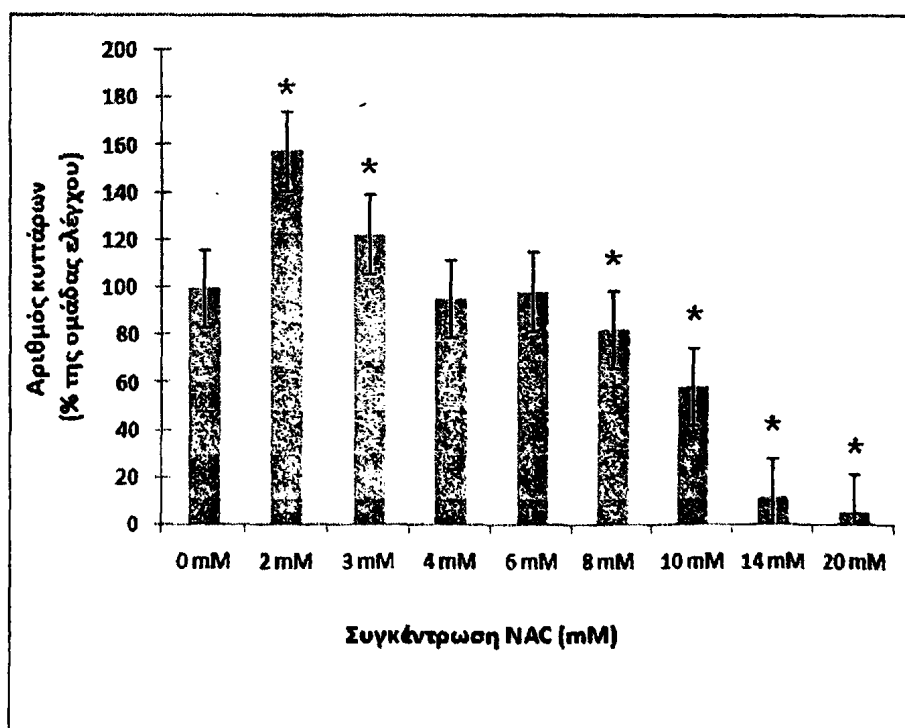
Συγκέντρωση PRL (ng/ml)	0	100	200	300	400
Μέσος αριθμός κυττάρων %	100	116,95	93,72	88,68	93,66

Σχήμα B6. η επίδραση της PRL στον πολλαπλασιασμό των DU-145 κυττάρων μετά από 72 ώρες. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο \pm SE



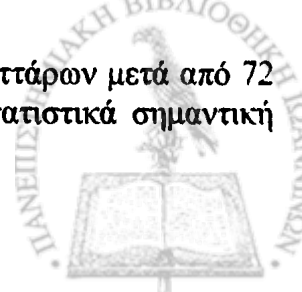
XB2. Η Επίδραση της NAC στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτη DU-145

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της NAC στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων DU-145, διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις NAC (1-20 mM) προστέθηκαν σε κύτταρα DU-145 που προηγουμένως επώαστηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και χωρίς phenol red. Ο αριθμός των κυττάρων μετρήθηκε σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer 72 ώρες μετά την προσθήκη της ουσίας. Η επίδραση της NAC στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων έναντι της ομάδας ελέγχου φαίνεται στο σχήμα Β7. Συγκεκριμένα, η NAC σε μικρές συγκεντρώσεις 2 και 3 mM επάγει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων DU-145-7 ($P < 0,05$). Σε συγκεντρώσεις 4-6 mM η NAC δεν εμφανίζει ιδιαίτερη επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ μειώνει τον πολλαπλασιασμό τους σε συγκεντρώσεις άνω των 8 mM και η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($P < 0,05$).



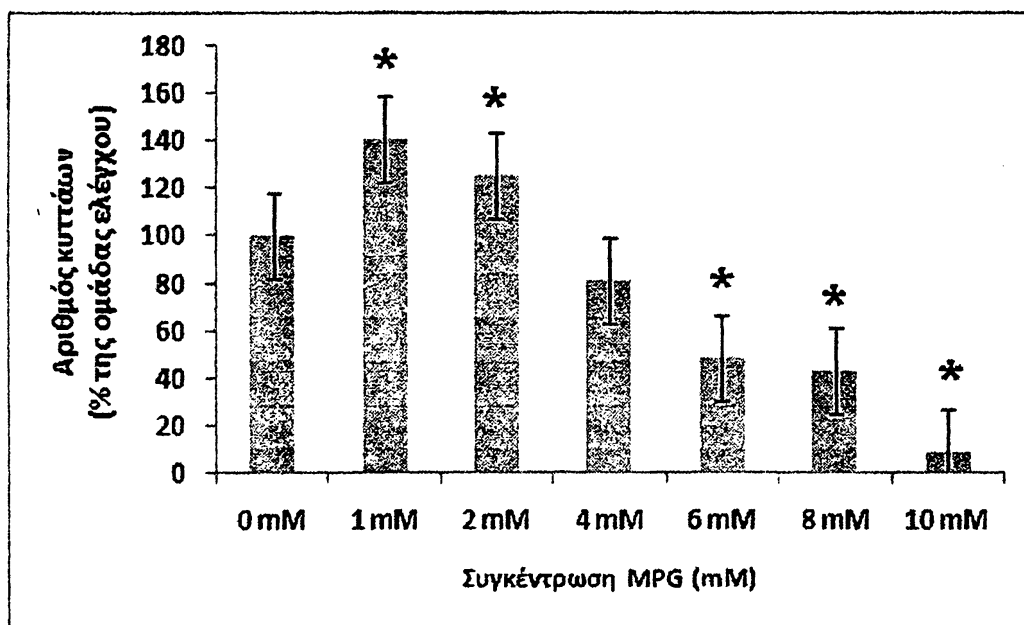
Συγκέντρωση NAC (mM)	0	2	3	4	6	8	10	14	20
Μέσος αριθμός κυττάρων %	100	157,90	123,02	95,83	98,79	83,02	58,82	11,84	5,35

Σχήμα Β7: η επίδραση της NAC στον πολλαπλασιασμό των DU-145 κυττάρων μετά από 72 ώρες. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο \pm SE. Το * συμβολίζει διαφορά στατιστικά σημαντική έναντι της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$).



XB3. Η επίδραση της N-2-(Μερκαπτοπροπιονυλ)-γλυκίνης στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτη DU-145

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της MPG στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων DU-145, διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις MPG (mM) προστέθηκαν σε κύτταρα DU-145 που προηγουμένως επώαστηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και χωρίς phenol red. Ο αριθμός των κυττάρων μετρήθηκε σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer 72 ώρες μετά την προσθήκη της ουσίας. Η επίδραση της MPG στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων έναντι της ομάδας ελέγχου φαίνεται στο σχήμα B8. Αναλυτικά, η MPG σε μικρές συγκεντρώσεις 1 και 2 mM, προκαλεί μια στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των κυττάρων ($p > 0,05$). Σε μεγαλύτερη δόση 4 mM δεν εμφανίζει σημαντική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ αντίθετα σε δόσεις > 6 mM προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού των κυττάρων ($p > 0,05$).



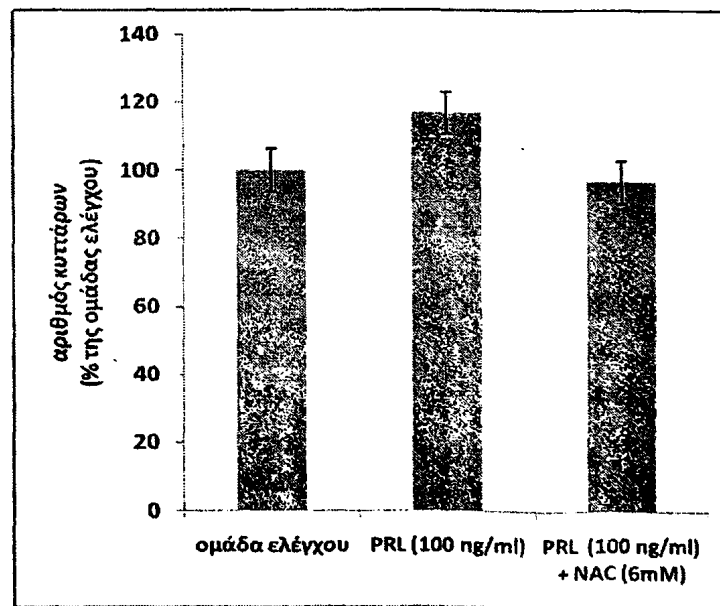
Συγκέντρωση MPG (mM)	0	1	2	4	6	8	10
Μέσος αριθμός κυττάρων %	100	141,26	125,88	81,58	48,76	43,04	8,7175

Σχήμα B8: η επίδραση της MPG στον πολλαπλασιασμό των DU-145 κυττάρων μετά από 72 ώρες. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο \pm SE. Το * συμβολίζει διαφορά στατιστικά σημαντική έναντι της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$).



XB4. Η επίδραση της NAC στον επαγόμενο από την PRL πολλαπλασιασμό των κυττάρων DU-145

Παρότι η επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από την προλακτίνη δεν είναι σημαντικού βαθμού, εξετάστηκε η επίδραση μη τοξικών δόσεων της NAC (6 mM) στην επίδραση αυτή. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία 100 ng/ml PRL και 6 mM NAC για 72 ώρες, αφού είχε προηγηθεί ανάπτυξή τους για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορμόνη και phenol red. Όπως φαίνεται στο σχήμα B9, παρουσία της NAC η δράση της PRL αναστέλλεται, με αντίστοιχο τρόπο με αυτόν που παρατηρείται και στην περίπτωση των κυττάρων του μαστού.



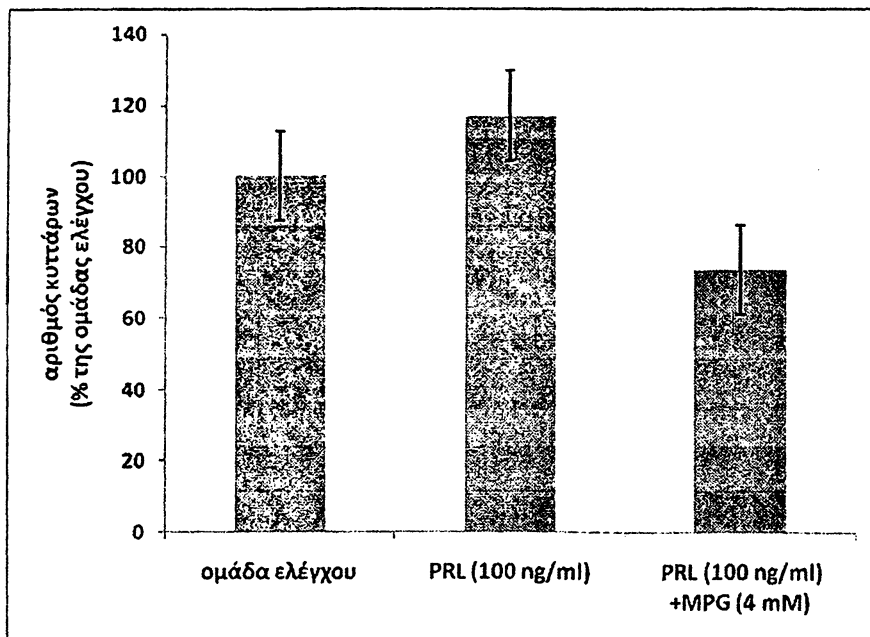
Συγκέντρωση ουσιών	Ομάδα ελέγχου	PRL (100 ng/ml)	PRL (100 ng/ml) + 6 mM NAC
Μέσος όρος κυττάρων %	100	116,95	96,63

Σχήμα B9: η επίδραση της NAC στον επαγόμενο από την PRL πολλαπλασιασμό των DU-145 κυττάρων μετά από 72 ώρες. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο \pm SE.



XB5. Η επίδραση της MPG στον επαγόμενο από την PRL πολλαπλασιασμό των κυττάρων DU-145

Εξετάστηκε η επίδραση της MPG στον επαγόμενο από την PRL πολλαπλασιασμό των DU-145 σε δόση 4 mM, η οποία ασκεί μια μη στατιστική σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία 100 ng/ml PRL και 3 mM MPG για 72 ώρες, αφού είχε προηγηθεί ανάπτυξή τους για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και phenol red. Όπως φαίνεται στο σχήμα B10, παρουσία της MPG η δράση της PRL αναστέλλεται, με αντίστοιχο τρόπο με αυτόν που παρατηρείται και στην περίπτωση των κυττάρων του μαστού.



Συγκέντρωση ουσιών	Ομάδα ελέγχου	PRL (100 ng/ml)	PRL (100 ng/ml) + 4 mM MPG
Μέσος όρος κυττάρων %	100	116,95	73,66

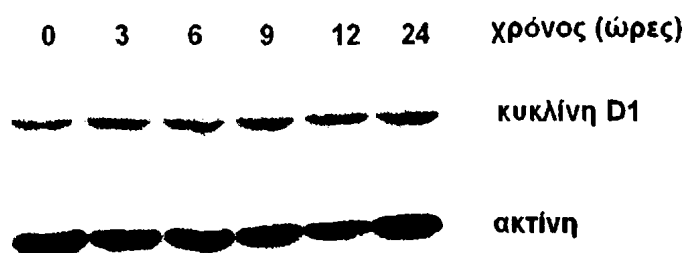
Σχήμα B10: η επίδραση της MPG στον επαγόμενο από την PRL πολλαπλασιασμό των DU-145 κυττάρων μετά από 72 ώρες. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο \pm SE.

ΧΓ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ PRL ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΩΝ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Προκειμένου να διερευνήσουμε το μηχανισμό με τον οποίο η PRL επάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και το μηχανισμό με τον οποίο η NAC και η MPG αναστέλλουν αυτή τη δράση, μελετήσαμε την έκφραση των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου με αποτύπωμα κατά Western (Western blot). Εφ' όσον η δράση της PRL είναι στατιστικά σημαντική μόνο στην κυτταρική σειρά MCF-7, ενώ στη σειρά DU-145 η επίδραση είναι μικρή, επιλέχθηκε η σειρά MCF-7 έναντι της DU-145 για την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της PRL χωρίς την παρουσία άλλων ουσιών. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν αρχικά για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς phenol red και χωρίς ορό, εμπλουτισμένο με ινσουλίνη, τρανσφερρίνη και αλβουμίνη όπως και στην περίπτωση της διενέργειας καμπυλών ανάπτυξης, και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αλλάχτηκε και προστέθηκε PRL σε δόση 300 ng/ml. Ακολούθως, ελήφθησαν εκχυλίσματα των πρωτεϊνών των κυττάρων στις 3, 6, 9, 12 και 24 ώρες μετά την προσθήκη της PRL, καθώς και τη στιγμή πριν την προσθήκη (ώρα 0). Στη συνέχεια ανιχνεύτηκε με western blot η έκφραση σε κάθε χρονική στιγμή των εξής πρωτεϊνών: κυκλίνη D1, κυκλίνη E, κυκλίνη B1, E2F, p21 και p27. Έγινε επίσης ανίχνευση της έκφρασης της ακτίνης, προκειμένου να ελεγχθεί η ύπαρξη ίσης ποσότητας συνολικής πρωτεΐνης στο κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν τα εξής:

ΧΓ1. Έκφραση της κυκλίνης D1 μετά την επίδραση της PRL

Όπως φαίνεται και στην εικόνα B1, μετά την επίδραση της PRL η έκφραση της κυκλίνης D1 αυξάνει μετά τις 3 ώρες και παραμένει αυξημένη και για τις άλλες χρονικές στιγμές.

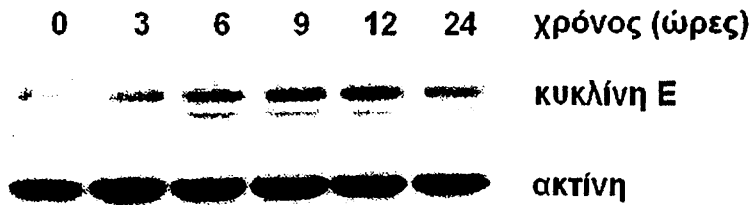


Εικόνα B1: Έκφραση της κυκλίνης D1 μετά την επίδραση της PRL στα MCF-7 κύτταρα



ΧΓ2. Έκφραση της κυκλίνης E μετά την επίδραση της PRL

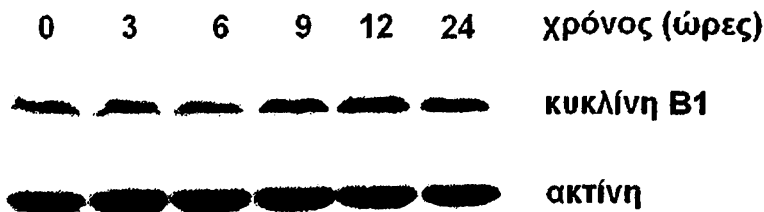
Όπως φαίνεται και στην εικόνα B2, μετά την επίδραση της PRL η έκφραση της κυκλίνης E αυξάνει κυρίως μετά τις 6 ώρες, και παραμένει αυξημένη και για τις άλλες χρονικές στιγμές. Μετά τις 12 ώρες υπάρχει μια μείωση των επιπέδων της, που συνδέεται με την πρόοδο του κύκλου από τη φάση G1/S στην G2/M.



Εικόνα B2: Έκφραση της κυκλίνης E μετά την επίδραση της PRL στα κύτταρα MCF-7

ΧΓ3. Έκφραση της κυκλίνης B1 μετά την επίδραση της PRL

Όπως φαίνεται και στην εικόνα B3, μετά την επίδραση της PRL η έκφραση της κυκλίνης B1 αυξάνει κυρίως μετά τις 9 ώρες και παραμένει αυξημένη έκτοτε. Η κυκλίνη B1 είναι κυκλίνη της G2 φάσης και γι' αυτό η αύξηση των επιπέδων της ακολουθεί χρονικά την αύξηση των κυκλινών της G1 φάσης, όπως είναι η κυκλίνη D1.

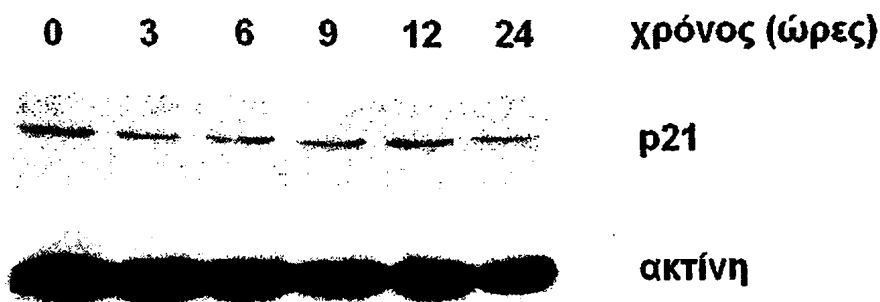


Εικόνα B3: Έκφραση της κυκλίνης B1 μετά την επίδραση της PRL στα κύτταρα MCF-7



ΧΓ4. Έκφραση του p21 μετά την επίδραση της PRL

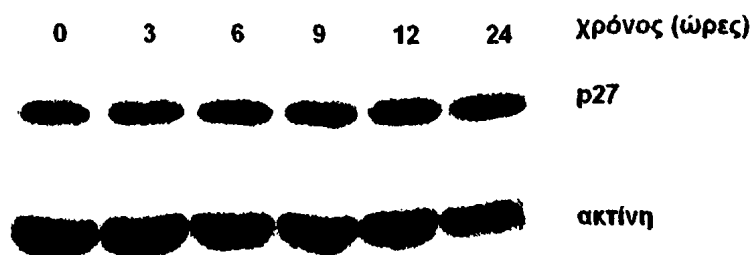
Το p21 είναι ένας από τους αναστολείς του κυτταρικού κύκλου. Μελετήθηκε η επίδραση της PRL στην έκφρασή του, και όπως φαίνεται και στην εικόνα B4 μετά την επίδραση της PRL παρατηρείται σε ορισμένα δείγματα μια μείωση της έκφρασής του, κυρίως μετά από 3 και 6 ώρες, που είναι όμως μικρού βαθμού και μόλις υποσημεινόμενη.



Εικόνα B4: Έκφραση του p21 μετά την επίδραση της PRL στα κύτταρα MCF-7

ΧΓ5. Έκφραση του p27 μετά την επίδραση της PRL

Το p27 είναι ένας από τους αναστολείς του κυτταρικού κύκλου. Μελετήθηκε η επίδραση της PRL στην έκφρασή του, και όπως φαίνεται και στην εικόνα B5, μετά την επίδραση της PRL δεν παρατηρήθηκε εμφανής μείωση της έκφρασής του στα πειράματά μας.

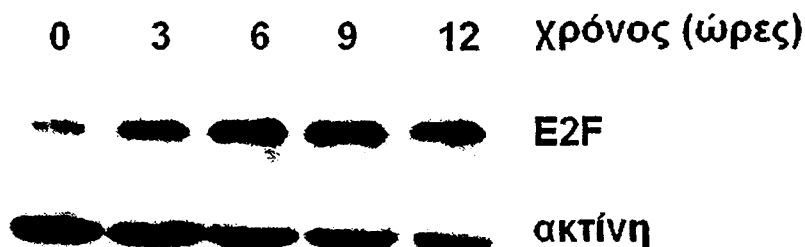


Εικόνα B5: Έκφραση του p27 μετά την επίδραση της PRL στα κύτταρα MCF-7



ΧΓ6. Επίδραση της PRL στα επίπεδα έκφρασης του E2F.

Η φωσφορυλίωση του pRb από το σύμπλοκο κυκλίνη D1-Cdk 4/6 έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του συμπλέγματος E2F, με συνέπεια την σύνθεση των μορίων που επάγουν τον κυτταρικό κύκλο, αλλά και του ίδιου του E2F. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 6, μετά την επίδραση της PRL αυξάνουν τα επίπεδα του E2F ήδη από τις 3 ώρες μετά την επίδραση.



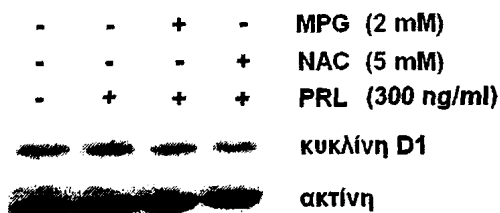
Εικόνα 6: Επίδραση της PRL στα επίπεδα έκφρασης του E2F στα κύτταρα MCF-7

ΧΔ. Αναστολή της επίδρασης της PRL επάνω στους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου από τις σουλφυδρυλικές ενώσεις NAC και MPG

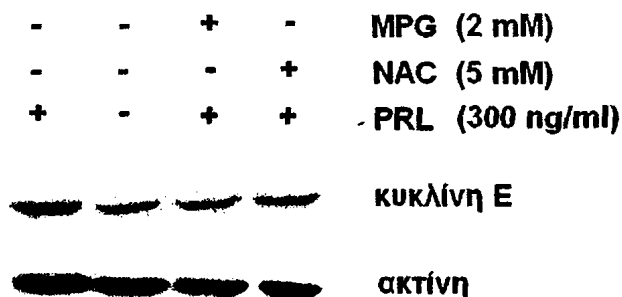
Εφόσον παρατηρήσαμε πως η PRL προκαλεί αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7 η οποία συνοδεύεται από αύξηση της έκφρασης των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου σε μοριακό επίπεδο, μελετήσαμε πως η αναστολή της δράσης της PRL, από τις ουσίες MPG και NAC, έχει αντίστοιχα επίδραση στην έκφραση των ρυθμιστών του κύκλου. Με βάση τα πειράματα από την προσθήκη μόνο PRL στα κύτταρα, φαίνεται πως τη χρονική στιγμή των 9 ωρών υπάρχουν εμφανείς διαφορές στην έκφραση όλων των ρυθμιστών που επηρεάζονται από την PRL, έναντι της ομάδας ελέγχου των 0 ωρών. Γι' αυτό το λόγο και επιλέχθηκε αυτή η χρονική στιγμή για να μελετηθεί η επίδραση των NAC και MPG πάνω στη δράση της PRL. Επιλέχθηκαν συγκεντρώσεις NAC και MPG που δεν επηρέαζαν την ανάπτυξη των κυττάρων όταν χορηγούνταν από μόνες τους, και συγκεκριμένα συγκεντρώσεις 5 mM NAC και 2 mM MPG. Από την άλλη, αν και οι ουσίες σε αυτές τις συγκεντρώσεις δεν επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη δράση της PRL. Κύτταρα που αναπτύχθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες όπως και στα προηγούμενα πειράματα, επώαστηκαν για 9 ώρες παρουσία 300 ng/ml PRL, συνδυασμού 300

mg/ml PRL και 5 mM NAC, και συνδυασμού 300 mg/ml PRL και 2 mM MPG. Παράλληλα ελήφθησαν και πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα που αναπτύχθηκαν απουσία των υπό μελέτη ουσιών. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων είναι τα παρακάτω:

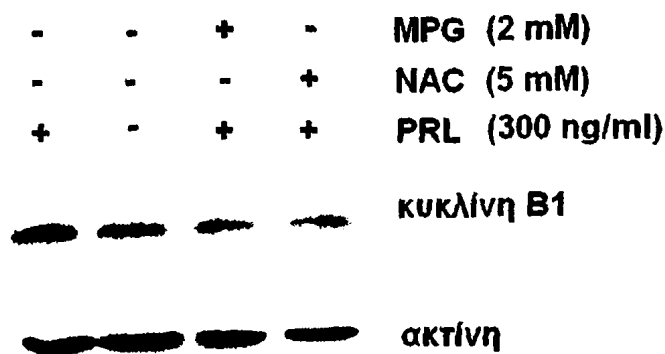
Όπως φαίνεται στις εικόνες B6-B9, παρουσία NAC ή MPG αναστέλλεται η προκαλούμενη από την PRL αύξηση της έκφρασης της κυκλίνης D1, της κυκλίνης E, της κυκλίνης B1 και του παράγοντα E2F.



Εικόνα B6: αναστολή της προκαλούμενης από την PRL αύξηση της κυκλίνης D1 από τις NAC και MPG, στις 9 ώρες

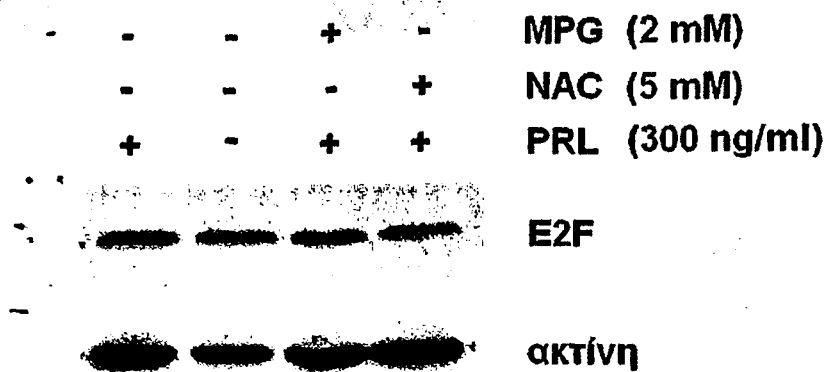


Εικόνα B7: αναστολή της προκαλούμενης από την PRL αύξηση της κυκλίνης E από τις NAC και MPG, στις 9 ώρες



Εικόνα B8: αναστολή της προκαλούμενης από την PRL αύξηση της κυκλίνης B1 από τις NAC και MPG, στις 9 ώρες



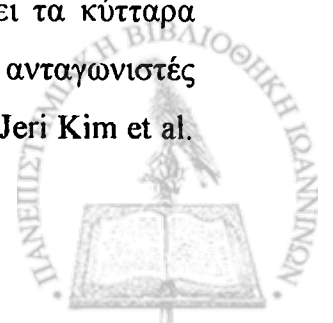


Εικόνα Β9: αναστολή της προκαλούμενης από την PRL αύξηση του E2F από τις NAC και MPG, στις 9 ώρες



XI. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του μαστού και ο καρκίνος του προστάτη είναι οι κύριοι καρκίνοι που σχετίζονται με το γυναικείο και το ανδρικό φύλο αντίστοιχα. Ένα από τα κοινά τους χαρακτηριστικά είναι το γεγονός ότι είναι ορμονοεξαρτώμενοι, με τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα να διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στην κάθε περίπτωση. Μια ορμόνη της οποίας ο ρόλος μελετάται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια είναι η προλακτίνη. Υπάρχουν αρκετά δεδομένα, τουλάχιστον σε πειραματικό επίπεδο, που τη συσχετίζουν με τον καρκίνο του μαστού, και λιγότερο με τον καρκίνο του προστάτη. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η δράση της όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυτταρικών σειρών MCF-7 του μαστού και DU-145 του προστάτη, και η αναστολή αυτής της δράσης από τις ουσίες N-ακετυλκυστεΐνη και N-2-μερκαπτοπροπιονυλγλυκίνη. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση μόνο της PRL κάτω από κατάλληλες συνθήκες, δηλαδή απουσία των θρεπτικών παράγοντων του ορού και απουσία οιστρογονικής δράσης άλλων ουσιών όπως το rhenol red. Σύμφωνα με τα πειράματά μας, η PRL επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μαστού σε σημαντικό βαθμό σε σχέση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου. Η δράση της είναι σταδιακά αυξανόμενη όσο αυξάνεται η συγκέντρωση, εμφανίζει στη συνέχεια ένα επίπεδο και μετά σταδιακά μειώνεται. Η ικανότητα της να επάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού, συμπεριλαμβανομένων και των MCF-7 έχει ήδη περιγραφεί, καθώς και το φαινόμενο της μειωμένης δράσης της πάνω από μια συγκέντρωση, που αποδίδεται στον κορεσμό όλων των υποδοχέων της από ένα μόριο της PRL, με αποτέλεσμα την έλλειψη ελεύθερων υποδοχέων και αδυναμία διμερισμού τους. (Biswas R, Vonderhaar BK 1987, Clevenger CV et al. 2003, Vonderhaar BK 1998). Τα αποτελέσματα της επίδρασης της PRL ήταν λιγότερο εμφανή στα κύτταρα του προστάτη DU-145. Υπό τις συνθήκες των πειραμάτων μας, η PRL εμφάνισε ασθενή μόνο δράση στην αύξηση του πολλαπλασιασμού τους. Υπάρχουν μελέτες όπου η PRL εμφανίζει θετική δράση πάνω στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του προστάτη, αλλά και άλλες που την αμφισβητούν. Ωστόσο ακόμη και όταν δεν αυξάνει τον πολλαπλασιασμό τους, προστατεύει τα κύτταρα αυτά από την απόπτωση ή αντίθετα ο πολλαπλασιασμός τους μειώνεται από ανταγωνιστές της PRL ή απουσία της έκφρασής της (Wang AM et al. 1989, Xu X et al. 2001, Jeri Kim et al. 2003).



Η NAC είναι μια ουσία που αποτελεί πρόδρομο της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης, και η οποία έχει μελετηθεί πειραματικά σε εκτεταμένο βαθμό, λόγω και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων που εμφανίζει. Προστατεύει τα κύτταρα από τη δράση καρκινογόνων παραγόντων, τουλάχιστον *in vitro* και σε πειράματα με πειραματόζωα. Όσον αφορά τη δράση της στην ανάπτυξη των κυττάρων, υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, πειραματικά η NAC αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των μυϊκών κυττάρων (Geun-Ho Kim et al. 2006), ενώ μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ενδομητρίου (Yan Wu Sun and Wei Go 2006). Στα κύτταρα MCF-7 του πειράματός μας η NAC σε μικρές δόσεις αυξάνει, αλλά όχι σημαντικά, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, σε ενδιάμεσες δόσεις δεν έχει καμία δράση, ενώ σε υψηλότερες τον μειώνει σημαντικά. Μια παρόμοια δράση εμφανίζει στα κύτταρα MCF-7 και η MPG, δηλαδή σε χαμηλές δόσεις αυξάνει σε μικρό βαθμό τον πολλαπλασιασμό τους, δεν τον επηρεάζει σε ενδιάμεσες, ενώ τον μειώνει σε υψηλές δόσεις, όπου εμφανίζει πλέον και τοξική δράση. Όσον αφορά τη δράση των NAC και MPG στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων DU-145, εμφανίζονται ομοιότητες με τη δράση στα κύτταρα MCF-7. Συγκεκριμένα, στα DU-145 τόσο η NAC όσο και η MPG προκαλούν σε μικρές δόσεις αύξηση του πολλαπλασιασμού τους, όμως στην περίπτωση αυτή η αύξηση είναι μεγαλύτερου βαθμού από ό,τι στα κύτταρα του μαστού, και στατιστικά σημαντική έναντι της ομάδας ελέγχου. Σε ενδιάμεσες συγκεντρώσεις οι δυο ουσίες δεν ασκούν δράση στον πολλαπλασιασμό, ενώ σε υψηλότερες μειώνουν τον αριθμό των κυττάρων. Η δράση αυτή θα μπορούσε ενδεχομένως να σχετίζεται με το γεγονός ότι τα αντιοξειδωτικά μπορούν να εμφανίζουν τόσο προ-οξειδωτική όσο και αντιοξειδωτική δράση, με την μια ή την άλλη να επικρατεί ανάλογα με τις συνθήκες.

Διερευνώντας περαιτέρω το μηχανισμό επαγωγής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων από την PRL, καθώς και την αναστολή του φαινομένου από τις NAC και MPG, προχωρήσαμε σε μελέτη της έκφρασης σε πρωτεϊνικό επίπεδο των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου κυκλίνη D1, κυκλίνη E, κυκλίνη B1, E2F, p21 και p27.

Όσον αφορά την κυκλίνη D1, παρατηρήθηκε αύξηση της σύνθεσής της με την προσθήκη της προλακτίνης. Αυτό συμφωνεί και με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, σύμφωνα με τα οποία η προλακτίνη αυξάνει τα επίπεδα της συγκεκριμένης κυκλίνης, η δε αναστολή της δράσης της προλακτίνης σχετίζεται με αντίστοιχη μείωσή τους. Συγκεκριμένα, η προσθήκη εξωγενούς PRL επάγει τον πολλαπλασιασμό και την σύνθεση της κυκλίνης D1 στις 3 και 6 ώρες μετά την προσθήκη σε κύτταρα MCF-7 που δεν παράγουν τα ίδια προλακτίνη (PRE-1), όχι όμως στα MCF-7 που την παράγουν ενδογενώς. Η αύξηση αυτή σχετίζεται με αύξηση της

φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος Rb στις 9 ώρες και 12 ώρες μετά την προσθήκη. Ο ρόλος της D1 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων φαίνεται και από το γεγονός ότι νουκλεοτίδια με αλληλουχία αντίθετης φοράς (antisense nucleotides) κατά της D1 αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων PRE-1, και 400 nM αυτών μειώνουν τα επίπεδα της κυκλίνης D1 στα κύτταρα που επώαστηκαν με PRL σε επίπεδα όμοια με αυτά των κυττάρων που δεν επώαστηκαν με PRL (Schroeder MD et al. 2002, Jennifer L. Brockman et al. 2002).

Η αύξηση του πολλαπλασιασμού των MCF-7 κυττάρων που δεν παράγουν PRL σχετίζεται επίσης με αυξημένη φωσφορυλίωση της Stat-5 στην τυροσίνη (Y694). Η προσθήκη του μιμητικού μορίου (mimic) της φωσφορυλιωμένης PRL, S179D-PRL προκαλεί αναστολή τη δράση της WT-PRL στον πολλαπλασιασμό των ίδιων κυττάρων, γεγονός που εκτός από μειωμένη σύνθεση της κυκλίνης D1 συνδέεται επίσης και με αναστολή της φωσφορυλίωσης της Stat-5 (Schroeder Matthew D et al. 2003).

Η αύξηση του πολλαπλασιασμού των MCF-7 και T47D κυττάρων με την επίδραση της PRL προκαλεί αύξηση της κυκλίνης D1 μέσω της επαγωγής των Src κινασών και των οδών PI3K και Fak/Erk 1/2 (Juan J Acosta et al. 2003).

Το κλάσμα 16kDa της hPRL έχει τη ιδιότητα να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων της αορτής βοός ασκώντας τη δράση του στη φάση G₀-G₁ όσο και την G₂-M, και η δράση στην φάση G₀-G₁ σχετίζεται με μείωση της σύνθεσης τη κυκλίνης D1, όπως ανιχνεύεται σε πρωτεϊνικό επίπεδο με western blot και σε επίπεδο mRNA με Northern blot (Sebastien P Tabruyn et al. 2005)

Στα πειράματά μας η προσθήκη της PRL προκάλεσε επίσης αύξηση και άλλων ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, όπως της κυκλίνης E, της κυκλίνης B1, του παράγοντα E2F, ενώ αντίθετα δεν παρατηρήσαμε ιδιαίτερες μεταβολές στους αναστολείς του κυτταρικού κύκλου p21 και p27, πλην μιας μικρής, μόλις υποσημαινόμενης μείωσης του p21. Τα αποτελέσματα αυτά επίσης συμβαδίζουν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας. Συγκεκριμένα, η επίδραση της PRL πάνω στην έκφραση των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου έχει περιγραφεί πιο καλά σε κύτταρα MCF-7 που δεν παράγουν τα ίδια PRL (κύτταρα PRE-1), παρά στα MCF-7 που εμφανίζουν αυτοκρινή δράση της ορμόνης. Αναλυτικά, η PRL αυξάνει ελαφρά την κυκλίνη E σε διάφορες χρονικές στιγμές στα PRE-1 κύτταρα, μέχρι και 24 ώρες. Δεν υπάρχουν δεδομένα για τα MCF 7-1 (Schroeder MD et al. 2002).



Η PRL αυξάνει επίσης την κυκλίνη B1 στα PRE-1 κύτταρα στις 6, 9, 12 h, αλλά τέτοιες μεταβολές παρατηρούνται πολύ λίγο ή καθόλου στα MCF-7 που παράγουν τα ίδια PRL (Schröder MD et al. 2002).

Το κλάσμα 16 KDa της hPRL έχει την ιδιότητα να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των αορτικών ενδοθηλιακών κυττάρων βοός, ασκώντας δράση τόσο στην G₀-G₁, όσο και την G₂-M, και η δράση στην G₂-M σχετίζεται με μειωμένη σύνθεση της κυκλίνης B1, όπως αυτή ανιχνεύεται με western blot σε πρωτεϊνικό επίπεδο. (Sebastien P Tabruyn et al. 2005)

Η PRL μειώνει την p21 στις 9-και 12 ώρες στα PRE-1 κύτταρα και την αυξάνει σε κάποιο βαθμό, στις 3 ώρες σε ορισμένα πειράματα. Αντίθετα δεν υπάρχει τέτοια δράση στα MCF-7 που παράγουν τα ίδια PRL (Schröder MD et al. 2002).

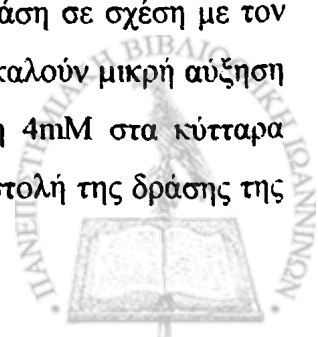
Το κλάσμα 16KDa της hPRL δρώντας μέσω της βραχείας μορφής του PRLR έχει την ιδιότητα να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των αορτικών επιθηλιακών κυττάρων βοός, ασκώντας δράση τόσο στην G₀-G₁, όσο και την G₂-M, και η δράση αυτή σχετίζεται με αύξηση της σύνθεσης το p21, όπως αυτή ανιχνεύεται με northern blot σε επίπεδο mRNA. (Sebastien P Tabruyn et al. 2005)

Η S179D-PRL δρώντας μέσω της βραχείας μορφής του PRLR έχει την ιδιότητα να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων προστάτη (DU-145, LNCaP, PC-3), ιδιότητα που σχετίζεται με αυξημένη σύνθεση του p21, όπως αυτή ανιχνεύεται με Western blot. (Wei Wu et al. 2005).

Η προλακτίνη δεν έχει δράση στο p27, ούτε στα PRE-1, ούτε στα MCF-7 κύτταρα (Schröder MD et al. 2002).

Το κλάσμα 16KDa της hPRL δρώντας μέσω της βραχείας μορφής του PRLR έχει την ιδιότητα να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των αορτικών επιθηλιακών κυττάρων βοός, ασκώντας δράση τόσο στην G₀-G₁, όσο και την G₂-M, και η δράση αυτή σχετίζεται με αύξηση της σύνθεσης το p27, όπως αυτή ανιχνεύεται με western blot σε πρωτεϊνικό επίπεδο. (Sebastien P. Tabruyn et al. 2005).

Στα πειράματά μας η NAC και η MPG αναστέλλουν την δράση της PRL, σε συγκεντρώσεις μη τοξικές για τα κύτταρα, τόσο στα κύτταρα του μαστού όσο και στα κύτταρα του προστάτη, και μάλιστα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Η επίδραση αυτή είναι εντονότερα εμφανής στο μαστό, όπου και η PRL ασκεί ισχυρότερη δράση σε σχέση με τον προστάτη. Μάλιστα ακόμη και συγκεντρώσεις που από μόνες τους προκαλούν μικρή αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, όπως η NAC σε συγκέντρωση 4μM στα κύτταρα MCF-7, όταν συνδυαστούν με την PRL έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της



PRL. Η αναστολή της δράσης της PRL στα κύτταρα συνοδεύεται και από την αντίστοιχη σε μοριακό επίπεδο μείωση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου, κυκλίνης D1, κυκλίνης E, κυκλίνης B1 και E2F. Ήδη αναφέρθηκε ότι η NAC έχει την ιδιότητα να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε πολλές περιπτώσεις, ενώ σε άλλες τον αυξάνει. Η ιδιότητα της αυτή συνοδεύεται από μεταβολές των μορίων-ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου στα διάφορα συστήματα. Αναλυτικότερα, πειράματα με ινοβλάστες ποντικών (NIH3T3) έδειξαν ότι η NAC έχει την ιδιότητα να αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στην G₁ φάση. Η αναστολή αυτή είναι αναστρέψιμη μετά την απομάκρυνση της NAC, δεν σχετίζεται με κυτταρικό θάνατο και συνοδεύεται από αναστολή της ενεργοποίησης της οδού των MAP κινασών p44 MAPK και p42MAPK και μειωμένη έκφραση της κυκλίνης D1 (Madhavi Sekharam et al. 1998).

Επίσης η NAC αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ινών αορτής στην φάση G₀ με τρόπο επίσης αναστρέψιμο, που δεν οφείλεται σε κυτταρικό θάνατο και που επίσης συνοδεύεται από μειωμένη έκφραση της κυκλίνης D1, όπως αυτή ανιχνεύεται με Northern blot. (Jahn S. Lee et al. 1998).

Η NAC σε δόσεις που δεν προκαλούν απόπτωση ή κυτταρικό θάνατο αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο των εμβρυικών ινοβλαστών ποντικίου, μεταβάλλοντας το ενδοκυττάριο οξειδοαναγωγικό περιβάλλον σε μια πιο αναγωγική κατάσταση και προκαλεί μείωση της κυκλίνης D1, αύξηση του p27 και μείωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος pRb. Οι συγκεκριμένες δράσεις δεν οφείλονται σε μεταβολή της συγκέντρωσης της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (Sarita G. Menon et al. 2003)

Η NAC έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων PC12 (κύτταρα φαιοχρωμοκυττώματος), με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA τους. Μάλιστα η συγκεκριμένη δράση είναι ανεξάρτητη της σύνθεσης της GSH, και πιθανολογείται πως οφείλεται στην ικανότητα της NAC να δρα ως αναγωγικός παράγοντας (Chao Yun et al. 1995). Επίσης αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στην G₁ φάση μέσω επαγωγής του p16^{INK4a} (Ming Liu et al. 1999).

Σε μια άλλη μελέτη η NAC έχει πάλι την ιδιότητα να προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού των αστεροειδών ηπατικών κυττάρων του ήπατος επίμυων, χωρίς όμως η αναστολή αυτή να σχετίζεται με μειωμένη παραγωγή της κυκλίνης D1, ούτε με μειωμένη παραγωγή των μορίων του κυτταρικού κύκλου cdk2, cdk4, κυκλίνη E ή κυκλίνη A (Kawada Nurifumi et al. 1998).



Σε κυτταρικές σειρές ερυθροειδούς λευχαιμίας HEL η NAC μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και σε δόση 20 mM προκαλεί αύξηση της έκφρασης του p27 και μείωση της έκφρασης της κυκλίνης D2 (όπως ανιχνεύεται με ανοσοαποτύπωση) γεγονός που υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας σε ρυθμιστικές οδούς της μετάβασης από την φάση G1 στην S (Christoph Walz et al. 2006).

Στην παρούσα μελέτη φαίνεται πως η NAC αναστέλλει την μιτογόνο δράση της προλακτίνης. Πέρα από την καθαρτή δράση της ουσίας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η ιδιότητά της να αναστέλλει τη μιτογόνο δράση διαφόρων παραγόντων έχει περιγραφεί και σε διάφορα άλλα συστήματα. Για παράδειγμα, στα κύτταρα P-3T3 η μιτογόνο δράση του TPA αναστέλλεται από την NAC, με αποτέλεσμα μειωμένη σύνθεση του DNA και μειωμένη έκφραση της κυκλίνης D1 στα κύτταρα όπως ανευρίσκεται με ανίχνευση του mRNA της κυκλίνης D1 με northern blot (Tze-Sing Huang et al., 1995).

Στα αιμοποιητικά κύτταρα 32Dcl3 η NAC αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό χωρίς να επηρεάζει την επιβίωση των κυττάρων (δηλαδή χωρίς να τη μειώνει), και προκαλεί αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στην G₀/G₁ φάση και μείωση του ποσοστού στην S φάση, όπως καταγράφεται με κυτταρομετρία ροής. Επίσης αναστέλλει τον προκαλούμενο από τις κυτοκίνες πολλαπλασιασμό των ίδιων κυττάρων και επιδρά στους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου προκαλώντας μείωση των επιπέδων της κυκλίνης E και της D2, του c-Myc και της φωσφορυλίωσης του pRb, ενώ αυξάνει σημαντικά την έκφραση του p27. Η δράση αυτή της NAC οφείλεται στις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες (Mitsuko Iiyama et al. 2006).

Σε καλλιέργειες κυττάρων αστροκυττώματος η NAC αναστέλλει την αύξηση του πολλαπλασιασμού που προκαλούν ο ορός και το H₂O₂ (Agora-Kuruganti P et al. 1999).

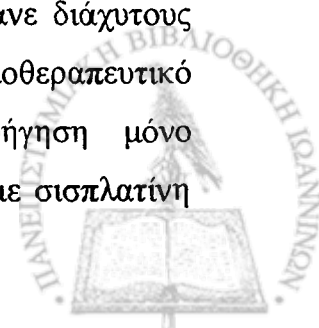
Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ενδεχομένως η NAC να εμφανίζει διαφορετικές δράσεις όσον αφορά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα καρκινικά κύτταρα από ότι στα μη καρκινικά: μειώνει την κυκλίνη D1 και αυξάνει το p27 στα κύτταρα MCF-10A, αλλά όχι στα MCF-7 και τα MDA-MB-231 (Menon SG et al. 2005).

Η δράση της MPG στα πειράματά μας φαίνεται να είναι παρόμοια με της NAC. Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν δεδομένα όσον αφορά τη δράση της MPG σε σχέση με την μιτογόνο δράση της PRL, και γενικά τα στοιχεία για τη δράση της ουσίας στον πολλαπλασιασμό των διαφόρων κυττάρων είναι περιορισμένα σε σχέση με όσα υπάρχουν για την NAC. Για παράδειγμα μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στο αναγεννώμενο ήπαρ (Gulizar Atmaca 2004), (Sujata Ohri et al. 2002), ενώ εμφανίζει μια παράδοξη επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Jurkat όπου σε μικρές δόσεις αναστέλλει τον

πολλαπλασιασμό τους, προκαλώντας απόπτωση ή νέκρωση, ενώ σε μεγαλύτερες δεν έχει επίδραση (Daniel Hernandez-Saavedra et al. 2003).

Όσον αφορά την αντικαρκινική δράση της NAC, εκτός από τα *in vitro* δεδομένα σε κυτταροκαλλιέργειες, η NAC ασκεί αντικαρκινική δράση και *in vivo*, σε πειραματόζωα. Αναλυτικά, χορηγούμενη *p.os* εμφανίζει προστατευτική δράση έναντι της ανάπτυξης καρκίνου στα C57BL6 mice κατόπιν υποδόριας ένεσης κυττάρων μελανώματος B16-BL6 στο άκρο τους. Η προστατευτική δράση αφορά τόσο την παράταση του χρόνου επιβίωσης τους όσο και το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου, ο δε συνδυασμός με δοξορουβικίνη ασκεί συνεργική προστατευτική δράση μειώνοντας τόσο τον αριθμό των τοπικά αναπτυσσόμενων όγκων όσο και παρεμποδίζοντας τις πνευμονικές μεταστάσεις, με αποτέλεσμα παράταση του χρόνου επιβίωσης (Silvio De Flora et al. 1996). Όσον αφορά την επίδραση της NAC στην εξέλιξη των ήδη υπάρχοντων όγκων, έχει βρεθεί πως η χορήγηση NAC σε ποντικούς στους οποίους έχουν ενοφθαλμιστεί καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB-435 έχει ως αποτέλεσμα αναστολή της ανάπτυξης τόσο των πρωτοπαθών όγκων όσο και των λεμφαδενικών και πνευμονικών μεταστάσεών τους. Επίσης εμφανίζεται κεντρική νέκρωση του όγκου. Η αναστολή της ανάπτυξης του όγκου συσχετίζεται με την πρόκληση απόπτωσης και με μείωση της αγγείωσης του όγκου (η μελέτη αυτή δείχνει την επίδραση της NAC σε βεβαιωμένους όγκους). Η NAC προκαλεί αντιαγγειογένεση μέσω της παραγωγής αγγειοστατίνης με αποτέλεσμα ενδοθηλιακή απόπτωση και το αγγειακό *collapsus* μέσα στον όγκο. Από την παρούσα μελέτη μια ενδιαφέρουσα προοπτική θα ήταν η πιθανή χορήγηση θειολών αντιοξειδωτικών που θα μπορούσαν ενδεχομένως να προκαλέσουν μείωση της αιμάτωσης και νέκρωση σε υπάρχοντες όγκους (Anshu Agarwal et al. 2004).

Υπάρχουν επίσης δεδομένα για την αντικαρκινική δράση της MPG *in vivo*. Συγκεκριμένα, η MPG προλαμβάνει την καρκινογένεση ή δρα συνεργικά με τα αντινεοπλασματικά φάρμακα στην ανάπτυξη των όγκων. Η χορήγηση MPG σε συνδυασμό με βιταμίνη C και βιταμίνη E εμποδίζει μερικώς την προκαλούμενη από το βενζο-α-πυρένιο (BaP) ογκογένεση στους επίμυες Wistar. Η θεραπευτική χορήγηση των ίδιων αντιοξειδωτικών οδηγεί σε πλήρη υποστροφή σε ποσοστό 16,8% των προκαλούμενων όγκων, στα δε υπόλοιπα πειραματόζωα προκαλεί στατιστικά σημαντική αύξηση της επιβίωσης έναντι της ομάδας ελέγχου (A. Evangelou et al. 1997). Σε ποντίκια που εμφανίζανε διάχυτους ενδοπεριτοναϊκούς όγκους η χορήγηση MPG σε συνδυασμό με το χημειοθεραπευτικό νεοκαρζινοστατίνη αύξανε την επιβίωση, σε σύγκριση με την χορήγηση μόνο νεοκαρζινοστατίνης (Andrei L et al. 2002). Επίσης η χορήγηση MPG μαζί με σισπλατίνη



μειώνει περαιτέρω την ανάπτυξη των όγκων που προκαλούνται σε ποντίκια μετά την υποδόρια εμφύτευση λευχαιμικών κυττάρων P388, σε σύγκριση με την χορήγηση σισπλατίνης μόνο (Maofu Fu 2004).

Ορισμένα από τα μόρια των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου έχουν επίσης ιδιαίτερη προγνωστική αξία στην περίπτωση του καρκίνου και θεωρούνται ότι έχουν δράση ογκογονιδίων. Η κυκλίνη D1 αποτελεί ογκογονίδιο για τον καρκίνο του μαστού, αλλά θεωρείται ασθενές και απαιτείται η δράση και άλλων ογκογονιδίων για να εκφραστεί πλήρως. Παρότι υπάρχει σχέση ανάμεσα στην υπερέκφραση της κυκλίνης D1 και του ER, οι πιο πολλές κλινικές μελέτες δεν σχετίζουν τα επίπεδα D1 με πρόγνωση. Με βάση τον ρόλο της D1 στον καρκίνο του μαστού, η αναστολή της δράσης της ενδεχομένως μελλοντικά να συνεισφέρει θεραπευτικά στην αντιμετώπιση της νόσου (Andrew Arnold and Alexandros Papanikolaou 2005), (C. Elizabeth Caldon et al. 2006), (Amit Desphande et al. 2005).

Τα αντιοιστρογόνα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού μειορρυθμίζουν την κυκλίνη D1 και υπάρχουν στοιχεία ότι η απάντηση στη θεραπεία με ταμοξιφαίνη είναι βραχύτερης διάρκειας σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα κυκλίνης D1, ενώ η υπερέκφρασή της οδηγεί σε αντίσταση στη θεραπεία (C. Elizabeth Caldon et al. 2006).

Πολλοί καρκίνοι υπερεκφράζουν την κυκλίνη E, συμπεριλαμβανομένου και του μαστού. Επίσης η E αποτελεί προγνωστικό παράγοντα για τον καρκίνο του μαστού, και αυξημένη έκφρασή της σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση. Η συνύπαρξη χαμηλών επιπέδων p27Kip1 έχει μεγαλύτερη προγνωστική σημασία από την υπερέκφραση της κυκλίνης E μόνο.

Ο ρόλος του p27 είναι πιο καλά μελετημένος. Καρκίνοι μαστού εκφράζουν συχνά μειωμένα επίπεδα p27 σε σχέση με το υγιές επιθήλιο. Γενικά, μειωμένη έκφραση του p27 σχετίζεται με υψηλό βαθμό κακοήθειας και αρνητικούς υποδοχείς οιστρογόνων. Επίσης τα αντιοιστρογόνα προκαλούν αύξηση του p27 σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7, και η μείωση αυτού, όπως και του p21 προκαλούν αντίσταση στην συγκεκριμένη θεραπεία (C. Elizabeth Caldon et al. 2006).

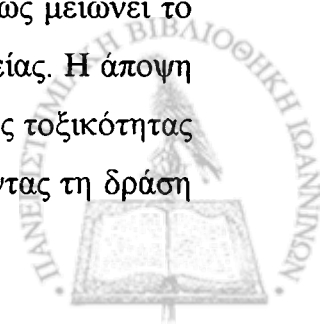
Ο ρόλος του p21 στην έκβαση του καρκίνου του μαστού δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένος (C. Elizabeth Caldon et al. 2006).

Στην παρούσα μελέτη η χρήση των θειολών και παράλληλα αντιοξειδωτικών ουσιών NAC και MPG ανέστειλε τη μιτογόνο δράση της PRL. Η κλινική εφαρμογή αντιοξειδωτικών στην αντιμετώπιση του καρκίνου έχει αποτελέσει πεδίο αντιπαράθεσης για την επιστημονική κοινότητα. Είναι γνωστό ότι οι δραστικές μορφές του οξυγόνου και το οξειδωτικό στρες διαδραματίζουν ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση και εμπλέκονται

στην παθογένεια πολλών ασθενειών, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος. Οι ROS επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης ενώ διάφορα αντιοξειδωτικά τον αναστέλλουν *in vitro*. Επίσης οι ROS και άλλες ελεύθερες ρίζες επηρεάζουν την έκφραση πολλών γονιδίων και οδών μεταβίβασης του σήματος. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι MAP κινάσες που διαδραματίζουν ρόλο στην καρκινογένεση, αυξημένη ενεργοποίηση των οποίων αυξάνει την έκφραση γονιδίων όπως π.χ. της κυκλίνης D1. Αντιοξειδωτικά όπως η NAC αναστέλλουν την έκφραση θετικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου όπως το c-fos, c-jun και ο παράγοντας NFκB (James E Klaunig and Lisa M Kamendulis 2004). Ωστόσο η χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών προληπτικά έναντι του καρκίνου παραμένει ένα διαφορούμενο ζήτημα, καθώς είναι γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες είναι απαραίτητες και για πολλούς προστατευτικούς μηχανισμούς των κυττάρων, όπως η φαγοκυττάρωση, η αποτοξίκωση ουσιών μέσω του P450 και η απόπτωση που εξαλείφει καρκινικά και άλλα παθολογικά κύτταρα (Rudolf I Salganik 2001). Συγκεκριμένα, η παραγωγή ελευθέρων ριζών στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να οδηγήσει στο θάνατό τους, καθώς οι ελεύθερες ρίζες και τα υπεροξείδια των λιπαρών καταστέλλουν την έκφραση του bcl-2, ενεργοποιούν τις κασπάσες και βραχύνουν τα τελομερή, επάγοντας έτσι την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα. Επίσης οι ελεύθερες ρίζες επάγουν τη δράση του p53 και διαδραματίζουν ρόλο στην εξαρτώμενη από το p53 απόπτωση, ενώ αντιοξειδωτικά όπως η NAC αναστέλλουν την απόπτωση. Πολλά καρκινικά κύτταρα έχουν σχετικά αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα, και μειωμένα επίπεδα υπεροξειδωσίας των λιπιδίων, γεγονός τα οποία ενδέχεται να ευνοούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Επίσης συχνά είναι δύσκολο να διακριθεί αν η αυξημένη παραγωγή ROS είναι το αποτέλεσμα ή η αιτία των διαφόρων ασθενειών. Είναι γνωστό ότι πολλά αντικαρκινικά φάρμακα δρουν μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών και η αναστολή της δράσης τους συνεπάγεται και μειωμένη δραστηριότητα των φαρμάκων.

Τα αντιοξειδωτικά συχνά εμφανίζουν προστατευτικές δράσεις που δεν έχουν να κάνουν με τη διαδικασία της οξειδωσης. Από την άλλη μπορούν υπό ορισμένες προϋποθέσεις να δράσουν ως προ-οξειδωτικοί παράγοντες και να επάγουν την καρκινογένεση. Γι' αυτό και σχετικά με τον ρόλο και τη θέση τους στη θεραπεία του καρκίνου υπάρχουν διαμετρικά αντίθετες απόψεις. Από την μια υπάρχει η άποψη ότι η χρήση τους ενδεχομένως μειώνει το θεραπευτικό αποτέλεσμα των κυτταροτοξικών φαρμάκων και της ακτινοθεραπείας. Η άποψη αυτή, υποστηρίζει ότι i) η προστατευτική δράση των αντιοξειδωτικών έναντι της τοξικότητας προστατεύει όχι μόνο τα φυσιολογικά κύτταρα αλλά και τα καρκινικά, μειώνοντας τη δράση



της θεραπείας ii) τα αντιοξειδωτικά εμφανίζουν τα ίδια τοξικότητα, iii) εμφανίζουν άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες, π.χ. μεταβάλλοντας το μηχανισμό της πήξης και αυξάνοντας το ενδεχόμενο αιμορραγίας, iv) θεραπείες όπως η ακτινοθεραπεία βασίζονται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και τα αντιοξειδωτικά μειώνουν τη δράση τους. Η άλλη άποψη υποστηρίζει ότι η διαδικασία της οξείδωσης είναι ένας σημαντικός παράγοντας που προάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και ενδεχομένως μειώνει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Η ίδια άποψη υποστηρίζει ότι τα αντιοξειδωτικά προσφέρουν προστασία έναντι της τοξικότητας των διαφόρων θεραπειών. Η άποψη υπέρ των αντιοξειδωτικών υποστηρίζει ότι η παραγωγή ROS μπορεί να προστατεύσει από τον αποπτωτικό θάνατο που προκαλούν τα κυτταροτοξικά φάρμακα και να σχετίζεται εν μέρει με μηχανισμούς αντίστασης στη θεραπεία. Επίσης πολλές παρενέργειες λόγω των ROS συχνά είναι οι αιτία μη συνέχισης της θεραπείας ή μείωση των δόσεων, και τα αντιοξειδωτικά ίσως είναι ωφέλιμα μειώνοντας αυτές τις παρενέργειες, με αποτέλεσμα μείωση της πιθανότητας διακοπής της θεραπείας αλλά και αύξηση της ποιότητας ζωής των καρκινοπαθών (Keith I. 2004).

Ο συλλογισμός ότι οι ελεύθερες ρίζες χρησιμεύουν για να σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα δεν αναιρεί το γεγονός ότι οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες στο DNA και επομένως οδηγούν σε μεταλλαξιγένεση και καρκινογένεση. Μάλιστα φαίνεται ότι η δράση των ελευθέρων ριζών στα φυσιολογικά και τα καρκινικά κύτταρα είναι εκ διαμετρικά αντίθετη: στα φυσιολογικά βλάπτουν το DNA και οδηγούν σε καρκινογένεση, ενώ όταν υπερπαραγονται στα καρκινικά κύτταρα η δράση τους είναι ωφέλιμη και οδηγεί στο θάνατο των κυττάρων. Τα αντιοξειδωτικά καταστέλλουν το Bcl-2, επάγουν την έκφραση του p53, τη βράχυνση των τελομερών και έτσι αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και προκαλούν απόπτωση (Undurti N. 2002).

Επίσης δεν έχουν όλοι οι άνθρωποι τον ίδιο ρυθμό παραγωγής ROS στον οργανισμό τους. Συνεπώς σε άτομα με αυξημένη παραγωγή ROS η χρήση αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ωφέλιμη και να ανταγωνίζεται τις βλαπτικές συνέπειες των ROS, σε άτομα όμως με μειωμένη παραγωγή η χρήση αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι επιζήμια, ανταγωνιζόμενη τον ρόλο των ROS στις ωφέλιμες προστατευτικές λειτουργίες, όπως για παράδειγμα η απόπτωση. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η χρήση των αντιοξειδωτικών είναι συχνά εμπειρική όσον αφορά τις δόσεις και τους συνδυασμούς χορήγησης, μπορεί να είναι η αιτία που πολλές μελέτες που αφορούν την προστατευτική δράση τους είναι αντικρουόμενες, παρά το γεγονός ότι δίαιτα πλούσια σε τροφές με αντιοξειδωτικές ουσίες όπως τα φρούτα και τα

λαχανικά έχουν προστατευτική δράση έναντι ορισμένων μορφών καρκίνου (Rudolf I Salganik 2001).

Στην παρούσα μελέτη οι σουλφυδρυλικές ενώσεις N-ακετυλκυστεΐνη και 2-N-μερκαπτοπρόπιονυλγλυκίνη που αποτελούν γνωστά και εγκεκριμένα φάρμακα για τη θεραπεία διαφόρων παθήσεων, αναστέλλουν τη μιτογόνο δράση της προλακτίνης στα καρκινικά κύτταρα του μαστού και του προστάτη. Μένει να διερευνηθεί περαιτέρω εάν και άλλες σουλφυδρυλικές ενώσεις έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν παράγοντες που ασκούν μιτογόνο δράση στα καρκινικά κύτταρα, και εάν μπορούν να υπάρξουν κλινικές εφαρμογές αυτών των παρατηρήσεων μελλοντικά.



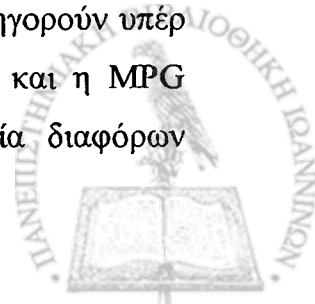
ΧΙΙ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Διαπιστώθηκε εκ νέου η επίδραση της PRL στα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 και του προστάτη DU-145. Η PRL επάγει σε σημαντικό βαθμό τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7 και σε μικρότερο βαθμό τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων DU-145.
- Οι σουλφυδρυλικές ενώσεις MPG και NAC σε μικρές συγκεντρώσεις επάγουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7 και του προστάτη DU-145, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις τον αναστέλλουν.
- Διαπιστώθηκε για πρώτη φορά ότι μη τοξικές συγκεντρώσεις των σουλφυδρυλικών ενώσεων MPG και NAC εμφανίζουν ανασταλτική δράση στον επαγόμενο από την PRL πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού και του προστάτη.
- Η μιτογόνο δράση της PRL στα κύτταρα του μαστού MCF-7 συνοδεύεται από αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου κυκλίνης D1, κυκλίνης E, κυκλίνης B1 και E2F. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση των μορίων p21 και p27.
- Η αναστολή της μιτογόνου δράσης της PRL στα κύτταρα MCF-7 από τις σουλφυδρυλικές ενώσεις MPG και NAC συνοδεύεται από αντίστοιχη μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου κυκλίνης D1, κυκλίνης E, κυκλίνης B1 και παράγοντα E2F
- Από την παρούσα έρευνα προκύπτουν ενδείξεις ότι οι σουλφυδρυλικές ενώσεις MPG και NAC που αποτελούν εγκεκριμένα φάρμακα για την αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού και του προστάτη, αλλά απαιτούνται περισσότερες και πιο εκτεταμένες μελέτες.

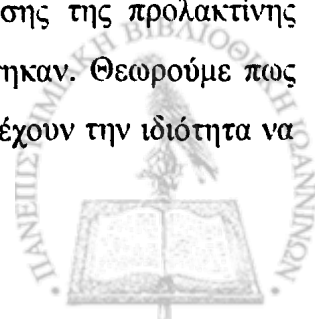


XIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού είναι η 2η πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες, ενώ ο καρκίνος του προστάτη η 2η πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο στους άντρες. Και οι δυο καρκίνοι εμφανίζουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά, όπως είναι για παράδειγμα η ορμονική τους εξάρτηση. Η PRL είναι μια ορμόνη που εμπλέκεται στην παθογένεια και των δυο ασθενειών σε κάποιο βαθμό. Υπάρχουν άφθονα πειραματικά και κλινικά δεδομένα για την σχέση της προλακτίνης με τον καρκίνο του μαστού. Τα καρκινικά κύτταρα του μαστού πολλαπλασιάζονται ταχύτερα παρουσία προλακτίνης, η δε προσθήκη ανταγωνιστών της προλακτίνης ή η παρουσία ορισμένων μορφών της ορμόνης όπως η 16 kDa PRL έχουν ως αποτέλεσμα αναστολή του πολλαπλασιασμού τους. Η PRL επηρεάζει άμεσα την έναρξη και την πορεία του καρκίνου του μαστού στα τρωκτικά όπου παρατηρείται άμεση σχέση μεταξύ της ύπαρξης υπερπρολακτιναιμίας και της συχνότητας εμφάνισης όγκων του μαστού. Επίσης στα τρωκτικά η PRL αυξάνει την ευαισθησία του μαστού σε διάφορα χημικά καρκινογόνα. Σε ανθρώπινους όγκους του μαστού ανιχνεύεται ο υποδοχέας της προλακτίνης σχεδόν στην πλειοψηφία των περιπτώσεων και σε κάποιες μελέτες ορισμένες μορφές του υποδοχέα απαντούν σε μεγαλύτερο ποσοστό στα καρκινικά κύτταρα έναντι των φυσιολογικών. Πέραν του υποδοχέα, στα καρκινικά κύτταρα του μαστού ανιχνεύεται και η ενδογενής παραγωγή του μορίου της προλακτίνης, και επομένως φαίνεται ότι η ορμόνη διαδραματίζει έναν αυτοκρινή-παρακρινή ρόλο στην ανάπτυξη των κυττάρων αυτών. Επίσης η προλακτίνη σχετίζεται με ορισμένους από τους παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο. Όσον αφορά τον προστάτη, η προλακτίνη φαίνεται σε πειραματικό κυρίως επίπεδο ότι διαδραματίζει ρόλο στην φυσιολογικά ανάπτυξη του αδένα αλλά σχετίζεται και με την παθογένεια του καρκίνου του προστάτη. Ο υποδοχέας της προλακτίνης ανιχνεύεται στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, και η ορμόνη ασκεί αυξητική δράση στον πολλαπλασιασμό τους, η οποία αναστέλλεται παρουσία ανταγωνιστών της προλακτίνης. Σε γονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζεται η προλακτίνη παρατηρείται αύξηση του προστάτη αδένα, καθώς και υπερπλασία αυτού. Η ύπαρξη των υποδοχέων της PRL στα προστατικά κύτταρα σε συνδυασμό με τη σύνθεση της ορμόνης από αυτά συνηγορούν υπέρ μιας αυτοκρινούς-παρακρινούς δράσης της ορμόνης σε αυτά. Τόσο η NAC και η MPG αποτελούν σουλφυδρυλικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία διαφόρων



παθολογικών καταστάσεων. Αποτελούν ταυτόχρονα αντιοξειδωτικές ουσίες, και η NAC αποτελεί πρόδρομη ουσία της γλουταθειόνης, που είναι η αφθονότερη ενδοκυττάρια αντιοξειδωτική ουσία στους οργανισμούς. Η NAC έχει μελετηθεί εκτεταμένα όσον αφορά την πρόληψη διαφόρων μορφών καρκίνου, όπως για παράδειγμα του καρκίνου του πνεύμονα. Σε πειραματικό επίπεδο εμφανίζει πολλές αντικαρκινικές ιδιότητες, χωρίς όμως να έχει υπάρξει μέχρι στιγμής το ίδιο θεαματικό αποτέλεσμα σε κλινικό επίπεδο. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η δράση της προλακτίνης στα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 και του προστάτη DU-145 και επιβεβαιώθηκε η μιτογόνο δράση της στις παραπάνω κυτταρικές σειρές. Η δράση αυτή είναι πιο εμφανής στα κύτταρα του μαστού, και στατιστικά σημαντική σε δόσεις 200-400 ng/ml. Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των ουσιών NAC και MPG στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7 και DU-145. Και στις δυο κυτταρικές σειρές παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα και για τις δυο ουσίες. Συγκεκριμένα τόσο στα κύτταρα του μαστού όσο και στα κύτταρα του προστάτη η NAC επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε μικρές δόσεις. Η δράση αυτή είναι μικρού βαθμού στα κύτταρα του μαστού, είναι όμως εντονότερη και στατιστικά σημαντική στα κύτταρα του προστάτη. Η MPG σε μικρές δόσεις επίσης επάγει τον πολλαπλασιασμό των MCF-7 σε μικρό σχετικά βαθμό, ενώ επάγει σε σημαντικό βαθμό τον πολλαπλασιασμό των DU-145. Όσον αφορά κάποιες ενδιάμεσες συγκεντρώσεις, οι δυο αυτές ουσίες δεν ασκούν σημαντική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των παραπάνω κυττάρων, ενώ σε ακόμη υψηλότερες δόσεις τόσο η NAC όσο και η MPG αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και εμφανίζουν πλέον τοξικότητα. Στη συνέχεια μελετήθηκε κατά πόσο μη τοξικές συγκεντρώσεις της NAC και της MPG επιδρούν στον επαγόμενο από την PRL κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κάτι το οποίο δεν έχει διερευνηθεί ξανά στο παρελθόν. Παρατηρήσαμε ότι τόσο η NAC όσο και η MPG σε δόσεις που από μόνες τους δεν επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό αναστέλλουν την μιτογόνο δράση της προλακτίνης στα κύτταρα MCF-7 και DU-145. Ο μηχανισμός των παραπάνω φαινομένων μελετήθηκε περαιτέρω σε μοριακό επίπεδο, όσον αφορά την έκφραση πρωτεϊνών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου. Παρατηρήσαμε ότι ο επαγόμενος από την προλακτίνη πολλαπλασιασμός των MCF-7 κυττάρων συνοδεύεται αντίστοιχα από αυξημένη έκφραση των κυκλινών D1, E και B1, καθώς και του παράγοντα E2F, ενώ δεν εμφανίστηκαν ιδιαίτερες μεταβολές στα μόρια p21 και p27. Αντίθετα, η αναστολή της δράσης της προλακτίνης συνδέεται με μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών που υπερεκφράστηκαν. Θεωρούμε πως χρήζει περαιτέρω διερεύνησης εάν και άλλες σουλφυδρυλικές ενώσεις έχουν την ιδιότητα να



αναστέλλουν παράγοντες που ασκούν μιτογόνο δράση στα καρκινικά κύτταρα, και εάν μπορούν να υπάρξουν κλινικές εφαρμογές αυτών των παρατηρήσεων μελλοντικά.



XIV. SUMMARY

A STUDY ON THE EFFECTS OF PROLACTIN AND RELATED HORMONES ON HORMONE DEPENDENT BREAST AND PROSTATE CELL LINES

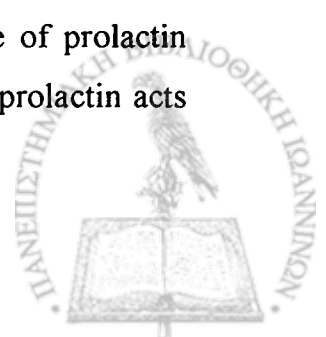
FOTODOTIS MALAMAS

Breast cancer is the second most common cause of cancer death among women, while prostate cancer is the second leading cause of cancer death among men in most Western countries. Both diseases have some common characteristics such as their hormone dependence. Prolactin is a hormone that participates in some degree in the pathogenesis of both diseases.

There are plenty of experimental and clinical data on the influence of prolactin in breast cancer. Breast cancer cells proliferate faster in the presence of prolactin, while the addition of prolactin antagonists or prolactin variants such as 16 kDa PRL results in inhibition of breast cancer cells' proliferation. Prolactin influences directly the initiation and progress of breast cancer in rodents, where a direct association between hyperprolactinemia and occurrence of breast tumors has been observed. In rodents prolactin increases also the sensitivity of breast to different chemical carcinogens.

In human breast tumors the prolactin receptor is found in the majority of cases and in some studies certain variants of the receptor are encountered in a greater proportion in cancer cells than in normal ones. In breast cancer cells endogenous prolactin is also produced and this ectopically produced PRL may act as a major local growth promoter via autocrine and paracrine mechanisms.

In prostate, prolactin seems to play a role in the development and maintenance of the human prostate and may also participate in the pathogenesis of prostate cancer. Prolactin receptor (PRLR) is present in prostate cancer cells and the hormone exerts a proliferative action that is inhibited in the presence of prolactin antagonists. The presence of prolactin receptors and the endogenous prolactin production in prostate cells shows that prolactin acts as an autocrine/paracrine growth factor in these cells.



N-acetylcysteine (NAC) and N-(2-Mercaptopropionyl)glycine (MPG) are sulphhydryl compounds that are used in the treatment of some human diseases. They are also antioxidants, and NAC is a precursor of glutathione, which is the most abundant intracellular antioxidant. N-acetylcysteine has been studied extensively as concern as the prevention of several cancers e.g. lung cancer. Experimentally NAC has shown anticancer properties, but in clinical status the results are inconsistent.

In the present study the effects of prolactin on breast cancer cells MCF-7 and prostate cancer cells DU-145 have been investigated and its mitogen action has been confirmed. These effects were more obvious and statistically significant at concentrations of 200-400 ng/ml PRL. Consequently, we studied the influence of NAC and MPG on MCF-7 and DU-145 cell proliferation. The results were similar in both cell lines. Particularly NAC at small concentrations increases cell proliferation in both cancer cell lines. This action is of small degree on breast cancer cells and more intense and statistically significant on prostate cancer cells. N-(2-Mercaptopropionyl) glycine at low concentrations increases in a small degree the cell proliferation of MCF-7, while it increases significantly the proliferation of DU-145. Intermediate concentrations of both substances do not affect the proliferation of the above cancer cell lines, and greater concentrations of NAC and MPG inhibit cell proliferation and are toxic for the cells.

After that we tested the effect of non-toxic concentration of these compounds on PRL-induced cell proliferation, an action that has not been study till now. We observe that non-toxic concentrations of NAC and MPG inhibit the mitogen effect of prolactin on MCF-7 and DU-145 cells. We investigate furthermore the mechanism of the above-described effects in molecular level as concern as the expression of proteins that regulate the cell cycle. We noticed that the PRL-induced cell proliferation of MCF-7 cells is associated with increased expression of cyclins D1, E, B1, and E2F, while no special differences are observed on p21 and p27 expression. In contrast, the inhibition of prolactin effects is associated with a decreased expression of cyclins and E2F. We consider that more extensive studies are needed to examine the capacity of other sulphhydryl compounds to inhibit the mitogenic effect of carcinogens on cancer cell lines, and the possibility of the potential clinical applications of these observations in the future.



XV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A. ΑΡΘΡΑ ΣΤΗ ΔΙΕΘΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdo EE, Cunha JE, Deluca P et al. Protective Effect Of N2-Mercaptopropionylglycine On Rats And Dogs Liver During Ischemia/Reperfusion Process. *Gastroenterologia Experimental* 2003, Jul./Sep, V. 40, No. 3, 177-180

Acosta JJ, Muñoz RM, González L et al. Src mediates prolactin-dependent proliferation of T47D and MCF7 cells via the activation of focal adhesion kinase/Erk1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Molecular Endocrinology* 2003, 17(11): 2268-2282,

Agarwal A, Munoz-Nájar U, Klueh U et al. N-Acetyl-Cysteine Promotes Angiostatin Production and Vascular Collapse in an Orthotopic Model of Breast Cancer. *American Journal of Pathology* 2004, May, Vol. 164, No. 5

Aitio ML. N-acetylcysteine – passe-partout or much ado about nothing? *Br J Clin Pharmacol* 2005, 61:15–15

Akrivis C, Vezyraki P, Kiortsis DN et al. Inhibition of puerperal lactation with 2-mercaptpropionylglycine *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2000, 56: 621-623

Albano JD, Ward E, Jemal A et al. Cancer Mortality in the United States by Education Level and Race. *J Natl Cancer Inst* 2007 99 (18): 1384-1394

Amanatullah DF, Reutens AT, Zafonte BT et al. Cell-Cycle Dysregulation And The Molecular Mechanisms Of Prostate Cancer. *Frontiers In Bioscience* 2000, April 1, 5, D372-390

Andrei L, Gartel A, Turner L. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in the apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics* 2002, June, Vol. 1, 639-649

Armstrong K, Eisen A, Weber B. Assessing the risk of breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 2000, Vol 352, No 8, February 24, pp 564-571

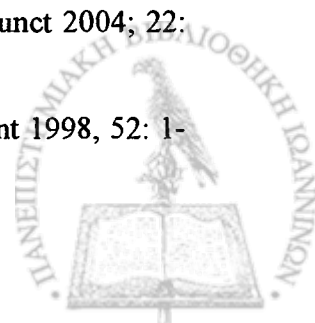
Arnold A and Papanikolaou A. Cyclin D1 in Breast Cancer Pathogenesis. *Journal Of Clinical Oncology* 2005, June 20, Volume 23, Number 18

Arora-Kuruganti P, Lucchesi PA, Wurster RD. Proliferation of cultured human astrocytoma cells in response to an oxidant and antioxidant. *J Neurooncol.* 1999 ;44(3):213-21.

Atmaca G. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yosnei Medical Journal* 2004, vol 45, No 5, 776-788

Balendiran GK, Dabur R, Fraser D. The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Funct* 2004; 22: 343–352.

Barnes DM, Gillett CE. Cyclin D in breast cancer. *Brest Cancer Research and Treatment* 1998, 52: 1-15



- Ben-Jonathan N, Liby K, McFarland M et al. Prolactin as an autocrine/paracrine growth factor in human cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2002, 13 (6) 245-250
- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL et al. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocrine Reviews* 1996, 17 (6) 639-669
- Berockman JL, Schroeder MD, Schuler LA. PRL activates the cyclin D1 promoter via the Jak2/Stat pathway. *Molecular Endocrinology* 2002, 16(4): 774-784
- Bidoli E, Talamini R, Bosetti C et al. Macronutrients, fatty acids, cholesterol and prostate cancer risk. *Annals of Oncology* 2005, 16: 152-157
- Biswas R, Vonderhaar BK. Role of serum prolactin responsiveness of MCF-8 human breast cancer cells in long-term tissue culture. *Cancer Research* 1987, 47, 3509-3514
- Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG et al. Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2004; 364: 1219-28
- Block KI. Antioxidants and cancer therapy: Furthering the debate. *Integr Cancer Ther* 2004; 3; 342
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M et al. Prolactin (PRL) and its receptor: actions. Signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* 1998A, 19 (3) 225-268
- Bonneterre J, Peyrat JP, Beuscar R et al. A. Prognostic significance of prolactin receptors in human breast cancer. *Cancer Research* 1987, 47, 4724-4728
- Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL et al. Cell Cycle Control in Breast Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006, 97:261-274
- Carmia B. Dietary antioxidants and human cancer. *Integrative Cancer Therapies* 2004, 3(4); pp 333-341
- Chan JM, Gann PH, Giovannucci EL. Role of Diet in Prostate Cancer Development and Progression. *J Clin Oncol* 2005, 23:8152-8160
- Chen W, Ramamoorthy P, Chen N et al. A human prolactin antagonist, hPRL-G129R, inhibits breast cancer cell proliferation through induction of apoptosis. *Clinical Cancer Research* 1999, 5, 3583-3593
- Chilton BS, Hewetson A. Prolactin and growth hormone signaling. *Current Topics In Developmental Biology* 2005, Vol 68, 1-23
- Chokkalingam AP, Stanczyk FZ, Reichardt JK et al. Molecular epidemiology of prostate cancer: hormone-related genetic loci. *Frontiers in Bioscience* 2007, 12, 3436-3460, May 1
- Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE et al. The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocrine Reviews* 2003, 24 (1) 1-27
- Clevenger CV, Plank TL. Prolactin as an Autocrine/paracrine factor in breast tissue. *Journal Of Mammary Gland Biology And Neoplasia* 1997, Vol 2, No 1, pp 59-68
- Costello LC, Franklin RB. Effect of prolactin on the prostate. *The Prostate* 1994, 24, 162-166



Costello LC, Liu Y, Zou J et al. Evidence for a zinc uptake transporter in human prostate cancer cells which is regulated by prolactin and testosterone. *The Journal of Biological Chemistry* 1999, 274 (25) 17499-17504

Das R, Vonderhaar B. Prolactin as a mitogen in mammary cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 1997, Vol. 2, No. 1, 29-39

Das U. A radical approach to cancer. *Med. Sci. Monit.* 2002; 8 (4): RA 79-92

Date MO, Morita T, Yamashita N et al. The Antioxidant N-2-Mercaptopropionyl Glycine Attenuates Left Ventricular Hypertrophy in In Vivo Murine Pressure-Overload Model. *Journal of the American College of Cardiology* 2002, Vol. 39, No. 5

De Flora S, D'Agostini F, Masiello L et al. Synergism Between N-Acetylcysteine And Doxorubicin In The Prevention Of Tumorigenicity And Metastasis In Murine Models. *Int. J. Cancer* 1996, 67,842-848

De Flora S, Izzotti A, D'Agostini et al. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis* 2001, Vol. 22 no 7 pp. 999-1013

De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F et al. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Mutation Research* 2001, 480-481 9-22

Desphande A, Sicinski P and Hinds WP. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 2005, 24, 2909-2915

Dillner K, Kindblom J, Flores-Morales A et al. Gene Expression Analysis Of Prostate Hyperplasia In Mice Overexpressing The Prolactin Gene Specifically In the Prostate *Endocrinology* 2003, 144 (11):4955-4966

Dimitresku RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk- where do we stand in 2005? *J. Cell. Mol. Med.* 2005, Vol 9, No 1, pp 208-221

Egloff AM, Vella AL, Finn OJ. Cyclin B1 and other cyclins as tumor antigens in immunosurveillance and immunotherapy of cancer. *Cancer Research* 2006, January 1; 66 (1).

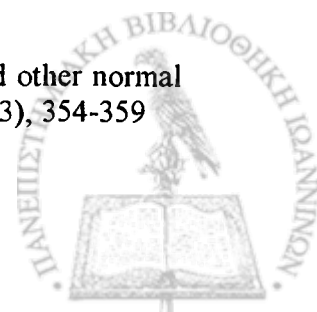
Ely S, Vioral AN. Breast Cancer Overview. *Plastic Surgical Nursing* 2007, 27 (3), 128-133

Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione In Cancer Biology And Therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2006, 43(2):143-181

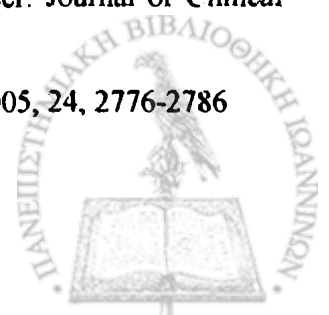
Evangelou A, Kalpouzos G, Karkabounas S, et al. Dose-related preventive and therapeutic effects of antioxidants-anticarcinogens on experimentally induced malignant tumors in Wistar rats. *Cancer Letters* 1997, 105-111

Feldman HA, Longcope C, Derby CA et al. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002, 87 (2) 589-598

Fields K, Kulig E, Lloyd RC. Detection of prolactin messenger RNA in mammary and other normal and neoplastic tissues by polymerase chain reaction. *Laboratory Investigation* 1993, 68 (3), 354-359



- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A et al. Prolactin: Structure, function and regulation of secretion. *Physiological Reviews* 2000, 80 (4) 1523-1631
- Fu M, Wang C, Li Z et al. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004, 145(12):5439-5447
- Ginsburg E, Vonderhaar BK. Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. *Cancer Research* 1995, 55, 2591-2595
- Goffin V, Bernichtein S, Touraine P et al. Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. *Endocrine Reviews* 2005, 26(3): 400-422
- Gong Z, Neuhaus ML, Goodman PJ et al. Obesity, Diabetes, and Risk of Prostate Cancer: Results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(10):1977-83
- Hamilton W, Sharp DJ, Peters TJ et al. Clinical features of prostate cancer before diagnosis: a population-based, case-control study. *British Journal of General Practice* 2006; 56: 756-762
- Hankinson SE, Willet WC, Michaud DS et al. Plasma prolactin levels and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999, 91, 629-634
- Harris J, Stanford PM, Oakes SR et al. Prolactin and the prolactin receptor: new targets of an old hormone. *Annals of Medicine* 2004, 36, p 414-425
- Harvey PW. Human relevance of rodent prolactin-induced non-genotoxic mammary carcinogenesis: prolactin involvement in human breast cancer and significance for toxicology risk assessments. *J. Appl. Toxicol.* 2005; 25: 179-183
- Heck K, Wagener D, Schatzkin A et al. Socioeconomic status and breast cancer mortality, 1989 through 1993: an analysis of education data from death certificates. *Am J Public Health* 1997, 87:1218-22
- Henninghausen L, Robinson GW, Wagner K et al. Prolactin signaling in mammary gland development. *The Journal Of Biological Chemistry* 1997, Vol. 272, No 12, March 21, pp. 7567-7569
- Hernandez-Saavedra D, McCord JM. Paradoxical Effects of Thiol Reagents on Jurkat Cells and a New Thiol-sensitive Mutant Form of Human Mitochondrial Superoxide Dismutase. *Cancer Research* 1999, January 1, 63, 159-163
- Horseman ND. Editorial: prolactin, proliferation and protooncogenes. *Endocrinology* 1995, Vol 136, No 12, 5249-5251
- Hsing AW and Chokkalingam AP, Prostate cancer epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 2006, May 1, 11, 1388-1413
- Huang TS, Duyster J, Wang JY. Biological response to phorbol ester determined by alternative G1 pathways. *Proc. Natl. Aced. Sci. USA* 1995, May, Vol 92, pp. 4793-4797
- Hughes C, Murphy A, Martin C et al. Molecular pathology of prostate cancer. *Journal of Clinical Pathology* 2005; 58:673-684
- Hwang HC, Clurman BE. Cyclin E in normal and neoplastic cells. *Oncogene* 2005, 24, 2776-2786



Hynes NE, Cella N, Wartmann M. Prolactin mediated intracellular signaling in mammary epithelial cells. *Journal Of Mammary Gland Biology And Neoplasia* 1997, Vol 2, No 1 p. 19-27

Iiyama M, Kakihana K, Kurosu T et al. Reactive oxygen species generated by hematopoietic cytokines play roles in activation of receptor-mediated signaling and in cell cycle progression *Cellular Signaling* 2006, 18, 174-182

Keeler C, Dannies PS, Hodsdon ME. The tertiary structure and backbone dynamics of human prolactin. *J. Mol. Biol.* 2003, 328, 1105-1121

Kelley MJ, McCrory DC. Prevention of Lung Cancer. Summary of Published Evidence. *Chest* 2003 , 123, 1 January, Supplement

Kelly SG. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern. Med. Rev.* 1998 Apr; 3(2):114-27

Kim J, Luo W, Chen D et al. Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer Research* 2003, 63, 386-393, January 15

Kindblom J, Dillner K, Sahlin L et al. Prostate hyperplasia in a transgenic mouse with prostate-specific expression of prolactin. *Endocrinology* 2003, 146 (6), 2269-2278

Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004, 44: 239-67

Klein EA. Can prostate cancer be prevented? *Nature Clinical Practice Oncology* 2005, January, Vol 2, No 1, 24-31

Knudsen KE, Alan Diehl J, Haiman CA et al. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene* 2006, 25, 1620-1628

Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970, Vol 227, Aug 15, 680-685

Laud K, Gourdou I, Belair L et al. Characterization and modulation of a prolactin receptor mRNA isoform in normal and tumoral human breast tissues. *Int. J. Cancer* 2000, 85, 771-776

Leav I, Merk FB, Fai Lee K et al. Prolactin receptor expression in the developing human prostate and in hyperplastic, dysplastic and neoplastic lesions. *Am. J. Pathology* 1999, 154 (3) 863-869

Lee JS, Kypreos KE, Gail E. Sonenshein Synchronization of cultured vascular smooth muscle cells following reversal of quiescence induced by treatment with the antioxidant N-acetylcysteine. *Experimental Cell Research*, 1998, 239, 447-453

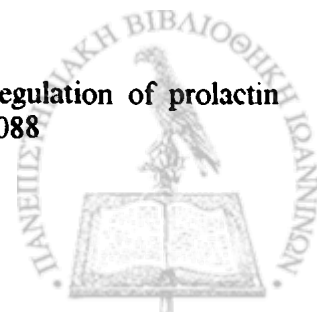
Li H, Ahonen TJ, Alanen K et al. Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 5 in Human Prostate Cancer Is Associated with High Histological Grade. *Cancer Research* 2004, July 15, 64, 4774-4782

Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. Thiol antioxidant, N-acetylcysteine activates extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in articular chondrocytes. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 2000, 275, 789-794

Lissoni P, Vigano P, Vaghi M et al. A phase II study of tamoxifen in hormone-resistant metastatic prostate cancer: possible relation with prolactin secretion. *Anticancer Research* 2005, 25: 3597-3600



- Liu M, Pelling JC, Ju J et al. Antioxidant action via p53-mediated apoptosis. *Cancer research* 1998, April 15, 58, 1723-1729
- Liu M, Wikonkal NM, Brash DE. Induction of cyclin-dependent kinase inhibitors and G1prolongation by the chemopreventive agent N-acetylcysteine *Carcinogenesis* 1999, Vol 20 No 9, pp 1869-1872
- Llovera M, Pichard C, Bernichtein S et al. Human prolactin (hPRL) antagonists inhibit PRL-activated signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. *Oncogene* 2000A, 19, 4695-4705
- Llovera M, Touraine P, Kelly PA et al. Involvement of prolactin in breast cancer: redefining the molecular targets. *Experimental Gerontolog* 2000B, 35, 41-51
- Malumbres M. Revisiting the "Cdk-Centric" View of the Mammalian Cell Cycle. *Cell Cycle* 2005, February, 4:2, 206-210;
- Manni A, Wright C, Davis G et al. Promotion by prolactin of the growth of human breast neoplasms cultured in vitro in the soft agar clonogenic assay. *Cancer Research* 1986, 46, 1669-1672
- Marthaler MT, Keresztes PA. Evidence-based practice for the use of N-acetylcysteine. *Dimensions Of Critical Care Nursing* 2004, Vol 23/No 6, 270-272
- Meng J, Tsai-Morris CH, Dufau ML. Human prolactin receptor variants in human cancer: low ratio of short forms to the long-form human prolactin receptor associated with mammary carcinoma. *Cancer Research* 2004, 5677-5682
- Menon SG, Coleman MC, Walsh SA et al. Differential susceptibility of nonmalignant human breast epithelial cells and breast cancer cells to thiol antioxidant-induced G(1)-delay. *Antioxid Redox Signal*. 2005, May-Jun;7(5-6):711-8.
- Menon SG, Sarsour EH, Spitz DR et al. Redox regulation of the G1to S phase transition in the mouse embryo fibroblast cell cycle. *Cancer Research* 2003, 63, 2109-2117, May 1
- Mertani HC, Garcia-Gaballero T, Lambert A et al. Cellular expression of growth hormone and prolactin receptors in human breast disorders. *Int J. Cancer (Pred. Oncol.)* 1998, 79, 202-211
- Messinis IE, Souvatzoglou A, Vrontakis M et al. Relations between serum prolactin levels and follicle stimulating hormone response to leuteinizing hormone-releasing hormone during early puerperium. *Acta Endocrinologica* 1983, 104: 143-147
- Murray AW. Recycling the cell cycle: Cyclins revised. *Cell* 2004, January 23, Vol. 116, 221-234
- Musgrove EA. Cyclins: Roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. *Growth Factors* 2006, March; 24(1): 13-19
- N-Acetylcysteine (Monograph). *Alternative Medicine Review* Vol 5, No 5, 2000, 467-471
- Neil MG, Fleshner NE. An update on chemoprevention strategies in prostate cancer for 2006. *Curr Opin Urol* 2006, 16 : 132-137,
- Nelson WG. Prostate Cancer Prevention. *J. Nutr.* 2004, 134: 3211S-3212S
- Nevalainen MJ, Valve EM, Ingleton PM et al. Expression and hormone regulation of prolactin receptors in rat dorsal and lateral prostate. *Endocrinology* 1996, 137 (7), 3078-3088



Nevalainen MT, Valve EM, Ingleton PM et al. Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J. Clin. Invest.* 1997, 99 (4) 618-627

Nurifumi K, Shuichi S, Inoue M, et al. Effect of antioxidants, resveratrol quercetin and N-acetylcysteine on the functions of cultured hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 1998, Vol 27, No 5

Ohri S, Sharma D, Dixit A. Modulation of C-myc and C-fos gene expression in regenerating rat liver by 2-mercaptopropionylglycine. *Cell Biology International* 2002, Vol 26, No 2, 187-192

O'Neal KD, Yu-Lee LY. Differential signal transduction of the short, Nb2, and long prolactin receptors. *The Journal Of Biological Chemistry* 1994, Vol 269, No 42, Issue of October 21, pp. 26076-26082

Ormandy CJ, Hall RE, Manning DL et al. Coexpression and cross-regulation of the prolactin receptor and sex steroid hormone receptors in breast cancer. *Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism* 1997, 82 (11) 3692-3699

Perks CM, Keith AJ, Goodhew et al. Prolactin Acts as a potent survival factor for human breast cancer cell lines. *British Journal Of Cancer* 2004, 91, 305-311

Pestell RG, Albanese C, Reutens AT et al. The cyclins and cyclin dependent Kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation *Endocrine Reviews* 1999, 20(4): 501-534

Pierce SK, Chen WY. Quantification of prolactin receptor mRNA in multiple human tissues and cancer lines by real time RT-PCR. *Journal of Endocrinology* 2001, 171, R1-R4

Platz EA, Leitzmann MF, Rimm EB et al. Alcohol Intake, Drinking Patterns, and Risk of Prostate Cancer in a Large Prospective Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2004; 159:444-453

Prasan AM, McCarron HC, Hambly BD et al. Effect of Treatment on Ventricular Function and Troponin I Proteolysis in Reperfused Myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2002, 34, 401-411

Reiter E, Hennuy B, Bruyninx M et al. Effects of pituitary hormones on the prostate. *The Prostate* 1999, 38, 159-165

Reynolds C, Montone KT, Powell CM et al. Expression of prolactin and its receptors in human breast carcinoma. *Endocrinology* 1997, 138 (12) 5555-5560

Robertson FG, Harris J, Naylor MJ et al. Prostate Development and Carcinogenesis in Prolactin Receptor Knockout Mice. *Endocrinology* 2003, 144 (7):3196-3205

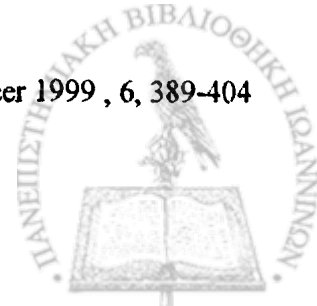
Ruffion A, Al-Sakkaf A, Brown BL et al. The survival effect of prolactin on PC3 prostate cancer cells. *European Urology* 2003 , 43, 301-308

Salganik RI. The Benefits and Hazards of Antioxidants: Controlling Apoptosis and Other Protective Mechanisms in Cancer Patients and the Human Population *Journal of the American College of Nutrition* 2001, Vol. 20, No. 5, 464S-472S

Schroeder MD, Brockman JL, Walker AM et al. Inhibition of prolactin-induced proliferative signals in breast cancer cells by a molecular mimic of phosphorylated PRL, S179D-PRL. *Endocrinology* 2003, 144 (12): 5300-5307,



- Schroeder MD, Symowicz W, Schuler LA. Prolactin modulate cell cycle regulators in mammary tumor epithelial cells. *Molecular Endocrinology* 2002, 16 (1), 45-57
- Sekharam M, Trotti A, Cunnick JM et al. Suppression of fibroblast cell cycle progression in G1 phase by N-acetylcysteine. *Toxicology And Applied Pharmacology* 1998, 149, 210-216
- Sequoia JSP, Wright ME, McCarron P et al. A Prospective Investigation of Height and Prostate Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(11):2174-8
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996, Dec 6, Vol 274, Issue 5293, 1672-1677
- Simon WE, Pahnke VG, Holzel F. In vitro modulation of prolactin binding to human mammary carcinoma cells by steroid hormones and prolactin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1985, Vol. 60, No 6, 123-1249
- Sinha YN. Structural Variants of prolactin: Occurrence and physiological significance. *Endocrine Reviews* 1995, 16 (3) 354-369
- Stattin P, Rinaldi S, Stenman U et al. Plasma prolactin and prostate cancer risk: a prospective study. *Int J. Cancer* 2001, 92, 463-465
- Stefos T, Sotiriadis A, Tsikras P et al. Maternal prolactin secretion during labor. The role of dopamine. *Acta Obstet. Gynecol. Scand* 2001; 80: 34-38
- Steger RV, Chandrashekar V, Zhao et al. Neuroendocrine and Reproductive Functions in Male Mice with Targeted Disruption of the Prolactin Gene. *Endocrinology* 1998, Vol. 139, No. 9,
- Tabruyn SP, Ngueyn NQ, Cornet AM et al. The Antiangiogenic Factor, 16-kDa Human Prolactin, Induces Endothelial Cell Cycle Arrest by Acting at Both the G0-G1 and the G2-M Phases. *Molecular Endocrinology* 2005, 19(7):1932-1942
- Touraine P, Martini JP, Zafrani B et al. Increased expression of prolactin receptor gene assessed by quantitative polymerase chain reaction in human breast tumors versus normal breast tissues. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998, 83 (2) 667-674
- Twooroger SS, Hankinson SE. Prolactin and breast cancer risk. *Cancer Letters* 2006, 243 160-169
- Untergasser G, Rumpold H, Hermann M et al. proliferative disorders of the aging human prostate: Involvement of the protein hormones and their receptors. *Experimental Gerontology* 1999, 34, 275-287
- Van Coppenolle F, Skryma R, Quadid-Ahidouch H et al. Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K⁺ channel activation. *Biochem. J.* (2004) 377, 569-578
- Van Coppenolle F, Slomianny C, Carpentier F et al. Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgeno-dependence. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, 280:120-129.
- Villeneuve PJ, Johnson KC, Kreiger N et al. The Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. Risk factors for prostate cancer: results from the Canadian National Enhanced Cancer Surveillance System. *Cancer Causes Control* 1999; 10:355 - 67
- Vonderhaar BK . Prolactin involvement in breast cancer. *Endocrine-related Cancer* 1999 , 6, 389-404



Vonderhaar BK. Prolactin: the forgotten hormone of human breast cancer. *Pharmac. Ther.* 1999, 2, 169-178

Walz C, Crowley BJ, Hudon HE et al. Activated Jak2 with the V617F Point Mutation Promotes G1/S Phase Transition. *The Journal of Biological Chemistry* 2006, June 30, Vol. 281, No. 26, pp. 18177-18183

Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 9717-9721

Wennbo H, Kindblom J, Isaksson GP et al. Transgenic mice overexpressing the prolactin gene develop dramatic enlargement of the prostate gland. *Endocrinology* 1997, 138 (10) 4410-4415

Wu G, Fang YZ, Yang S et al. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J. Nutr.*, 2004, 134: 489-492

Wu W, Ginsburg E, Vonderhaar BK et al. S179D Prolactin Increases Vitamin D Receptor and p21 through Up-regulation of Short 1b Prolactin Receptor in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 2005; 65: (16). August 15, 2005

Xu X, Kreye E, Kuo CB et al. A molecular mimic of phosphorylated prolactin markedly reduced tumor incidence and size when DU1345 human prostate cancer cells were grown in nude mice. *Cancer Research* 2001, 61, 6098-6104

Yamauchi T, Yamauchi N, Ueki K et al. Constitutive Tyrosine Phosphorylation of ErbB-2 via Jak2 by Autocrine Secretion of Prolactin in Human Breast Cancer. *The Journal Of Biological Chemistry* 2000, Vol. 275, No. 43, Issue of October 27, pp. 33937-33944

Yildiz D. Inhibition of tumor growth by replacing glutathione with N-acetylcysteine. *Medical Hypotheses* 2004, 63, 80-82

Yun C, Yan I, Ferrari G et al. N-Acetylcysteine-promoted Survival of PC12 Cells Is Glutathione independent but Transcription-dependent. *The Journal of Biological Chemistry* 1995, Vol. 270, No. 45, Issue of November 10, pp. 26827-26832

Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J et al. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell.Mol. Life Sci.* 2003, 60 6-20

Zargar AH, Masoodi SR, Laway BA et al. Familiar puerperal alactogenesis: possibility of a genetically transmitted isolated prolactin deficiency. *Br J Obstet Gynaecol* 1997, 104, 629-631

Zeegers MP, Dirx MJ, Van Den Brandt PA. Physical Activity and the Risk of Prostate Cancer in The Netherlands Cohort Study, Results after 9.3 Years of Follow-up. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(6):1490-5

B. ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΚΑΙ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΒΙΒΛΙΑ

Harrison's Principles of Internal Medicine 16th edition, 2005



Eric J. Bieber, Joseph Sanfilippo, Ira Horowitz. Clinical Gynecology, Churchill-Livingstone 2006

Γ. Κρεατσάς, Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική, εκδόσεις Πασχαλίδη 1998

DeCherney. Current obstetric and gynecologic diagnosis and treatment, Mc Graw Hill, 9th edition

Oxford textbook of Oncology 2nd edition, Oxford Press 2002

DeVita, Cancer: principles and practice of oncology, 6th edition, Lippincott Williams & Wilkins 2001

