

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ: ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ  
ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΙΧΑΗΛ Δ. ΜΕΛΕΚΟΣ**

**ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ  
ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ Δ. ΚΑΡΑΤΖΑ**

**ΙΑΤΡΟΥ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥ ΟΥΡΟΛΟΓΟΥ FEBU**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΥΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2009**

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΜΕΛΕΚΟΣ ΜΙΧΑΗΛ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ

ΤΖΩΡΤΖΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΟΥΡΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΜΟΡΙΑΚΗΣ

ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΕΠ.ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΟΥΡΟΛΟΓΙΑΣ

### **Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΜΕΛΕΚΟΣ ΜΙΧΑΗΛ

ΜΑΛΙΖΟΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ

ΤΡΥΠΟΣΚΙΑΔΗΣ ΦΙΛΙΠΠΟΣ

ΓΙΑΝΝΟΥΚΑΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ

ΤΖΩΡΤΖΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΖΑΧΑΡΟΥΛΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

*Στους γονείς μου*

*Στη γυναίκα μου Βάσω,*

*Στα παιδιά μου,*

*Δημήτρη και Κωνσταντίνα*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	7
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ.....	8
ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.....	15
<b>ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ.....</b>	<b>17</b>
• ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ.....	17
• ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ.....	20
• ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΔΡΟΓΟΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ.....	22
• ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ.....	26
• ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ.....	29
I. ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ α.....	35
II. ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ β.....	36
III. UGT1A1.....	40
<b>ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....</b>	<b>45</b>
• ΑΝΔΡΟΓΟΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ.....	46
• ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ α.....	48
• ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ β.....	48
• UGT1A1.....	49
<b>ΕΙΔΙΚΟ</b>	
<b>ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>51</b>
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ.....	52
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	53
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	64
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	80
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	89
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	90
SUMMARY.....	94
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	97

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση του προστάτη αδένος ελέγχονται από τα ανδρογόνα, κυρίως από την τεστοστερόνη και την 5α-διυδροτεστοστερόνη. Η δράση των ορμονών αυτών βρίσκεται σε άμεση συνάρτηση με την παρουσία του ανδρογονικού υποδοχέα (AR), ο οποίος εκφράζεται στα προστατικά επιθηλιακά κύτταρα. Η μεταγραφική περιοχή του ανδρογονικού υποδοχέα περιέχει μια έντονα πολυμορφική τρινουκλεοτιδική περιοχή (CAGn), το μήκος της οποίας έχει συσχετιστεί με τον κίνδυνο για ανάπτυξη του προστατικού καρκίνου. Μικρότερο μήκος CAG επαναλήψεων μπορεί να κάνει τον προστατικό ιστό πιο ευάλωτο στη μακροχρόνια δράση των ανδρογόνων, αφού οδηγεί στην αύξηση της έκφρασης του AR mRNA και της παραγωγής της AR πρωτεΐνης, αλλά και της μεταγραφικής ικανότητας του ανδρογονικού υποδοχέα σε καλλιέργειες προστατικών επιθηλιακών κυττάρων-κατά συνέπεια, σε αύξηση του κινδύνου για προστατική καρκινογένεση.

Τα οιστρογόνα από την άλλη, παράγονται από την περιφερική αρωματοποίηση της τεστοστερόνης και ασκούν την δράση τους στον προστάτη, είτε μέσω των τοξικών μεταβολιτών τους, είτε μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων ERα και ERβ. Η δράση τους είναι ανταγωνιστική και έτσι, ενώ ο ERα επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την φλεγμονή και κατά συνέπεια τον καρκίνο, ο ERβ φαίνεται να έχει προστατευτική δράση, αφού η δράση του είναι αντιμιτωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική. Μελέτες έχουν δείξει ότι πολυμορφισμοί στα γονίδια των δύο οιστρογονικών υποδοχέων μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στην έκφρασή τους και, κατ'επέκταση, στον κίνδυνο για την ανάπτυξη του προστατικού καρκίνου. Η γλυκουρονοποίηση των τοξικών μεταβολιτών των οιστρογόνων (ημικινόνες-κινόνες) αποτελεί σημαντικό παράγοντα αδρανοποίησής τους, με το UGT1A1 ένζυμο να αποτελεί έναν από τους κύριους εκφραστές της. Η αύξηση των (TA) επαναλήψεων στον υποκινητή του UGT1A1 γονιδίου, οδηγεί σε μείωση της μεταγραφικής του ικανότητας, μειωμένο καταβολισμό των κατεχολοιστρογόνων, την παραμονή αυξημένων ποσοτήτων τοξικών μεταβολιτών και κατά συνέπεια την αύξηση της πιθανότητας για καρκινογένεση.

Σκοπός της παρούσας διατριβής αποτελεί η μελέτη της συσχέτισης των πολυμορφισμών των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών με τον καρκίνο του προστάτη. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων στα γονίδια του ανδρογονικού υποδοχέα (CAGn), του οιστρογονικού υποδοχέα α (TAn), του οιστρογονικού υποδοχέα β (CAn), καθώς επίσης και του UGT1A1 γονιδίου (TAn). Η όλη επεξεργασία των δειγμάτων των συμμετεχόντων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την καθοδήγηση της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Ασπασίας Τσέζου, ενώ την ευθύνη για το κλινικό μέρος της έρευνας είχε η Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Μιχαήλ Μελέκου και των Επίκουρων Καθηγητών Γ. Μουτζούρη και Β. Τζώρτζη.

Για την περάτωση της διδακτορικής μου διατριβής οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Ουρολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Μιχαήλ Μελέκο, που πίστεψε σε μένα και μου έμαθε ότι οι στόχοι πετυχαίνονται με σκληρή δουλειά και αφοσίωση, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γεώργιο Μουτζούρη, που μου εμπιστεύτηκε αυτό το θέμα, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Βασίλειο Τζώρτζη, που με στήριξε στις πολύ δύσκολες στιγμές, δίνοντάς μου μαθήματα δύναμης, αντοχής και επιστημονικής σκέψης για την περάτωση του δύσκολου αυτού έργου, καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής κ. Ασπασία Τσέζου, που με την άριστη επιστημονική της κατάρτιση, τη συνέπεια, την υπομονή και την επιμονή που τη διακρίνει, συνέβαλε καθοριστικά στην επιτυχή ολοκλήρωση της μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Βιολόγο κ. Βασίλη Παπανικολάου, που με βοήθησε καθοριστικά όλο το χρονικό διάστημα που εργάστηκα στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής, καθώς και την Ιατρό κ. Ειρήνη Γιαννάτου για την σημαντική συμβολή της στο τεχνικό αλλά και στο στατιστικό κομμάτι της διατριβής.

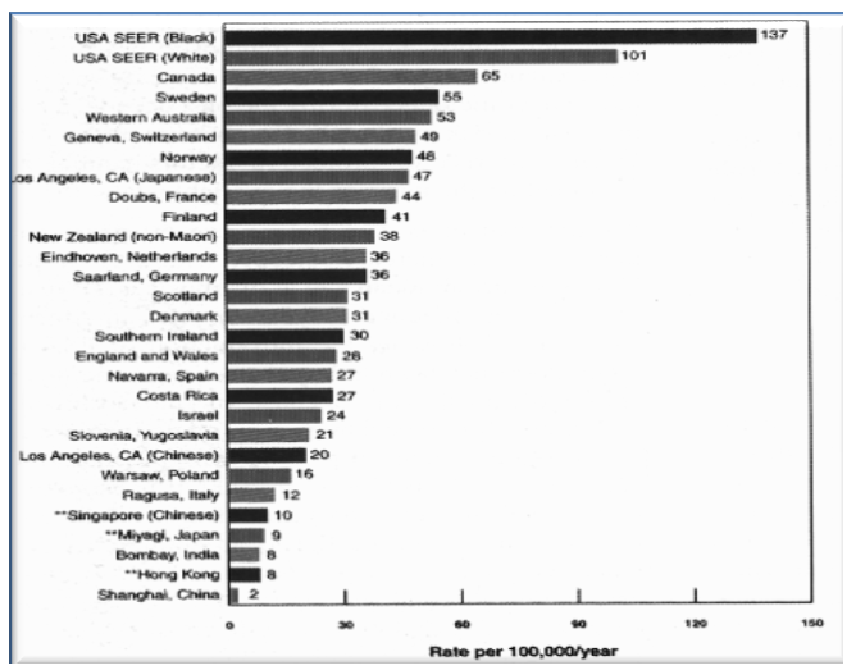
## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί τον συχνότερο μη δερματολογικό καρκίνο στους άνδρες. Περίπου 782600 νέα περιστατικά και 25400 θάνατοι από τον καρκίνο του προστάτη παρατηρήθηκαν μόνο για το 2007 (1). Η θνητότητα από τον καρκίνο του προστάτη φαίνεται ότι μειώνεται σε αρκετές αναπτυγμένες χώρες, όπως οι ΗΠΑ, το Ηνωμένο Βασίλειο και ο Καναδάς, κάτι που προφανώς οφείλεται στην έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπιση (2). Αντίθετα, φαίνεται να μην ισχύει το ίδιο σε κάποιες Ασιατικές χώρες, όπως η Ιαπωνία και η Σιγκαπούρη, όπου η επίπτωση του καρκίνου του προστάτη αυξάνεται συνεχώς τα τελευταία χρόνια, πιθανά λόγω της υιοθέτησης του δυτικού τρόπου ζωής, όπως αυξημένης κατανάλωσης ζωικού λίπους, αύξησης της παχυσαρκίας, αλλά και ανεπαρκούς φυσικής άσκησης (3).

Στις ΗΠΑ το 2008 ο αριθμός των νέων περιστατικών με καρκίνο του προστάτη αντιπροσώπευσε το 25% όλων των περιστατικών με καρκίνο που διαγνώστηκαν στους άνδρες (1). Παρά την συνεχώς μειούμενη θνητότητα, ο αριθμός των θανάτων από τον καρκίνο του προστάτη ανήλθε στη δεύτερη θέση ανάμεσα στις 10 συχνότερες αιτίες θανάτου από καρκίνο στους άνδρες για το 2008 (10%), με πρώτη τον καρκίνο του πνεύμονα (31%). Στις ΗΠΑ, η πενταετής επιβίωση για τον εντοπισμένο καρκίνο του προστάτη είναι 100%. Ωστόσο, όταν ο καρκίνος είναι τοπικά προχωρημένος ή έχει δώσει ήδη μεταστάσεις κατά τη στιγμή της διάγνωσης, η πενταετής επιβίωση ανέρχεται μόλις στο 32% (1,4).

Στην Ευρώπη, η επίπτωση της νόσου αυξάνει κατά 10-20% περίπου κάθε πενταετία. Στις χώρες της νότιας Ευρώπης, η αύξηση είναι 25% ανά πενταετία (5,6), ενώ στην Ελλάδα ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί τον δεύτερο πιο συχνό καρκίνο μετά από τον καρκίνο του πνεύμονα, απαρτίζοντας το 13,2% όλων των καρκίνων στους άρρενες. Το 2002, η επίπτωση της νόσου στην Ελλάδα ήταν 2920 νέα περιστατικά, καθιστώντας την ανάμεσα στις χώρες με το χαμηλότερο ποσοστό εμφάνισης του προστατικού καρκίνου στην Ευρώπη. Η θνητότητα είναι 8,7-12/100.000 κατοίκους (7)(Εικόνα 1).



**Εικόνα 1:** Επίπτωση του προστατικού καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο τα έτη 1988-1992

## Παράγοντες κινδύνου

### Ηλικία

Η συχνότητα του καρκίνου του προστάτη γενικά αυξάνει με την ηλικία (4,8). Είναι ασυνήθης κάτω των 50 ετών, ενώ η επίπτωση του αυξάνει δραματικά με την πάροδο της ηλικίας. Το 95% των περιπτώσεων διαγιγνώσκεται στις ηλικίες μεταξύ 45 και 89 ετών (9,10). Σύμφωνα με μια ανάλυση της επίπτωσης του προστατικού καρκίνου στις ΗΠΑ το διάστημα 2001-2005, περίπου 37% των περιστατικών διαγνώστηκαν σε άνδρες ηλικίας <65 ετών, 36% σε ηλικίες μεταξύ 65 και 74 ετών, 22% μεταξύ 75 και 84 ετών και μόλις 5% σε ηλικίες  $\geq 85$  ετών (11). Στις Η.Π.Α. ο μέσος όρος της ηλικίας διάγνωσης είναι τα 72 έτη για τους Καυκάσιους και τα 69 για τους Αфро-αμερικάνους. Επιπλέον, όταν μελετήθηκαν προστατικοί ιστοί από νεκροτομικό υλικό λευκών ανδρών που δεν είχαν ιστορικό κάποιας επέμβασης για καρκίνο του προστάτη, περίπου το 35% εκείνων ηλικίας 60-69 ετών και το 46% ηλικίας 70-81 ετών είχαν καρκίνο (8). Με την είσοδο του PSA στην κλινική εφαρμογή, το 1986, η μέση ηλικία διάγνωσης μειώθηκε κατά 2 χρόνια (12).



## Φυλή

Η συχνότητα του λανθάνοντος προστατικού καρκίνου όπως προσδιορίστηκε από νεκροψίες ανδρών που πέθαναν από άλλες αιτίες, είναι ίδια για άνδρες κάθε φυλής και ανέρχεται σε 30% σε ηλικίες άνω των 50 ετών, ενώ ξεπερνά το 75% στην ηλικία των 80 ετών (13). Αντίθετα, η συχνότητα του κλινικά εμφανούς προστατικού καρκίνου είναι 30 φορές υψηλότερη στους έγχρωμους άνδρες της Β. Αμερικής από ότι στους Ιάπωνες και 120 φορές υψηλότερη από ότι στους Κινέζους που ζουν στη Σαγκάη (14). Πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η επίπτωση του προστατικού καρκίνου είναι υψηλή στους Αφρο-Αμερικάνους (188/100.000 το χρόνο), μέση στους λευκούς Αμερικάνους (139/100.000 το χρόνο) και χαμηλή στους Αμερικάνους Ασιατικής προέλευσης (Ιάπωνες: 39/100.000 το χρόνο, Κινέζοι: 28/100.000 το χρόνο) (15,16). Όσον αφορά την επιβίωση, σε μια μελέτη της Αμερικανικής Αντικαρκινικής Εταιρείας που συνέκρινε την πενταετή επιβίωση μεταξύ λευκών και μαύρων ανάλογα με το στάδιο της νόσου, έδειξε πως οι λευκοί Αμερικάνοι έχουν μεγαλύτερη επιβίωση από ότι οι Αφρο-αμερικάνοι. Η πενταετής επιβίωση των λευκών ήταν 89% ενώ των Αφρο-αμερικάνων 73%. Αναλυτικά, στον εντοπισμένο καρκίνο η επιβίωση των λευκών ήταν 100% ενώ των Αφρο-αμερικάνων 91%, στον τοπικά προχωρημένο 94% έναντι 80% και στον μεταστατικό 31% έναντι 25%. Σε μια παρόμοια μελέτη των Pienta και συν., βρέθηκε ότι μειονέκτημα στην επιβίωση παρουσίαζαν μόνο οι Αφρο-αμερικάνοι ηλικίας κάτω των 70 ετών, μετά την ηλικία αυτή λευκοί και μαύροι παρουσίαζαν την ίδια επιβίωση (17).

Μια μεγάλης σημασίας παρατήρηση, ανάδειξε ότι ενώ οι γηγενείς Ασιάτες έχουν μικρό κίνδυνο ανάπτυξης προστατικού καρκίνου, ο κίνδυνος αυξάνεται σημαντικά σε αυτούς που μεταναστεύουν στη Δύση, παρόλο που παραμένει χαμηλότερος από τους ιθαγενείς κατοίκους (18) και ότι, δεύτερης και τρίτης γενεάς Ασιάτες εγκατεστημένοι στη Δύση παρουσιάζουν αύξηση της συχνότητας εμφάνισης προστατικού καρκίνου (19). Επίσης, φαίνεται πως οι Αφρικανοί που ζουν στην Αφρική έχουν μικρότερη επίπτωση της νόσου από ότι οι μετανάστες στην Αμερική (20). Οι επιδημιολογικές μεταβολές στη συχνότητα εμφάνισης του προστατικού καρκίνου που παρατηρούνται σε πληθυσμούς μεταναστών συμβαίνουν αρκετά γρήγορα, καταδεικνύοντας περιβαλλοντικούς και διαιτητικούς παράγοντες μάλλον, παρά γενετικούς, ως

υπεύθυνους για την πρόκληση και βιολογική αφύπνιση λανθανόντων καρκίνων.

### ***Δίαιτα και καρκίνος***

Η δυτική διαίτα είναι πλούσια σε ζωικά λίπη, πρωτεΐνες και κατεργασμένους υδρογονάνθρακες, ενώ είναι φτωχή σε φυτικές ίνες. Αντίθετα, η χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπη διαίτα των λιγότερο αναπτυγμένων Ασιατικών κοινοτήτων είναι πλούσια σε άμυλο, όσπρια, φρούτα και λαχανικά, δηλαδή τροφές με υψηλή περιεκτικότητα σε ίνες. Οι Miller και συν. επισήμαναν ότι αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες, όπως μείωση των προσλαμβανόμενων λιπαρών ουσιών και αύξηση της κατανάλωσης φυτικών ινών, επιφέρουν μείωση στην εκδήλωση ορισμένων μορφών καρκίνου μέχρι και κατά 68% (21). Έτσι, οι ίνες αυτές θεωρείται ότι έχουν προστατευτική επίδραση στους καρκίνους του παχέος εντέρου και του μαστού (22). Υπάρχουν, επίσης, ενδείξεις ότι ορισμένα μη θρεπτικά συστατικά των φυτικών προϊόντων ασκούν ανασταλτικό ρόλο στην εξέλιξη των ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων, όπως αυτών του μαστού και του προστάτη (23).

### ***Διατροφικό λίπος και προστατικός καρκίνος***

Η άποψη ότι η φτωχή σε λίπος διαίτα μπορεί να επηρεάσει την εξέλιξη ενός κλινικά λανθάνοντος όγκου και να εξηγήσει τις διαφορές στη γεωγραφική κατανομή του κλινικά σημαντικού προστατικού καρκίνου, βασίστηκε τόσο σε πειραματικές όσο και επιδημιολογικές παρατηρήσεις. Έτσι, η μετεμφύτευση καρκινικών προστατικών κυττάρων σε πειραματικά μοντέλα ζώων που βρίσκονταν σε χαμηλής περιεκτικότητας ή ελεύθερη λίπους διαίτα, συνοδεύτηκε από αναστολή της ανάπτυξης των αντίστοιχων όγκων (24). Σημαντική, επίσης, υπήρξε η παρατήρηση ότι τα ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα προάγουν τόσο την καρκινογένεση όσο και την εξέλιξη και μεταστατική ικανότητα του καρκίνου του μαστού σε πειραματόζωα, ενώ τα μακράς αλυσού ω-3 λιπαρά οξέα ασκούν ανασταλτική δράση (25). Παρόμοια συσχέτιση μεταξύ διαιτητικής πρόσληψης λίπους και ανάπτυξης προστατικού καρκίνου στους άνδρες στηρίζεται από επιδημιολογικές μελέτες, αφού άνδρες που ακολουθούσαν διαίτα πλούσια σε ω-3 λιπαρά οξέα παρουσίαζαν χαμηλότερη

συχνότητα κλινικού προστατικού καρκίνου συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ενώ τα ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα φαίνεται ότι προάγουν την εξέλιξη της νόσου (26).

Συνολικά, υπάρχουν ενδείξεις ότι ο κίνδυνος εμφάνισης του όγκου αυξάνει με δίαιτα πλούσια σε θερμίδες, ζωικό λίπος και κρέας. Η κατανάλωση κόκκινου κρέατος παρουσιάζει την ισχυρότερη συσχέτιση με τον κίνδυνο ανάπτυξης προστατικού καρκινώματος. Αντίθετα, λίπος προερχόμενο από ψάρια, λαχανικά και γαλακτοκομικά προϊόντα -εκτός από το βούτυρο- δεν φαίνεται να συνοδεύεται από αυξημένο κίνδυνο κλινικά έκδηλου καρκίνου (27).

### ***Λαχανικά, φρούτα, δημητριακά και προστατικός καρκίνος***

Μακροχρόνιες μελέτες σε μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες Ασιατικών χωρών (Ιαπωνία, Σιγκαπούρη) υπέδειξαν την καθημερινή πρόσληψη πράσινων και κίτρινων λαχανικών καθώς και προϊόντων της σόγιας, που αποτελούν βασικό τμήμα της παραδοσιακής Ασιατικής διατροφής, ως πιθανό προστατευτικό παράγοντα έναντι των δυτικών νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένων και των καρκίνων του μαστού και του προστάτη (28). Παράλληλα, αρκετές μελέτες έδειξαν την προστατευτική επίδραση της Μεσογειακής δίαιτας, η οποία συνδυάζει τη χαμηλή περιεκτικότητα σε ζωικό λίπος και κρέας με την αυξημένη πρόσληψη φρέσκων φρούτων, λαχανικών και ζυμαρικών, σε πολλούς ενδοκρινολογικούς καρκίνους (29). Κοινός παρονομαστής σε όλες αυτές τις δίαιτες είναι η αυξημένη περιεκτικότητα σε φυτοοιστρογόνα. Έτσι, οι τροφές που έχουν ως βάση τη σόγια είναι πλούσιες σε ισοφλαβονοειδή, ενώ τα δημητριακά περιέχουν πρόδρομες ουσίες των λιγνινών, μιας άλλης ομάδας φυτοοιστρογόνων. Τέλος, τόσο τα φρέσκα φρούτα όσο και τα λαχανικά περιέχουν υψηλές ποσότητες φλαβονοειδών, μερικά από τα οποία έχουν οιστρογονικές ιδιότητες.

Η παρουσία μη στεροειδών συστατικών με οιστρογονική δράση στα φυτά είναι γνωστή από καιρό. Η σόγια περιέχει γλυκοσιδικά σύμπλοκα των ισοφλαβονοειδών γενιστεΐνη και νταϊντζεΐνη, τα οποία μεταβολίζονται από τη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου στις αντίστοιχες αγλυκόνες. Στη συνέχεια, οι αγλυκόνες και οι μεταβολίτες τους απορροφούνται και εμφανίζονται στο αίμα και στα ούρα, κυρίως με τη μορφή γλυκουρονιδικών και θειικών συμπλόκων

(29). Γενικά, η παρουσία ισοφλαβονοειδών στα φυτά περιορίζεται κυρίως στα όσπρια, αν και πρόσφατα απομονώθηκαν από τη μπύρα και το ουίσκι (bourbon), γεγονός που δείχνει ότι μπορεί να είναι περισσότερο διαδεδομένα απ' ό,τι μέχρι σήμερα πιστευόταν (30).

Οι λιγνίνες (lignans) είναι μια άλλη ομάδα πολυφαινολικών φυτικών συστατικών (31). Οι πρόδρομες ουσίες μεταϊρεζινόλη (matairesinol) και ξηροϊσολαρισιρεζινόλη (secoisolarisiresinol) μεταβολίζονται στο έντερο στα ασθενή οιστρογόνα εντερολακτόνη και εντεροδιόλη, αντίστοιχα. Οι λιγνίνες απορροφούνται από το έντερο και εμφανίζονται στη συνέχεια στο αίμα και άλλα σωματικά υγρά. Είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση και πρόδρομες ουσίες τους ανευρίσκονται στα δημητριακά, σε σπόρους, στα φρούτα και στα λαχανικά. Η κυριότερη πηγή τους, είναι οι λιναρόσποροι και άλλοι ελαιόσποροι, όπως το σουσάμι (32).

Τα φλαβονοειδή έχουν συγγενή χημική δομή με τα ισοφλαβονοειδή. Είναι, όμως, ευρύτερα διαδεδομένα στη φύση και ανευρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε πολλά φρούτα και λαχανικά. Κυριότεροι εκπρόσωποι αυτής της ομάδας φυτοοιστρογόνων είναι η απιγενίνη και η καμπφερόλη, ουσίες που σε ορισμένα φυτά αποτελούν μέχρι και το 7% του καθαρού βάρους τους (π.χ. φύλλα τσαγιού).

Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι τα ισοφλαβονοειδή και οι λιγνίνες υπάρχουν φυσιολογικά στα σωματικά υγρά, τόσο των ζώων όσο και των ανθρώπων. Έτσι, ανευρίσκονται στα ούρα, στο πλάσμα, στο σάλιο και στο σπέρμα. Αλλά και η ανάλυση προστατικών εκκρίσεων κατέδειξε την παρουσία λιγνινών και ισοφλαβονοειδών, γεγονός που δείχνει ότι τα φυσικά οιστρογόνα που λαμβάνονται με την τροφή μπορούν να συγκεντρωθούν στον προστάτη. Τα επίπεδα των ισοφλαβονοειδών είναι υψηλά στα ούρα και στο πλάσμα των Ιαπώνων και Κινέζων, των οποίων η παραδοσιακή διατροφή περιέχει μεγάλες ποσότητες προϊόντων σόγιας. Οι συγκεντρώσεις των λιγνινών είναι υψηλές στα ούρα των χορτοφάγων, των οποίων η διατροφή περιέχει μεγάλες ποσότητες δημητριακών ολικής αλέσεως, φρούτων και λαχανικών. Από την άλλη πλευρά, σε άνδρες δυτικών χωρών, που σιτίζονταν με 40 g σόγιας ημερησίως, η αποβολή της ισόλης στα ούρα τους βρέθηκε 1000 φορές αυξημένη σε σχέση με τους μάρτυρες (33). Αρχίζει, λοιπόν, να διαφαίνεται ότι η χαμηλή συχνότητα εμφάνισης προστατικού καρκίνου, τόσο στους Κινέζους

και Ιάπωνες, όσο και στους χορτοφάγους συγκριτικά με άλλους άνδρες δυτικών χωρών, μπορεί να σχετίζεται με την αυξημένη διαιτητική πρόσληψη φυτοοιστρογόνων.

### **Βιταμίνη Α**

Ο βιολογικός ρόλος της βιταμίνης Α στη διαφοροποίηση των κυττάρων καθώς και η σχέση της με διάφορους τύπους καρκίνων έχει ευρέως μελετηθεί. Ερευνητές αναφέρουν μείωση της επίπτωσης του προστατικού καρκίνου σε πειραματικά μοντέλα ποντικών μετά από χορήγηση βιταμίνης Α. Επιδημιολογικές μελέτες δεν κατάφεραν ακόμη να ξεδιαλύνουν τον ρόλο της βιταμίνης Α στην καρκινογένεση του προστάτη. Έτσι, κάποιες αναφέρουν την μείωση του καρκίνου σε αυξημένη πρόσληψη ενώ, άλλες αναφέρουν το αντίθετο. Μια από τις θεωρίες που εξηγεί τα αντικρουόμενα ευρήματα των διαφόρων μελετών είναι ότι η φυτικής προέλευσης βιταμίνη ασκεί προστατευτικό ρόλο ενώ, η ζωικής όχι. Στην Ιαπωνία και σε άλλες χαμηλού κινδύνου περιοχές, η μεγαλύτερη πηγή πρόσληψης της βιταμίνης είναι τα λαχανικά ενώ στις Η.Π.Α. είναι το ζωικό λίπος (34).

### **Βιταμίνη D**

Ο πιθανός προστατευτικός ρόλος της βιταμίνης D στην ανάπτυξη του προστατικού καρκίνου βασίστηκε στις παρατηρήσεις ότι η θνησιμότητα από το αδενοκαρκίνωμα του προστάτη είναι αντιστρόφως ανάλογη με την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, ότι το ποσοστό αυξάνει με την ηλικία όπου είναι γνωστό πως οι ηλικιωμένοι παρουσιάζουν έλλειμμα βιταμίνης D, και ότι το ποσοστό του καρκίνου είναι επίσης αυξημένο στους μαύρους, όπου γνωρίζουμε ότι έχουν ελαττωμένες συγκεντρώσεις βιταμίνης D στο ορό (35). Ο ρόλος αυτός όμως φαίνεται ότι ενισχύεται και από πειραματικά δεδομένα. Έτσι, βρέθηκε ότι τα προστατικά καρκινικά κύτταρα τύπου LNCaP φέρουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς της βιταμίνης D (36) και ότι τα φυσιολογικά επίπεδα της 1,25 διυδροξυβιταμίνης D<sub>3</sub> ασκούν ανασταλτικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων προστατικών καρκινικών κυττάρων (37). Επιπλέον, οι Corder και συν. μέτρησαν χαμηλότερα επίπεδα της 1,25 διυδροξυβιταμίνης D<sub>3</sub> σε ασθενείς με προστατικό καρκίνωμα από ότι σε υγιή

άτομα (38). Τα αποτελέσματα αυτά ωστόσο αμφισβητούνται λόγω μεθοδολογικών προβλημάτων.

### **Βιταμίνη Ε**

Μια ευρεία επιδημιολογική μελέτη σε 29.000 άνδρες που λάμβαναν α-τοκοφερόλη (βιταμίνη Ε) κατέγραψε σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό προστατικού καρκίνου (34%) σε σχέση με τον πληθυσμό που λάμβανε placebo (39). Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν για πιθανή αρνητική συσχέτιση μεταξύ συμπληρωματικής πρόσληψης βιταμίνης Ε και ανάπτυξης προστατικού καρκινώματος.

### **Σελήνιο**

Η παρατήρηση ότι η συχνότητα του προστατικού καρκίνου είναι μικρότερη σε περιοχές με υπέδαφος πλούσιο σε σελήνιο απ' ότι σε περιοχές με χαμηλή περιεκτικότητα οδήγησε στην υπόθεση ότι ίσως το ιχνοστοιχείο αυτό επηρεάζει τη φυσική ιστορία του προστατικού καρκίνου. Αν και η πιθανή προφυλακτική δράση του σεληνίου σε άλλες νεοπλασίες ενισχύεται από ευρήματα σε πειραματόζωα, δεν βρέθηκε σταθερή συσχέτιση ανάμεσα στη διαιτητική πρόσληψη σεληνίου και στον προστατικό καρκίνο. Η πιο σημαντική ίσως μελέτη για τον προστατευτικό ρόλο του σεληνίου έναντι του καρκίνου του προστάτη είναι αυτή των Clark και συν., οι οποίοι διαπίστωσαν μείωση της τάξης του 63% στην επίπτωση του προστατικού καρκίνου σε άνδρες που λάμβαναν σελήνιο σαν διατροφικό συμπλήρωμα (40). Τα αποτελέσματα αυτά, όμως, πρέπει να επιβεβαιωθούν και από άλλες μελέτες.

### **Κάδμιο**

Το κάδμιο είναι ένα ιχνοστοιχείο που βρίσκεται στον καπνό του τσιγάρου και στους αλκαλικούς ηλεκτρικούς συσσωρευτές (μπαταρίες). Μελέτες έδειξαν μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ υψηλών επιπέδων καδμίου και προστατικού καρκίνου. Η πιθανή εξήγηση είναι ότι το κάδμιο δρα ανταγωνιστικά με τον ψευδάργυρο ο οποίος είναι απαραίτητος σε πολλά ενδοκυττάρια μεταβολικά μονοπάτια στον προστάτη (41).

### **Οικογενειακό ιστορικό – Γενετική προδιάθεση**

Αρκετές μελέτες αναφέρουν την αυξημένη προσβολή από καρκίνο του προστάτη σε μέλη της ίδιας οικογένειας (42). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι το 1/6 των ανδρών στις Η.Π.Α θα αναπτύξει καρκίνο του προστάτη στη διάρκεια της ζωής του. Όταν ένας συγγενής πρώτου βαθμού έχει αναπτύξει τη νόσο, ο κίνδυνος εμφάνισης διπλασιάζεται, εάν οι συγγενείς είναι δυο, τότε η πιθανότητα εμφάνισης πενταπλασιάζεται και τέλος, εάν είναι τρεις, η πιθανότητα ανάπτυξης είναι 97%. Πρόσφατα, οι Issacs και συν. ανέπτυξαν την πληρέστερη θεωρία όσον αφορά τις γενετικές αλλοιώσεις στον καρκίνο του προστάτη, ενοχοποιώντας τα χρωμοσώματα 8p,17p και 16q, η αλλοιωμένη μεθυλίωση του DNA στο χρωμόσωμα 17p, η E-Κατχερίνη, καθώς και τα ογκογονίδια p53 και RB (43).. Οι Smith και συν. μελέτησαν το γονιδίωμα οικογενειών που έπασχαν από καρκίνο στην Αμερική και στη Σουηδία και βρήκαν ότι μια μικρή περιοχή στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 1 πιθανώς να εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια του 1/3 περίπου των νεοπλασιών. Η περιοχή αυτή (1q 24-25) ονομάστηκε HPC1 (Hereditary Prostate Cancer 1) (44).

### **ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ**

#### *Φυσική ιστορία της νόσου*

Μια από τις πιο συγκεχυμένες πλευρές του καρκίνου του προστάτη είναι η φυσική του ιστορία. Οι κυριότερες αιτίες γι' αυτό φαίνεται πως είναι δυο: η διαφορά μεταξύ του πραγματικού και του κλινικού επιπολασμού της νόσου και η ετερογένεια στη βιολογική συμπεριφορά της νεοπλασίας. Επιπλέον, σύγχυση εξακολουθεί να υπάρχει ακόμη και σήμερα, λόγω των αντιθέτων απόψεων που αφορούν στη θεραπευτική αντιμετώπιση (παρακολούθηση, ακτινοβολία, χειρουργική) της εντοπισμένης νόσου (45).

Πριν την εποχή της εισόδου του PSA στην κλινική πράξη ο επιπολασμός της νόσου για άνδρες άνω των 50 ετών υπολογιζόταν περίπου 30%. Ο κίνδυνος διάγνωσης κλινικού καρκίνου κατά τη διάρκεια της ζωής ενός άνδρα ήταν 9,5%, ενώ η ειδική από τη νόσο θνητότητα ήταν 3% (46). Η εισαγωγή του PSA στα τέλη της 10ετίας του 80 έφερε επανάσταση στη διάγνωση, σταδιοποίηση και αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη (47). Σαν αποτέλεσμα του μαζικού πληθυσμιακού ελέγχου οι νέο-διαγνωσθέντες

καρκίνοι αυξήθηκαν κατά 40% (48). Σε μελέτες ελέγχου πληθυσμών σχεδόν το 70% των διαπιστούμενων καρκίνων βρέθηκαν ότι είναι εντοπισμένοι, σε αντίθεση με το 30% αυτών που δεν υποβάλλονται σε έλεγχο (49).

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι κλινικά εντοπισμένοι όγκοι έχουν διαφορετική κλινική πορεία η οποία δεν μπορεί να προβλεφθεί (50). Μελετώντας τον προστατικό καρκίνο προκύπτουν διάφορα ερωτήματα που δυστυχώς δεν έχουν ακόμη απαντηθεί. Ο προστατικός καρκίνος αναπτύσσει κυτταρικές υποκατηγορίες (κλώνους) με διαφορετική βιολογική συμπεριφορά (εξέλιξη και μεταστατική ιδιότητα) από την αρχή της γένεσης του ή αποκτά αυτές τις ιδιότητες καθώς εξελίσσεται;

Η γνώση μας για την φυσική ιστορία του προστατικού καρκίνου και άρα η απάντηση στα ερωτήματα, οφείλεται σε ένα μεγάλο μέρος στις μελέτες προσεκτικής παρακολούθησης που έγιναν σε Σκανδιναβικές χώρες κυρίως. Οι Jahansson et al., αναφέρουν ότι σε διάρκεια 15 ετών, μόνο το 11% από τους 223 ασθενείς με εντοπισμένο καρκίνο πέθαναν από τη νόσο (51). Όμως, μια προσεκτική ανάλυση της μελέτης αναδεικνύει πως ένα μεγάλο μέρος των ασθενών ήταν πάνω από 72 έτη και ότι το 66% των ασθενών παρουσίαζαν καλώς διαφοροποιημένους όγκους. Επομένως, τα συμπεράσματα δεν είναι αξιολογήσιμα. Σε μια άλλη σημαντική μελέτη οι Albertsen et al., απέδειξαν τη σημαντικότητα της διαφοροποίησης των κυττάρων στην επιβίωση. Η μελέτη περιελάμβανε άνδρες ηλικίας 65-75 ετών με κλινικά εντοπισμένο όγκο. Βρέθηκε, πως στην 15ετή επιβίωση έφτασε το 91% των καλά διαφοροποιημένων όγκων, το 76% των μέτρια και το 54% των αδιαφοροποίητων (52). Ένα επιπλέον νέο στοιχείο που βγήκε στην επιφάνεια από μια μεγάλη Σουηδική μελέτη, που έγινε τα έτη 1971-1987 και περιελάμβανε 6514 ασθενείς, είναι ο παράγοντας ηλικία. Φάνηκε πως ο κίνδυνος να πεθάνει κάποιος από τη νόσο έφτανε στο 80% όταν η ηλικία του ασθενούς ήταν μικρότερη από 60 έτη, ενώ ήταν 46% για ηλικίες άνω 80 των ετών (53). Από τις μελέτες αυτές υποστηρίζεται η πρώτη θεωρία της ανάπτυξης του προστατικού καρκίνου, ότι κυτταρικοί κλώνοι με διαφορετική εξέλιξη υπάρχουν από την αρχή της καρκινογένεσης.

Αργότερα οι Stamey and McNeal σε μελέτες τους βρήκαν ότι το μέγεθος της νεοπλασίας είναι εκείνο που επηρεάζει την διαφοροποίηση των κυττάρων (Gleason grade), και άρα ήταν το σημαντικότερο προγνωστικό στοιχείο της



προόδου της νόσου (54-56). Σύμφωνα με τα ευρήματα αυτά οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η διαφορετική βιολογική συμπεριφορά της νεοπλασίας αποκτιέται με την εξέλιξη της νόσου.

Οι απαντήσεις στα ερωτήματα δεν είναι ακόμα γνωστές και σίγουρα η διαφοροποίηση των κυττάρων και το μέγεθος του όγκου δεν είναι οι κατάλληλοι δείκτες της επιθετικότητας της νόσου.

Όπως φαίνεται από τις μελέτες προσεκτικής παρακολούθησης πιθανόν η νεοπλασία να παρουσιάζει διαφορετικούς υποπληθυσμούς κυττάρων με διαφορετική συμπεριφορά. Όμως, έχει βρεθεί ότι αδιαφοροποίητοι όγκοι όταν διαγνωστούν και αντιμετωπιστούν έγκαιρα έχουν υψηλά ποσοστά ίασης (57). Τέλος, σε άλλες μελέτες βρήκαν χαμηλής διαφοροποίησης νεοπλασίες σε όγκους μικρού μεγέθους (58). Τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα και οι απαντήσεις δεν είναι σαφείς. Χρειάζονται καλύτεροι δείκτες εκτίμησης διαφορετικοί από τους είδη χρησιμοποιούμενους. Η πρόοδος της μοριακής βιολογίας αναμένεται να απαντήσει σε πολλά ερωτήματα που αφορούν την καρκινογένεση και την φυσική ιστορία της νόσου.

## **ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ**

### **ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ**

Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι ειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι ενεργοποιούνται με την σύνδεση κάποιου ειδικού προσδέτη (ligand) και ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου (59-61). Οι λιπόφιλες ορμόνες διαχέονται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης και δυνητικά αποτελούν προσδέτες για τους υποδοχείς αυτούς. Οι πυρηνικοί υποδοχείς συνήθως βρίσκονται σε λανθάνουσα φάση είτε στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες θερμικού stress, είτε μέσα στον πυρήνα (62). Όταν συνδεθούν με τον συμπληρωματικό τους προσδέτη, υφίστανται δομικές αλλαγές που ευνοούν τον σχηματισμό δραστικών διμερών και τη μετακίνησή τους στον πυρήνα, όπου συνδέονται με ειδικές αλληλουχίες του DNA και ρυθμίζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (63). Οι πυρηνικοί υποδοχείς διακρίνονται σε:

- *Στεροειδείς υποδοχείς*: υποδοχείς των αλατοκορτικοειδών, των γλυκοκορτικοειδών, των οιστρογόνων, των ανδρογόνων και της προγεστερόνης.
- *Μη στεροειδείς υποδοχείς*: υποδοχείς των ρετινοειδών, της βιταμίνης D3, των θυρεοειδικών ορμονών, των φαρνεσοειδών-FXR και των εικοσανοειδών-PPAR. Οι μη στεροειδείς πυρηνικοί υποδοχείς σχηματίζουν κυρίως ετεροδιμερή, με κοινό παράγοντα τον υποδοχέα RXR.
- *Ορφανούς πυρηνικούς υποδοχείς*: υποδοχείς των οποίων ο προσδέτης παραμένει ακόμα άγνωστος (64).

Βασική διαφορά των στεροειδών από τους μη στεροειδείς πυρηνικούς υποδοχείς είναι το γεγονός ότι ενώ οι στεροειδείς δεν επηρεάζουν τη μεταγραφή όταν απουσιάζει ο προσδέτης τους, οι μη στεροειδείς πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να συνδέονται με το DNA χωρίς την παρουσία του προσδέτη, καταστέλλοντας τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων- φαινόμενο γνωστό ως 'αποσιώπηση'- *silencing* (65).

Δεδομένου ότι οι πυρηνικοί υποδοχείς διαδραματίζουν ένα εξαιρετικά σημαντικό, για το κύτταρο, ρόλο, έχουν σε μεγάλο βαθμό διατηρηθεί εξελικτικά και χαρακτηρίζονται από κοινά δομικά συστατικά (66,67). Αποτελούνται από:

- μια αμινοξυτελική περιοχή (A/B), η οποία περιέχει μια αυτόνομα λειτουργούσα περιοχή, AF-1 (activation function 1), η οποία σχετίζεται με μεταγραφική ενεργοποίηση που πραγματοποιείται ανεξάρτητα από την σύνδεση του προσδέτη.
- μια πολύ συντηρημένη περιοχή (C), η οποία περιλαμβάνει την περιοχή σύνδεσης με το DNA (DNA binding domain) που αναγνωρίζει ειδικά response elements πάνω στο DNA. Συνήθως αποτελείται από δύο νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, οι οποίες στην περίπτωση των μη στεροειδών πυρηνικών υποδοχέων, είναι ίδιες και συνεχείς. Οι δύο αλληλουχίες χωρίζονται από μία ενδιάμεση, μη σταθερού μήκους. Τα ετεροδιμερή του υποδοχέα RXR προτιμούν να συνδέονται με αλληλουχίες του DNA στις οποίες η ενδιάμεση αλληλουχία είναι ένα νουκλεοτίδιο (DR1).

- μια περιοχή (D), η οποία συμμετέχει στις λειτουργικές αλλαγές που προκαλούνται με την σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα και ενέχεται στην αλληλεπίδραση με τους *ενδιάμεσους μεταγραφικούς παράγοντες (συν-παράγοντες)* (68,69).
- μια καρβοξυτελική περιοχή (E/F), η οποία περιέχει αφενός την περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα με τον προσδέτη (ligand binding domain) και την περιοχή σχηματισμού των διμερών (dimerization domain), αφετέρου μια εξαρτώμενη από τον προσδέτη λειτουργούσα περιοχή, την AF-2 (ligand dependent activation function region 2). Η AF-2 συνδέεται με συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς και συμμετέχει στη μεταγραφική ενεργοποίηση, την πυρηνική μετανάστευση και την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες θερμικού stress (70). Φαίνεται ότι η σύνδεση του προσδέτη με την συμμετοχή των ενδιάμεσων μεταγραφικών παραγόντων έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της στερεοταξικής διαμόρφωσης του υποδοχέα και την αλληλεπίδραση των AF-1 και AF-2 περιοχών, με τελικό αποτέλεσμα τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων (71,72).

Συμπερασματικά, η κυτταρική απάντηση σε έναν ενεργοποιημένο πυρηνικό υποδοχέα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, π.χ. από τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα στο όργανο στόχο, την αλληλουχία του DNA που αναγνωρίζει η DBD του υποδοχέα, τη χωροδιάταξη κρίσιμων αλληλουχιών ανάμεσα στα HREs, την ικανότητα διμερισμού κ.ά (73,74). Η δυνατότητα αλληλεπίδρασης των πυρηνικών υποδοχέων με άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος καθώς επίσης και η θετική ή αρνητική επίδραση τους στη δράση και λειτουργία άλλων μεταγραφικών παραγόντων (μεταγραφικό cross-talk) δημιουργεί επιπλέον επίπεδα πολυπλοκότητας και σημαντικότητας της δράσης των πυρηνικών υποδοχέων.

Η ενεργοποίηση της μεταγραφικής ρύθμισης από τους πυρηνικούς υποδοχείς απαιτεί την στρατολόγηση πολλών και διαφορετικών ενζυμικών δράσεων από ακετυλάσες, αποακετυλάσες, κινάσες, φωσφατάσες, ATPάσες, πρωτεάσες κ.ά.- η συντονισμένη και αρμονική συνεργασία των οποίων θα οδηγήσει στην, ειδική σε κάθε προσδέτη, μεταγραφική απάντηση και απόκριση (75). Πρωταγωνιστικό ρόλο στη διαδικασία αυτή παίζουν οι

συμπαράγοντες, οι οποίοι όλοι μαζί σχηματίζουν ένα πολύπλοκο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο αποδιοργανώνει την χρωματίνη από την οργανωμένη της μορφή, το νουκλεόσωμα, και επιτρέπει τον σχηματισμό του προεναρκτήριου συμπλόκου στον υποκινητή του προς μεταγραφή γονιδίου (76).

Συνολικά, λοιπόν, φαίνεται ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση από τους πυρηνικούς υποδοχείς είναι μια πολυσταδιακή και αρκετά πολύπλοκη διαδικασία, τόσο ως προς τις δράσεις της, όσο και ως προς τα επίπεδα ρύθμισης.

## **ΡΟΛΟΣ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ**

Η Τεστοστερόνη του πλάσματος κατά 95% παράγεται από τα κύτταρα του Leydig. Είναι παράγωγο του ανδροστανίου ( $C_{19}$  στεροειδές) με τη χαρακτηριστική κετονική ομάδα στον άνθρακα της θέσεως 3, με διπλό δεσμό στη θέση  $\Delta_{4-5}$  και με το υδροξύλιο στον άνθρακα της θέσεως 17. Η σύνθεση της γίνεται με το μηχανισμό της στεροειδογένεσης στα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων. Για πολλά χρόνια επικρατούσε η άποψη ότι η μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη ήταν το σημείο κλειδί στη σύνθεση της ορμόνης. Η άποψη αυτή δεν είναι πλέον παραδεκτή γιατί αποδείχτηκε πως μια πρωτεΐνη των μιτοχονδρίων, με μοριακό βάρος 30 Kda, διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη στεροειδογένεση. Η πρωτεΐνη αυτή ονομάζεται οξεία ρυθμιστική πρωτεΐνη (steroidogenic acute regulatory protein-StAR), και μεσολαβεί στη μεταφορά της χοληστερόλης προς την εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (77).

Η πυκνότητα της τεστοστερόνης στην σπερματική φλέβα είναι 40 - 50  $\mu\text{g/dl}$  και είναι κατά 75 φορές μεγαλύτερη από ότι στο περιφερικό αίμα. Το μεγαλύτερο μέρος της ορμόνης του πλάσματος βρίσκεται σε ανενεργό μορφή, συνδεδεμένη με πρωτεΐνες του πλάσματος (κυρίως με SHGB), και μόνο 2-3% κυκλοφορεί ελεύθερη που αποτελεί το βιολογικά δραστικό κλάσμα. Η τιμή της στον ορό στο φυσιολογικό ενήλικα είναι  $611 \pm 186 \text{ ng/dl}$  (300 – 1000). Η τιμή αυτή ανευρίσκεται στις ηλικίες από 25 – 70 ετών. Μετά την ηλικία των 70 η τιμή της ορμόνης μειώνεται σε 500  $\text{ng/dl}$  (78).

Η αύξηση του επιπέδου της τεστοστερόνης στο αίμα ξεκινά μια ανάδρομη διαδικασία, που αναστέλλει την απελευθέρωση της GnRH στον υποθάλαμο, με αποτέλεσμα την αναστολή της παραγωγής των γοναδοτροπινών από την υπόφυση, και τον περιορισμό της παραγωγής τεστοστερόνης, έως ότου τα επίπεδά της στο αίμα επανέλθουν στα φυσιολογικά επίπεδα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι και τα παραγόμενα από τους όρχεις οιστρογόνα αναστέλλουν επίσης την έκκριση τόσο της LH όσο και της FSH. Επίσης, η έκκριση της LH καταστέλλεται και από τους μεταβολίτες της όπως η διϋδροτεστοστερόνη αλλά και τα οιστρογόνα. Φαίνεται ότι τα ανδρογόνα ασκούν την ανασταλτική τους δράση στον υποθάλαμο, ενώ τα οιστρογόνα (οιστραδιόλη) στην υπόφυση (79).

Η Τεστοστερόνη αποτελεί το κύριο ανδρογόνο που υπάρχει στην κυκλοφορία στους άνδρες (80). Στον προστάτη και σε άλλα όργανα, η τεστοστερόνη δρα ως πρόδρομος ορμόνη-μετατρέπεται σε διϋδροτεστοστερόνη (DHT) στα βασικά κύτταρα και στα κύτταρα του προστατικού στρώματος από την 5<sup>α</sup>-αναγωγή, ένα ενδοκυττάριο ένζυμο που υπάρχει στον προστάτη, στο δέρμα και στο ήπαρ (80,81). Είναι χαρακτηριστικό ότι ενώ ο λόγος Τεστοστερόνης/ Διϋδροτεστοστερόνης στο πλάσμα είναι 10:1, η σχέση αυτή αντιστρέφεται στο εσωτερικό του προστάτη αδένος (82). Είναι αξιοσημείωτο δε, ότι η Διϋδροτεστοστερόνη έχει δέκα φορές περισσότερη συγγένεια με τον ανδρογονικό υποδοχέα (AR) από ό,τι η τεστοστερόνη (83).

Η Διϋδροτεστοστερόνη αποτελεί λοιπόν το πρωταρχικό προστατικό ανδρογόνο και παίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη του αδένος. Ανάλογα με τις φάσεις ανάπτυξης του ατόμου, από την ενδομήτρια μέχρι και την ενήλικη ζωή, η Διϋδροτεστοστερόνη επιτελεί διάφορες λειτουργίες, από την διαφοροποίηση του φύλου, μέχρι την ανάπτυξη δευτερευόντων χαρακτηριστικών του αρρένους (τριχοφυΐα, φαλάκρα, ακμή), καθώς και του προστάτη αδένος (82,84).

Ορμόνη	ng/100ml	Ημερήσια παραγωγή mg/day
Τεστοστερόνη	611 ± 186	6.6 ± 0.5
Διυδροτεστοστερόνη	56 ± 20	0.3 ± 0.06
3α-ανδροστανεδιόλη	14 ± 4	0.2 ± 0.03
3β-ανδροστανεδιόλη	<2	<0.3
Ανδροστενεδιόλη	161 ± 52	
Ανδροστερόνη	54 ± 32	0.28
Ανδροστενεδιόνη	150 ± 54	1.4
Διυδροεπιανδροστερόνη	501 ± 98	29
Προγεστερόνη	30	
17β-οιστραδιόλη	2.5 ± 0.08	0.75
Οιστρόνη	4.6	0.045

**Πίνακας 1:** Φυσιολογικές τιμές των στεροειδικών ορμονών στον ορό

## ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

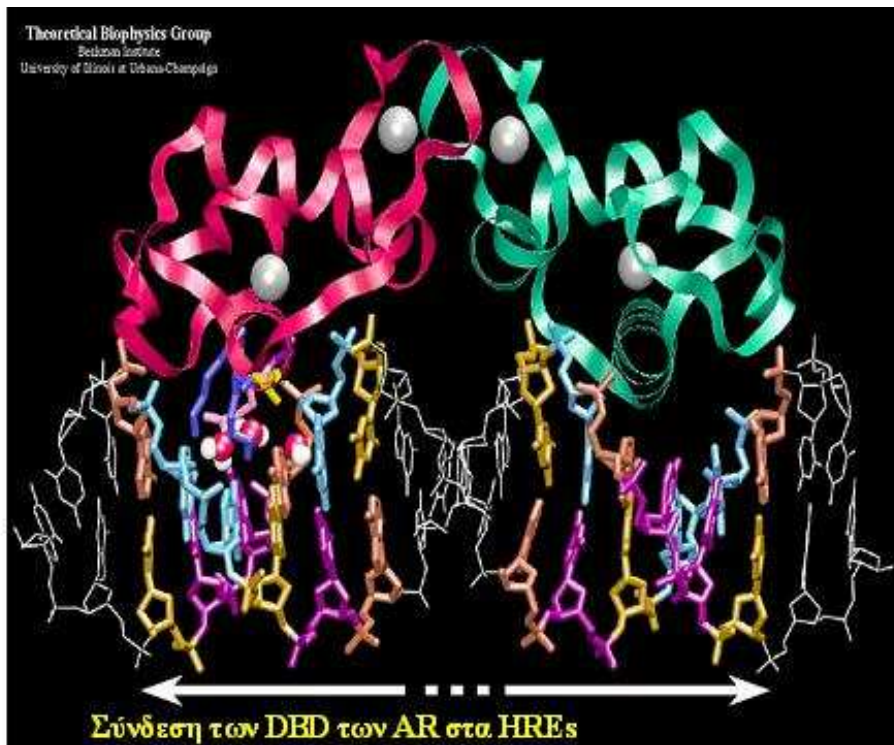
Ο μηχανισμός δράσης των ανδρογόνων στον προστάτη αδένα φαίνεται ότι επιτελείται μέσω της μετατροπής της κυκλοφορούσας τεστοστερόνης σε διυδροτεστοστερόνη μέσα στο προστατικό κύτταρο και ακολούθως μέσω της σύνδεσης της διυδροτεστοστερόνης με τον ειδικό ανδρογονικό υποδοχέα (AR). Η αλληλουχία των γεγονότων από εκεί και μετά έχει σαν τελικό αποτέλεσμα την πρωτεϊνοσύνθεση ή/και την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Οι χρονικές διαδικασίες του φαινομένου είναι (εικόνα 3):

- είσοδος της τεστοστερόνης στο κύτταρο με το μηχανισμό της διάχυσης
- αναγωγή της σε DHT με τη βοήθεια του ενζύμου 5α-αναγωγάση.

σύνδεση της DHT ή της τεστοστερόνης με τον ειδικό υποδοχέα που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (Androgen Receptor, AR).

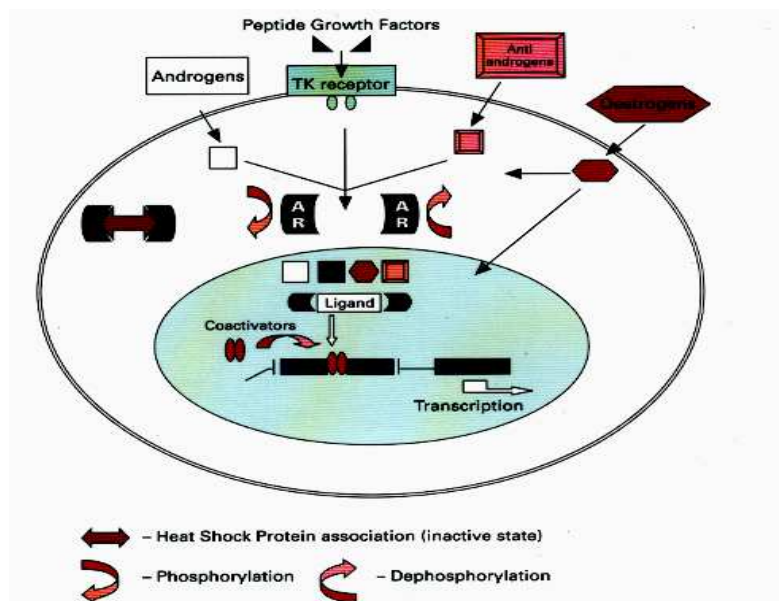
- ενεργοποίηση του ανδρογονικού υποδοχέα του πυρήνα με τη δημιουργία στερεοτακτικών αλλαγών, φωσφορυλίωσης και σύνδεσης με τα ανδρογονικά στοιχεία του υποδοχέα (androgen receptor elements, ARE) των γονιδίων-στόχων (εικόνα 2). Οι αλλαγές αυτές ακολουθούνται από απελευθέρωση μιας πρωτεΐνης γνωστής σαν πρωτεΐνες θερμικού στρές HSP 90 (Heat Shock Protein). Επίσης, οι αλλαγές αυτές επιτρέπουν τον διμερισμό του συμπλόκου DHT-AR και την σύνδεση του με συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος. τα ARE προκαλούν αλλαγές στην δομή της χρωματίνης επάγοντας την βιολογική έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων.
- ο υποδοχέας δρα σαν παράγοντας μεταγραφής και προκαλεί αύξηση της RNA πολυμεράσης και των RNA αγγελιοφόρων (mRNA).
- επιτελείται η μεταγραφή του μηνύματος. γίνεται η μεταφορά των mRNA στα ριβοσώματα για να αρχίσει η μετάφραση και η παραγωγή των πρωτεϊνών, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες (EGF, PdGF, κ.α)
- ακολουθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών σε ειδικά σημεία του κυττάρου όπου γίνεται η μετα-μεταφραστική τροποποίηση τους.
- αποθήκευση των πρωτεϊνών σε εκκριτικά κυστίδια.



**Εικόνα 2:** Σύνδεση των περιοχών σύνδεσης με το DNA (DNA Binding Domain, DBD) του ανδρογονικού υποδοχέα (AR) στα ανδρογονικά στοιχεία του υποδοχέα (androgen receptor elements, ARE) των γονιδίων-στόχων

Με την διαδικασία αυτή επάγονται γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προάγουν την παραγωγή πεπτιδικών αυξητικών παραγόντων που είναι απαραίτητοι για τις διαδικασίες ανάπτυξης, κυτταρικής διαίρεσης, διαφοροποίησης και ομοιόστασης. Όπως είναι γνωστό, η μιτογόνος δράση των ανδρογόνων στον προστάτη επιτελείται μέσω αυξητικών παραγόντων που παράγονται από τον αδένα. Επίσης, τα ανδρογόνα σε συνεργασία με τους αυξητικούς παράγοντες υπεισέρχονται στην δομική ισορροπία (σύνθεση και καταστροφή) της εξωκυττάριας ουσίας που με τη σειρά της παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων (85).





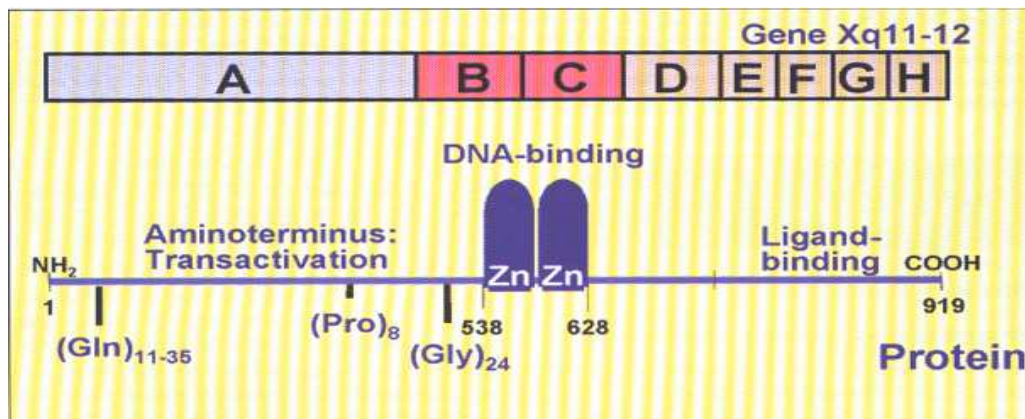
**Εικόνα 3:** Τρόπος δράσης των στεροειδών και των αυξητικών παραγόντων στον ανδρογονικό υποδοχέα

### Ανδρογονικός υποδοχέας

Είναι ανδρογονοεξαρτώμενος μεταγραφικός παράγοντας, μέλος της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων. Το γονίδιο του βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του X χρωματοσώματος (Xq11-12), αποτελείται από οκτώ εξόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 98,8 kD και περιέχει 917 αμινοξέα, τον ανδρογονικό υποδοχέα (86). Είναι μέλος μιας μεγάλης οικογένειας πυρηνικών υποδοχέων η οποία περιλαμβάνει στεροειδικούς, θυροειδικούς και υποδοχείς της βιταμίνης D.

Αποτελείται από τρία κύρια μέρη (Εικόνα 4,5) (87):

- α) το μεταγραφικό, που βρίσκεται στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο του υποδοχέα
- β) την προσδένουσα το DNA περιοχή (DNA Binding Domain, DBD) που συνδέεται με τα ARE
- γ) την προσδένουσα τα ανδρογόνα περιοχή (Ligand Binding Domain, LBD) στο C-τελικό άκρο



**Εικόνα 4:** Σχηματική απεικόνιση του ανδρογονικού υποδοχέα.



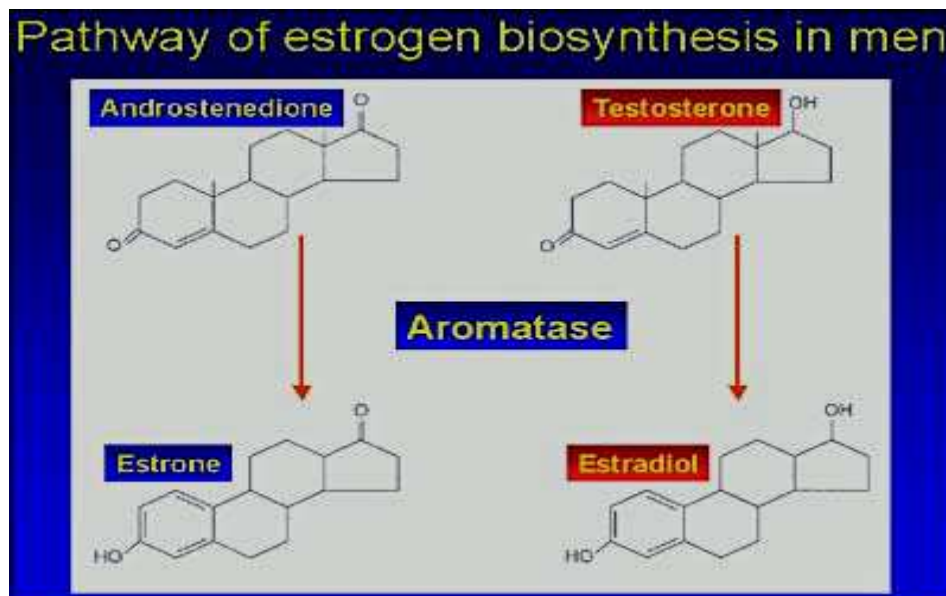
**Εικόνα 5:** Τριτοταγής δομή ανδρογονικού υποδοχέα (AR)

Η NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή του ανδρογονικού υποδοχέα περιέχει δύο περιοχές τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων, πολυμορφικές σε μήκος (Εικόνα 4), τις CAG (11-31 επαναλήψεις) και τις GGC (10-22 επαναλήψεις), οι οποίες κωδικοποιούν δύο αμινοξέα, τη γλουταμίνη και τη γλυκίνη, αντίστοιχα. Ανάμεσα σε αυτές τις δύο περιοχές μεσολαβεί μια μη πολυμορφική περιοχή αποτελούμενη από 248 αμινοξέα (88,89).

## ΡΟΛΟΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

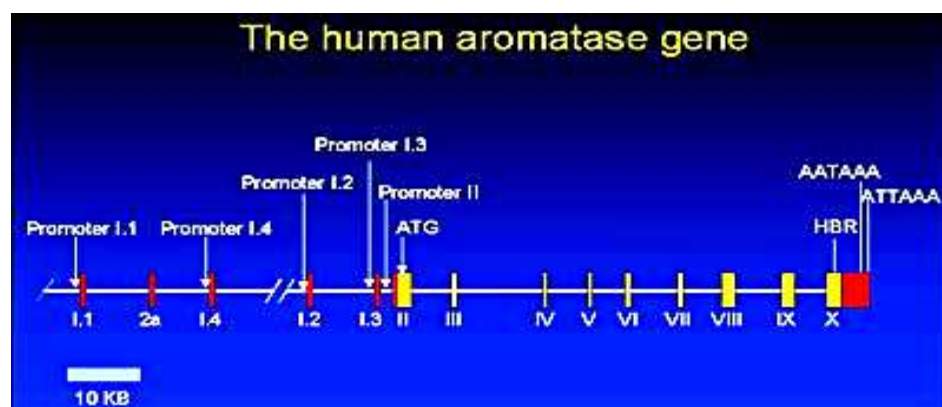
Στους άρρενες τα οιστρογόνα παράγονται από τα κυκλοφορούντα ανδρογόνα μέσω της αρωματοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, η τεστοστερόνη και η ανδροστενδιόνη μέσω της παρουσίας του ενζύμου αρωματάση, μετατρέπονται περιφερικά σε οιστραδιόλη και οιστρόνη, αντίστοιχα. Η

αρωματάση αποτελεί ένζυμο του κυτοχρώματος P450, είναι συστατικό του ενδοπλασματικού δικτύου και μέσω διαδοχικών υδροξυλιώσεων του υποστρώματος (ανδρογόνα) οδηγεί τελικά στην δημιουργία των οιστρογόνων (εικόνα 6).



**Εικόνα 6:** Σύνθεση οιστρογόνων μέσω αρωματοποίησης των ανδρογόνων στους άρρενες

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την P 450 αρωματάση βρίσκεται στο χρωμόσωμα 15 και αποτελείται από 16 exons (εικόνα 7) (90).



**Εικόνα 7:** Το γονίδιο της ανθρώπινης αρωματάσης

Από εκεί και πέρα τα οιστρογόνα, μέσω των ενεργών μορφών της οιστραδιόλης και της οιστρόνης (E2 και E1), εισέρχονται στο κύτταρο-στόχο και ασκούν την μεταγραφική δράση τους σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος .

Είναι γνωστό ότι, ενώ χαμηλές ποσότητες οιστρογόνων κυκλοφορούν σε όλη τη διάρκεια της ζωής των ανδρών, υπάρχουν δύο περίοδοι κατά τις οποίες παρατηρείται ιδιαίτερα αυξημένη έκθεση σε οιστρογόνα, η μια κατά την εμβρυική περίοδο και η άλλη κατά την περίοδο της τρίτης ηλικίας.

Κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου της εγκυμοσύνης, η αύξηση της μητρικής οιστραδιόλης σε συνδυασμό με την πτώση της παραγωγής των ανδρογόνων, έχει σαν αποτέλεσμα την πλακώδη μεταπλασία του αναπτυσσόμενου προστατικού επιθηλίου, το οποίο επανέρχεται μετά τη γέννηση, όταν τα οιστρογόνα πέφτουν στα αναμενόμενα επίπεδα (91,92). Παρά το γεγονός ότι ο ρόλος των οιστρογόνων κατά την ανάπτυξη του προστάτη δεν είναι πλήρως κατανοητός, μελέτες έχουν δείξει ότι η αυξημένη έκθεση κατά την εμβρυική ηλικία έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη επίπτωση της καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη (ΚΥΠ) και του προστατικού καρκίνου στην μετέπειτα ζωή του άρρενος (93). Παθολογικές καταστάσεις της κύησης, όπως προεκλαμψία, παρατεταμένη διάρκεια και ίκτερος, σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων και προστατικό καρκίνο (94,95). Επιπλέον, η έκθεση σε διαιθυλοσιλβεστρόλη (DES), έναν συνθετικό οιστρογονικό αγωνιστή, κατά την εγκυμοσύνη, έχει ενοχοποιηθεί για ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις του προστάτη κατά την μετέπειτα ζωή του άρρενος εμβρύου (μεταπλασία, διαταραχές της αρχιτεκτονικής του αδένα) (96,97). Ακόμα και η αυξημένη επίπτωση του καρκίνου του προστάτη στους ΑφροΑμερικανούς συγκριτικά με τους Καυκάσιους έχει γίνει προσπάθεια να εξηγηθεί από το παραπάνω σενάριο, καθώς κάποιες μελέτες έχουν συσχετίσει τον καρκίνο εν μέρει και με την αυξημένη έκθεση σε οιστρογόνα κατά την εγκυμοσύνη σε αυτούς τους πληθυσμούς (98,99) .

Από την άλλη, έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα των κυκλοφορούντων οιστρογόνων παρουσιάζουν σημαντική αύξηση κατά την περίοδο της τρίτης ηλικίας. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την μείωση της παραγωγής της τεστοστερόνης από τους όρχεις, οδηγεί σε μια διαταραχή της σχέσης οιστρογόνων/ανδρογόνων, τέτοια ώστε σε αυτούς τους πληθυσμούς να

μιλάμε για οιστρογονική υπεροχή και ρύθμιση της λειτουργίας και ανάπτυξης του προστάτη αδένου. Έχει προταθεί δε, ότι η αυξημένη διέγερση του προστάτη από τα οιστρογόνα σε άρρενες της τρίτης ηλικίας, μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω ανάπτυξη και κατά συνέπεια, νεοπλασματική εξαλλαγή (100,101).

Πράγματι, η γνώση ότι τα οιστρογόνα ενοχοποιούνται για την αιτιολογία του προστατικού καρκίνου έρχεται από πολλά χρόνια πριν, κυρίως από μελέτες σε πειραματόζωα. Μόλις το 1936 η Dorothy Price έδειξε ότι η χορήγηση οιστρογόνων σε ενήλικους ποντικούς οδήγησε σε υπερπλασία, πλακώδη μεταπλασία και κερατινοποίηση του προστατικού επιθηλίου (102). Η μακροχρόνια χορήγηση μη φαρμακολογικών δόσεων οιστραδιόλης σε ενήλικους αρουραίους οδήγησε σε προστατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (PIN) και καρκίνωμα των περιουρηθρικών αδένων του προστάτη, δίνοντας την αφορμή για την ανάπτυξη του αρχικού μοντέλου της προστατικής καρκινογένεσης μέσω οιστρογονικών μηχανισμών (103). Ιστολογικές ανωμαλίες του φυσιολογικού προστατικού επιθηλίου έχουν επίσης περιγραφεί σε μελέτες σε σκύλους, πίθηκους και ανθρώπους με διαφορετικά αποτελέσματα, ανάλογα με το είδος και τις πειραματικές συνθήκες (104). Επιπλέον, εκτός από τις αλλαγές στο επιθήλιο, αλλαγές παρατηρούνται και στο προστατικό στρώμα και μάλιστα, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι, ενώ στα φυσιολογικά προστατικά κύτταρα, επιθηλιακά και στρώματος, ο λόγος οιστραδιόλης/διυδροτεστοστερόνης αυξάνει μέτρια με την πάροδο του χρόνου, στα υπερπλαστικά κύτταρα (ΚΥΠ) είναι ιδιαίτερα υψηλή, υποδεικνύοντας εμμέσως την συμμετοχή της οιστραδιόλης στην διαδικασία της Καλοήθους Υπερπλασίας του Προστάτη (105).

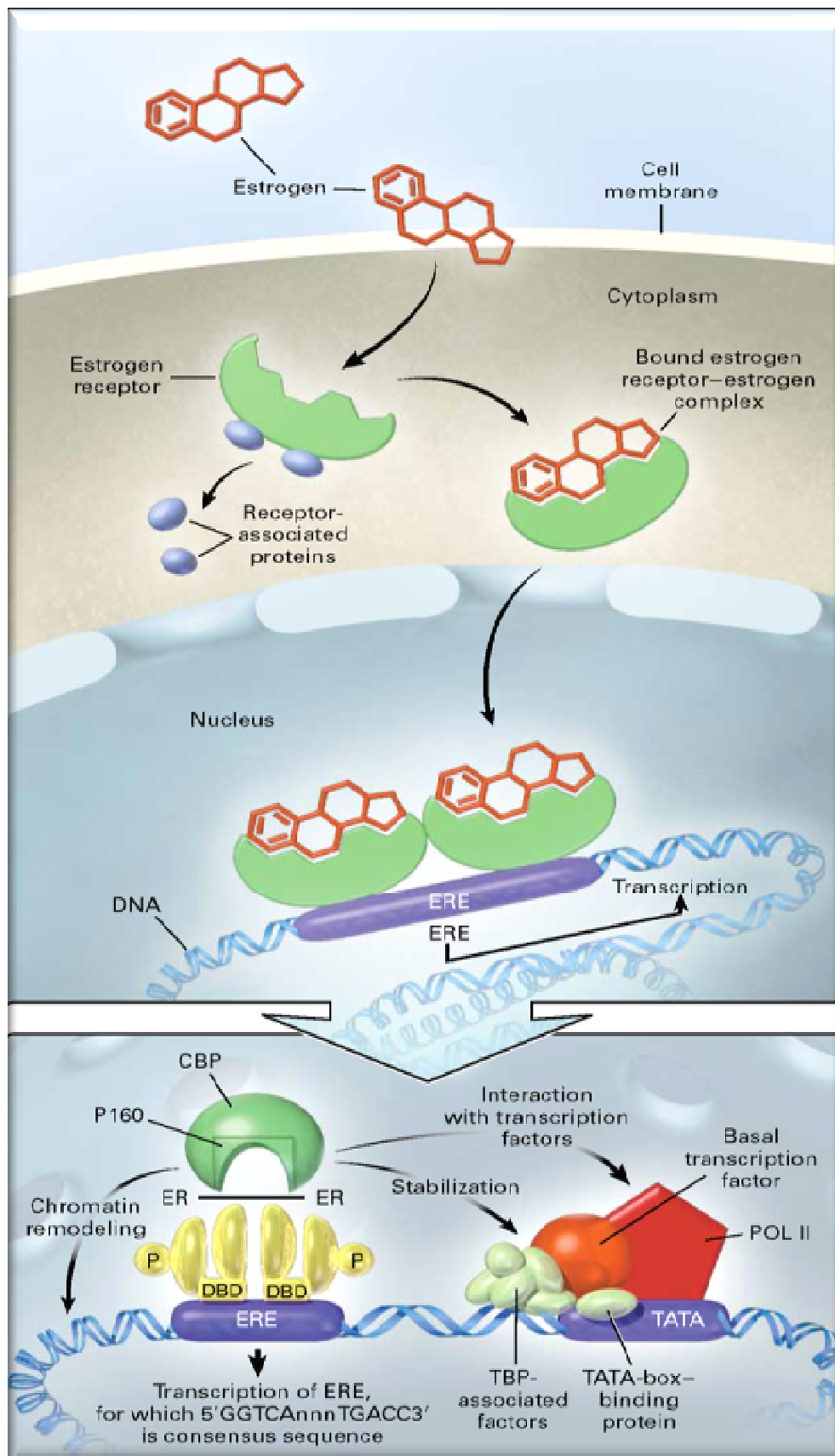
## **ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ**

Ο κύριος μηχανισμός δράσης των οιστρογόνων επιτυγχάνεται μέσω της σύνδεσής τους με ειδικούς πυρηνικούς υποδοχείς, τους οιστρογονικούς υποδοχείς α και β (ERα και ERβ). Πιο συγκεκριμένα, όταν τα οιστρογόνα φτάσουν στο προστατικό κύτταρο-στόχο, εισέρχονται μέσω διάχυσης στο κυτταρόπλασμα, όπου και ενώνονται με την προσδένουσα τα οιστρογόνα περιοχή (ligand binding domain, LBD) του ανενεργού οιστρογονικού υποδοχέα. Από τη στιγμή αυτή και μετά, ο οιστρογονικός υποδοχέας

ενεργοποιείται και μετακινείται προς τον πυρήνα. Εκεί, ενώνεται με το DNA και ξεκινά η διαδικασία της μεταγραφής. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο πολυμεράση II, με τη συμμετοχή διαφόρων πρωτεϊνών, όπως η TATA-box-binding πρωτεΐνη (TBP), η οποία συμπληρώνεται με την προσθήκη επιπλέον μεταγραφικών παραγόντων. Το ενεργό σύμπλοκο του οιστρογονικού υποδοχέα ενώνεται τέλος με τα οιστρογονικά στοιχεία του υποδοχέα (estrogen response elements, ERE) του γονιδιώματος, ξεκινώντας τη διαδικασία της μεταγραφής (εικόνα 8).

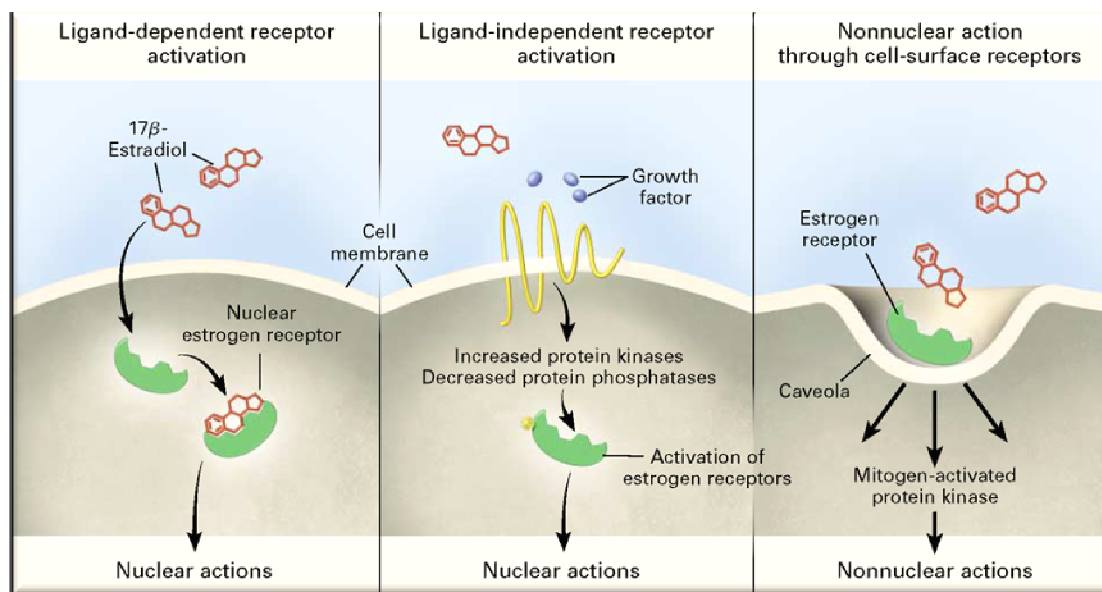
Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι οιστρογονικοί υποδοχείς μπορούν να ενεργοποιηθούν και σε απουσία των οιστρογόνων, μέσω του μηχανισμού του δεύτερου μηνύματος. Σε αυτές τις περιπτώσεις, πολυπεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες παίζουν τον ρόλο των οιστρογόνων, συνδέονται με τον οιστρογονικό υποδοχέα και, ενεργοποιώντας το δρόμο της πρωτεϊνικής κινάσης α, οδηγούν στην επαγόμενη από τον οιστρογονικό υποδοχέα έκφραση της γονιδιακής απάντησης (εικόνα 9).

Εκτός όμως, από την κύρια δράση που ασκούν στο DNA του κυττάρου-στόχου μέσω της σύνδεσης με τους οιστρογονικούς υποδοχείς, τα οιστρογόνα μπορούν να δράσουν ως καρκινογόνες ουσίες μέσω των μεταβολιτών τους. Η οιστραδιόλη και η οιστρόνη μεταβολίζονται σε κατεχολοιστρογόνα (2-υδροξυοιστρογόνα και 4-υδροξυοιστρογόνα), μέσω ειδικών ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (106-109). Τα παράγωγα αυτά, κατόπιν και κάτω από κανονικές συνθήκες, αδρανοποιούνται μέσω ειδικών ενζύμων, με μεθυλίωση, γλυκουρονοποίηση και σουλφοζυλίωση, σε λιγότερο τοξικές ουσίες που αποβάλλονται εύκολα από τη χολή και τα ούρα (110). Εάν για οποιονδήποτε λόγο, η παραπάνω διαδικασία διαταραχτεί, τα κατεχολοιστρογόνα μεταβολίζονται σε ημικινόνες και κινόνες, οι οποίες αποτελούν τους πλέον τοξικούς μεταβολίτες των οιστρογόνων και οι οποίες, είτε αντιδρούν απ' ευθείας με τις βάσεις του DNA σχηματίζοντας σύμπλοκα (adducts), είτε, μέσω οξειδοαναγωγής, παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS), οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές ζημιές σε κυτταρικά μακρομόρια, όπως το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια (εικόνα 11) (111-115). Και στις δύο περιπτώσεις, το τελικό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μεταλλάξεων στο γονιδίωμα του κυττάρου, οι οποίες δυνητικά μπορεί να αποτελέσουν το έναυσμα της καρκινογένεσης (116).

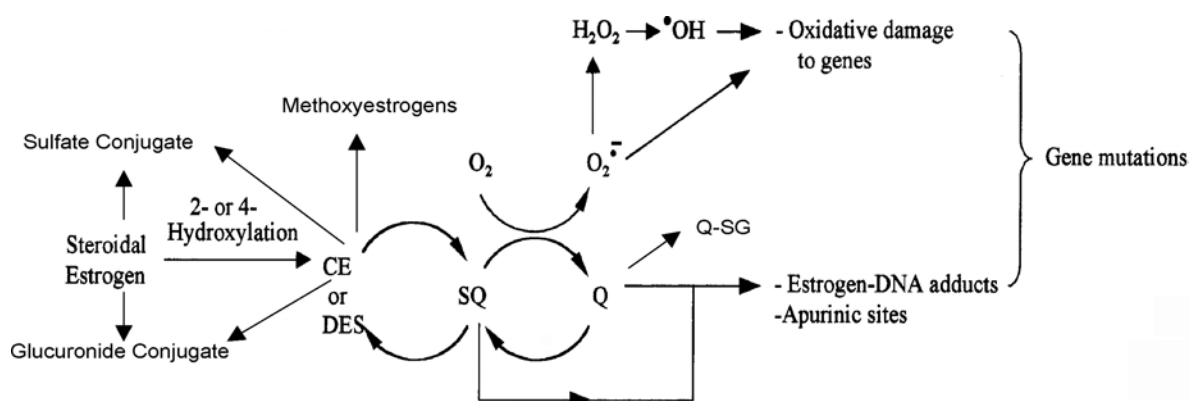


**Εικόνα 8:** Μηχανισμός δράσης των οιστρογόνων μέσω σύνδεσης με τον οιστρογονικό υποδοχέα στο κύτταρο-στόχο





**Εικόνα 9:** Οιστρογονοεξαρτώμενη και μη οιστρογονοεξαρτώμενη ενεργοποίηση του οιστρογονικού υποδοχέα



**Εικόνα 11:** Καταβολισμός οιστρογόνων-οξειδοαναγωγική φάση, δημιουργία ελεύθερων ριζών οξυγόνου και επαγόμενη βλάβη του DNA.

DES: διαίθυλοστυλβεστρόλη, CE: κατεχολοιστρογόνα, SQ: ημικινόνες,

Q: κινόνες, Q-SG: σύμπλοκο κίνησης-γλουταθειόνης

## Οιστρογονικοί υποδοχείς

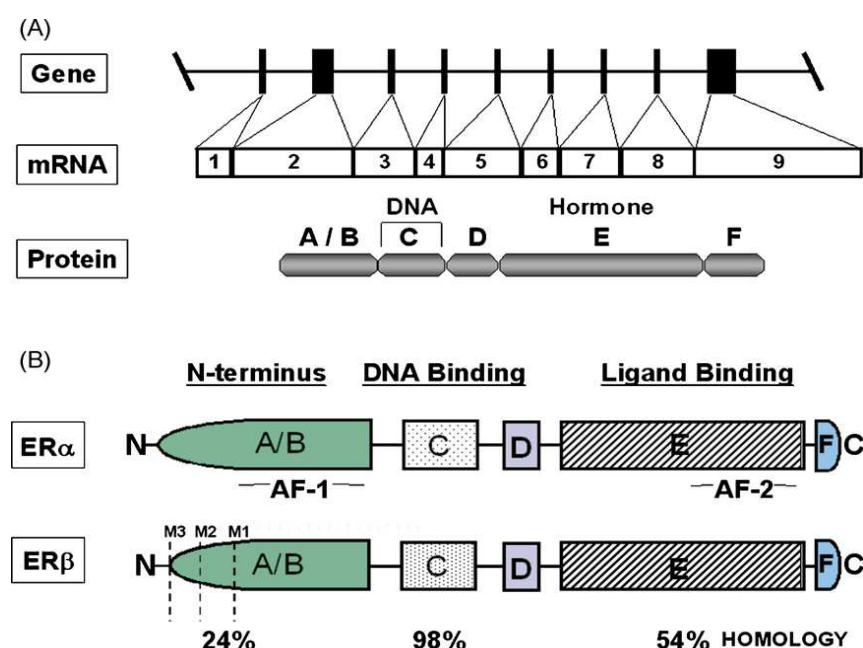
Όπως προαναφέρθηκε, ο κύριος μηχανισμός δράσης των οιστρογόνων στα κύτταρα-στόχους είναι μέσω της σύνδεσής τους με τους οιστρογονικούς υποδοχείς. Αυτοί ανήκουν στην κατηγορία των πυρηνικών μεταγραφικών



παραγόντων και διακρίνονται σε δυο τύπους, τους οιστρογονικούς υποδοχείς α και β (ERα και ERβ). Πρόκειται για δύο στεροειδικούς υποδοχείς με αρκετές ομοιότητες, αλλά και σημαντικές διαφορές, η πρώτη από τις οποίες είναι η κωδικοποίησή τους από διαφορετικά γονίδια-το γονίδιο του ERα βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 6, ενώ το γονίδιο του ERβ στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 14 (117).

Ο οιστρογονικός υποδοχέας ERα ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1985 και από τότε έχει απομονωθεί σε αρκετά είδη, από τα ψάρια μέχρι τον άνθρωπο (118). Το μοριακό βάρος του είναι 66 kDa και το μήκος του είναι 595 αμινοξέα, σε αντίθεση με τον οιστρογονικό υποδοχέα ERβ, ο οποίος ανακαλύφθηκε αρκετά πρόσφατα και είναι λίγο μικρότερος σε μήκος (530 αμινοξέα) και βάρος (60-63 kDa) (119-121). Είναι φανερό λοιπόν, ότι οι δύο οιστρογονικοί υποδοχείς παρουσιάζουν κάποιες διαφορές αρχιτεκτονικές, οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στο N-άκρο του μορίου.

Όσον αφορά τη δομή τους, οι οιστρογονικοί υποδοχείς αποτελούνται από τα τυπικά τμήματα που χαρακτηρίζουν τους στεροειδικούς υποδοχείς, δηλ.: ένα N-τελικό άκρο (A/B περιοχή), την περιοχή πρόσδεσης με το DNA, έναν εύκαμπτο σύνδεσμο (hinge region), την περιοχή σύνδεσης με τον προσδέτη (ligand) και ένα C-τελικό άκρο (εικόνα 12).



**Εικόνα 12:** Δομή του οιστρογονικού υποδοχέα α και β

Οι μεγαλύτερες δομικές διαφορές ανάμεσα στους δύο υποδοχείς εντοπίζονται στην N-τελική περιοχή, οι οποίες εμφανίζουν ομοιότητα μόλις σε ένα ποσοστό 24% (122). Είναι ακριβώς αυτή η περιοχή η οποία και έχει 'ενοχοποιηθεί' για τις λειτουργικές ιδιαιτερότητές τους. Αξίζει να σημειωθεί δε, ότι ο μεταγραφικός παράγοντας AF-1 του οιστρογονικού υποδοχέα β εξαρτάται από τον παράγοντα AF-2 προκειμένου να δράσει, σε αντίθεση με τον παράγοντα AF-1 του οιστρογονικού υποδοχέα α, του οποίου η δράση είναι ανεξάρτητη από τη συμμετοχή του παράγοντα AF-2 και του προσδέτη (123,124). Αυτό εξηγεί και το γεγονός γιατί κάποιοι ανταγωνιστές των οιστρογόνων, όπως η ταμοξιφαίνη, ενώ μπορεί να έχουν κάποια δράση αγωνιστή όταν συνδέονται με τον οιστρογονικό υποδοχέα α, κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει όταν συνδέονται με τον οιστρογονικό υποδοχέα β (125).

Η περιοχή σύνδεσης με το DNA είναι η περιοχή του υποδοχέα που αναγνωρίζει και συνδέεται με τα οιστρογονικά στοιχεία του υποδοχέα των γονιδίων-στόχων (ERE). Πρόκειται για την περιοχή με την μεγαλύτερη ομολογία ανάμεσα στους δύο υποδοχείς (95%), κάτι που εξηγεί και την συγγένειά τους για τα ίδια response elements (ERE) (126).

Η περιοχή σύνδεσης με τον προσδέτη (οιστρογόνα) (ligand binding domain, LBD) αποτελεί μια καλά δομημένη περιοχή του υποδοχέα, η οποία χρησιμεύει για τη σύνδεση του με τα οιστρογόνα και επάγει την οιστρογονοεξαρτώμενη μεταγραφική δραστηριότητα του (117). Στο C-άκρο της παραπάνω περιοχής βρίσκεται η εξαρτώμενη από τα οιστρογόνα λειτουργούσα περιοχή (AF-2), η οποία και συμμετέχει στις δομικές μεταβολές του υποδοχέα μετά την ενεργοποίησή του από τα οιστρογόνα (117). Η LBD των δύο οιστρογονικών υποδοχέων παρουσιάζει παρόμοια χημική συγγένεια για τη σύνδεσή τους με την οιστραδιόλη, την οιστρόνη και την οιστριόλη (127-129). Δεν ισχύει το ίδιο όμως και για τη σύνδεσή τους με άλλα ενδογενή και εξωγενή οιστρογόνα (128,129), όπως για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι ο οιστρογονικός υποδοχέας β παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για τη σύνδεση με ορισμένα φυτοοιστρογόνα σε σχέση με τον οιστρογονικό υποδοχέα α (128).

## ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

- **Οιστρογονικός υποδοχέας α**

Ο οιστρογονικός υποδοχέας α εντοπίζεται κυρίως στο στρώμα του προστάτη αδένου στον άνθρωπο, στον σκύλο, στη μαϊμού και στους αρουραίους (130-134). Ανοσοϊστοπαθολογικές μελέτες ωστόσο, έχουν αποδείξει ότι η έκφραση του υποδοχέα α στα κύτταρα του στρώματος είναι ετερογενής, δηλ., μόνο ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων φέρουν τον υποδοχέα, ενώ στα περισσότερα δεν εκφράζεται καθόλου. Μελέτες σε αρουραίους έχουν δείξει ότι το mRNA του ERα εκφράζεται σε ένα μεγάλο ποσοστό στα κύτταρα του στρώματος του προστάτη αδένου κατά την περιγεννητική περίοδο, με το ποσοστό αυτό να μειώνεται από εκεί και μετά, αποδίδοντας στον ERα έναν ιδιαίτερο ρόλο στην ανάπτυξη του αδένου (135,136). Η έκφραση του ERα στον άνθρωπο έχει πιστοποιηθεί κατά την ενδομήτρια ανάπτυξη στα κύτταρα του στρώματος του προστάτη (137). Ωστόσο, ενώ μια μελέτη έδειξε την παρουσία του υποδοχέα μόνο στο στρώμα, οι Shapiro et al. σε μια νεότερη μελέτη ανέδειξαν την παρουσία του τόσο στο στρώμα, όσο και στο προστατικό περιουρηθρικό επιθήλιο κατά τη διάρκεια των τελευταίων μηνών της κύησης (137). Οι συγγραφείς καταλήγουν δε ότι η πλακώδης μεταπλασία του αδένου που παρατηρείται κατά το τελευταίο τρίμηνο της εγκυμοσύνης έχει άμεση συσχέτιση με την έκφραση του ERα στο επιθήλιο των περιουρηθρικών αδένων, καθώς και στα βασικά κύτταρα του προστατικού επιθηλίου.

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων του στρώματος, μια από τις κύριες δράσεις των οιστρογόνων, φαίνεται ότι επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης του ERα που εντοπίζεται στο στρώμα του αδένου. Στον άνθρωπο, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις μάλιστα, για την αυξημένη παρουσία οιστραδιόλης στον πυρήνα των κυττάρων του στρώματος, αλλά και του ERα σε δείγματα με καλοήγη υπερπλασία του προστάτη (ΚΥΠ), ενοχοποιώντας τον ERα για την αιτιολογία της νόσου (138). Λαμβάνοντας υπόψη μάλιστα το γεγονός ότι ο ERα εκφράζεται στο στρώμα και στα επιθηλιακά κύτταρα των προστατικών περιουρηθρικών αδένων, τόσο των φυσιολογικών κυττάρων, όσο και των κυττάρων με καλοήγη υπερπλασία (130), είναι πιθανό το ενδεχόμενο ο ERα της περιοχής αυτής να συμμετέχει

ενεργά στην έναρξη της νόσου. Πράγματι, πειραματικές μελέτες σε ποντίκια με έλλειψη του υποδοχέα (αERKO) έδειξε ότι η οιστρογονοεξαρτώμενη πλακώδης μεταπλασία του προστατικού επιθηλίου πραγματοποιείται μέσω του οιστρογονικού υποδοχέα α (139). Ομοίως, μελέτες σε ποντίκια με την έλλειψη είτε του υποδοχέα α, είτε του υποδοχέα β (αERKO, βERKO), έδειξε ότι η υπερπλασία του στρώματος, οι επιθηλιακές προκαρκινωματώδεις (PIN) βλάβες και η φλεγμονή του αδένα, πραγματοποιούνται μέσω της ενεργοποίησης του ERα (140).

Όσον αφορά τον προστατικό καρκίνο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα α, μέσω μεθυλίωσης, οδηγείται σε αποσιώπηση και απώλεια της μεταγραφικής του ικανότητας σε αρχικά στάδια και ακολούθως σε επανεμφάνισή της σε ορμονοανθεκτικούς και μεταστατικούς καρκίνους (141-145). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός δε, ότι οι παραπάνω μεταβολές στο γονίδιο του ERα φαίνεται να αυξάνονται όσο προχωρά η νόσος από καλοήγη υπερπλασία σε χαμηλού και υψηλού βαθμού διαφοροποίησης προστατικό καρκίνο.

- **Οιστρογονικός υποδοχέας β**

Παρά το γεγονός ότι ο οιστρογονικός υποδοχέας β εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό από τον ERα στον προστάτη αδένα, ο ακριβής ρόλος του δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Εκτός από τη δράση του στην διαφοροποίηση του προστατικού επιθηλίου, είναι πιθανή η αντιπολλαπλασιαστική του δράση και η συμμετοχή του ως ανασταλτικού παράγοντα στη δράση των ανδρογόνων στην ανάπτυξη του αδένα (146). Έμμεση απόδειξη αποτελεί το υπερπλαστικό και δυσπλαστικό επιθήλιο των ενηλίκων που είχαν εκτεθεί σε οιστρογόνα κατά την ενδομήτρια ζωή και τα οποία παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση του ERβ (147). Από την άλλη, μελέτες που έχουν γίνει σε ποντίκια που παρουσιάζουν έλλειψη του ERβ (βERKO) συγκλίνουν σε διαφορετικά αποτελέσματα. Έτσι, ενώ ορισμένες μελέτες σε βERKO ποντίκια δείχνουν σημαντική υπερπλασία του προστάτη (148), σε άλλες φαίνεται να μην ισχύει κάτι τέτοιο (140,149,150). Παρόλα αυτά, μελέτες που έχουν γίνει σε ποντίκια που δεν εκφράζουν το ένζυμο της αρωματάσης (ArKO) απέδειξαν την αντιπολλαπλασιαστική δράση του ERβ: το προστατικό επιθήλιο γίνεται υπερπλαστικό με την πάροδο του χρόνου,

πιθανά λόγω ορμονικής ανισορροπίας. Όταν, με γενετικό ανασυνδυασμό εκφράστηκε στα ποντίκια αυτά ο ERβ, το υπερπλαστικό προστατικό επιθήλιο επανήλθε στη φυσιολογική του δομή (151).

Ένας επιπλέον ρόλος που έχει αποδοθεί στον ERβ είναι η ανοσοτροποποιητική του δράση πάνω στο προστατικό επιθήλιο. 18 βΕRΚΟ και 18 φυσιολογικά (wild type) ποντίκια χωρισμένα σε δύο ομάδες, αφού εκτράφηκαν για ένα χρόνο, εξετάστηκαν ιστοπαθολογικά (102). Και οι δύο ομάδες παρουσίασαν παρόμοιες μεταβολές λόγω της παρόδου του χρόνου, δηλ, ελάττωση των εκκρίσεων, επιπέδωση του επιθηλίου και απόπτωση των κυττάρων στον αυλό των προστατικών αδενίων. Ο βαθμός του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των κυττάρων δεν διέφερε ανάμεσα στις δύο ομάδες. Αντίθετα, εκεί που οι δύο ομάδες διέφεραν σημαντικά ήταν στην παρουσία συσσωματωμάτων Τ-λεμφοκυττάρων, όπου στα βΕRΚΟ παρατηρήθηκε διήθηση Τ-λεμφοκυττάρων σε ποσοστό 89% και μάλιστα σε ποσοστό 44% σε μεγάλες αθροίσεις, ενώ στα φυσιολογικά ποντίκια το ποσοστό ήταν πολύ μικρότερο-μόλις στο 50% παρατηρήθηκαν μικρές ποσότητες Τ-λεμφοκυττάρων. Το παραπάνω γεγονός οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο ERβ πιθανά έχει κάποιον ανοσοπροστατευτικό ρόλο στον προστάτη, ίσως με το να μειώνει την καταστροφή του προστατικού ιστού ή με το να τροποποιεί την ανοσοβιολογική απάντηση του αδένα σε εξωτερικά ερεθίσματα. Επιπλέον, είναι πολύ πιθανό ότι η αποδεδειγμένη αντιφλεγμονώδη δράση των οιστρογόνων στον προστάτη να επιτυγχάνεται μέσω του ERβ (152,153). Σ'αυτό συνηγορεί και το αποτέλεσμα μιας μελέτης σε αρουραίους, στην οποία η χορήγηση ειδικών ERβ αγωνιστών είχε σαν αποτέλεσμα την αποτροπή της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (154). Όπως γίνεται κατανοητό, μια τέτοια δράση του ERβ είναι πολύ σημαντική για τη θεραπεία της προστατίτιδας, η οποία αποτελεί τη πιο συχνή πάθηση του προστάτη. Επίσης, από τη στιγμή που ολοένα και περισσότερο πιθανολογείται η σχέση της χρόνιας προστατίτιδας με τον καρκίνο του προστάτη (155), η αντιφλεγμονώδη δράση του ERβ ίσως να παίζει προστατευτικό ρόλο στην παθογένεια του καρκίνου του προστάτη.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η άποψη ότι ο ERβ έχει επίσης αντιοξειδωτική δράση. Ο ERβ συνδέεται με τα αντιοξειδωτικά/ηλεκτρόφιλα στοιχεία (electrophile/anti-oxidant response element, EpRE) του

γονιδιώματος και μάλιστα παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια σε σχέση με τον ERα (156). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ο ERβ να επάγει τη δράση γονιδίων που κωδικοποιούν χημειοπροστατευτικά αντιοξειδωτικά ένζυμα, τα οποία πιθανά να προστατεύουν τα προστατικά επιθηλιακά κύτταρα από βλαβερούς τοξικούς παράγοντες. Έχει αποδειχθεί μάλιστα ότι ένα από αυτά, η γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση (GST), παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην προφύλαξη από τον καρκίνο του προστάτη, αφού προστατεύει από την καταστροφή του γονιδιώματος που ξεκινά από τη δράση των φλεγμονωδών κυττάρων και των καρκινογόνων (157).

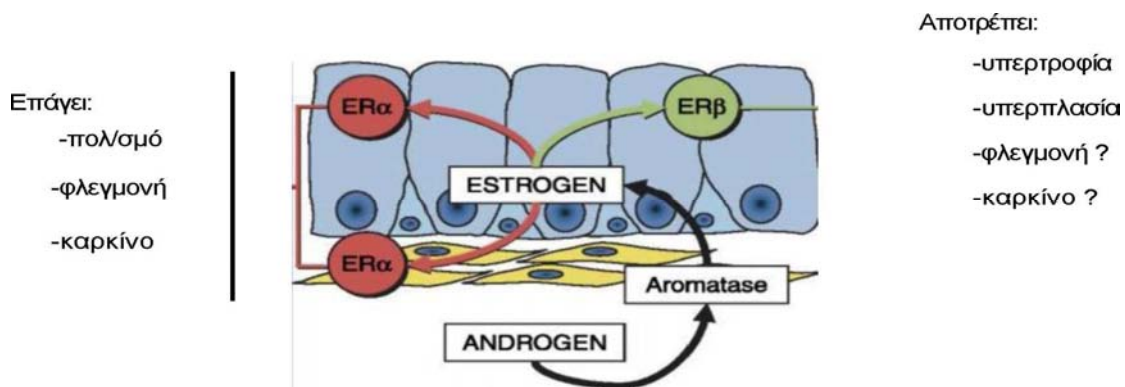
Όσον αφορά τον ρόλο του ERβ στον προστατικό καρκίνο, δυναμικές αλλαγές στην έκφρασή του κατά τη πρόοδο της νόσου συνηγορούν στην άποψη ότι η δράση των οιστρογόνων μέσω του ERβ πιθανά να παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη και στην εξέλιξη του προστατικού καρκίνου. Οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν στο ότι η έκφραση του ERβ μειώνεται στον κλινικά εντοπισμένο καρκίνο του προστάτη, με ρυθμό που αυξάνεται από τις PIN στις χαμηλού και υψηλού Gleason score βλάβες (144,158-160). Αυτή η μειωμένη έκφραση του ERβ οφείλεται σε προοδευτική υπερμεθυλίωση των CpG νησιδίων που βρίσκονται στον υποκινητή (promoter) του γονιδίου του ERβ και έχει σαν αποτέλεσμα την αποσιώπηση της μεταγραφικής του ικανότητας (161,162). Τελικά, η απώλεια της έκφρασης του ERβ έχει σαν αποτέλεσμα την αδυναμία ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των προστατικών κυττάρων. Υποστηρίζοντας την άποψη ότι ο ERβ πιθανά δρα ογκοκατασταλτικά, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η έκφραση του ERβ στα καρκινικά προστατικά κύτταρα ανέστειλε την ανάπτυξη και τη διήθηση του όγκου, συμπεραίνοντας ότι η απώλεια της έκφρασης του ERβ σε υψηλής διαφοροποίησης όγκους πιθανά επιτρέπει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη δημιουργία μεταστάσεων (163).

Από την άλλη, διάφορες μελέτες έρχονται να δείξουν ότι ο ERβ επανεμφανίζεται όταν η νόσος προχωρεί και δίνει απομακρυσμένες μεταστάσεις, με το 100% των οστικών και μη οστικών μεταστατικών κυττάρων να εκφράζουν τον υποδοχέα σε διάφορους βαθμούς (164-166). Πώς όμως, και ενώ είναι αποδεκτό ότι ο ERβ έχει αντιμιτωτική δράση στο προστατικό επιθήλιο, εντούτοις η παρουσία του σε αυξημένο ποσοστό στις μεταστατικές εστίες δεν εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και

κατ'επέκταση την εξάπλωση των μεταστάσεων? Πράγματι, αναλύσεις του υποκινητή του ERβ αναδεικνύουν πλήρη υπομεθυλίωση και των τριών CpG νησιδίων του στα μεταστατικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την υπερέκφραση του ERβ στα κύτταρα αυτά. Από τη στιγμή μάλιστα που οι Horvath et al, έδειξαν ότι εντοπισμένοι προστατικοί καρκίνοι που διατηρούσαν κάποια έκφραση του ERβ από την έναρξη της νόσου έχουν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής (160), είναι πιθανό ότι η έκφραση του ERβ στα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα να αποτελεί σημείο υπεροχής των όγκων, στους οποίους η παρουσία του ERβ παραμένει, όσον αφορά την ικανότητά τους να μεθίστανται. Παρ'όλα αυτά, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ο ERβ μπορεί να εμποδίσει την μετανάστευση και τη διήθηση των προστατικών καρκινικών κυττάρων (163,167), κάνοντας την δράση του ERβ ακόμα περισσότερο πολύπλοκη. Το ερώτημα αν ο ERβ έχει καθαρή αντιμιτωτική δράση ή επάγει την ανάπτυξη της νόσου και τη δημιουργία απομακρυσμένων μεταστάσεων παραμένει. Το μόνο σίγουρο είναι η αυξημένη έκφραση του ERβ σε μεταστατικούς, ορμονοανθεκτικούς προστατικούς καρκίνους, γεγονός που θέτει νέους στόχους όσον αφορά τη θεραπευτική προσέγγιση με αντιοιστρογονικούς παράγοντες ή πιο αποτελεσματικούς εκλεκτικούς ERβ ανταγωνιστές.

- **Συμπέρασμα**

Είναι πλέον αποδεκτό ότι τα οιστρογόνα παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του καρκίνου του προστάτη. Ο κύριος μηχανισμός δράσης τους είναι μέσω των δύο κύριων οιστρογονικών υποδοχέων, ERα και ERβ. Η δράση τους είναι ανταγωνιστική και έτσι, ενώ ο ERα επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την φλεγμονή και κατά συνέπεια τον καρκίνο, ο ERβ φαίνεται να έχει προστατευτική δράση, αφού η δράση του είναι αντιμιτωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική (εικόνα 13).



**Εικόνα 13:** σχηματική απεικόνιση της δράσης των οιστρογονικών υποδοχέων στον προστάτη αδένα

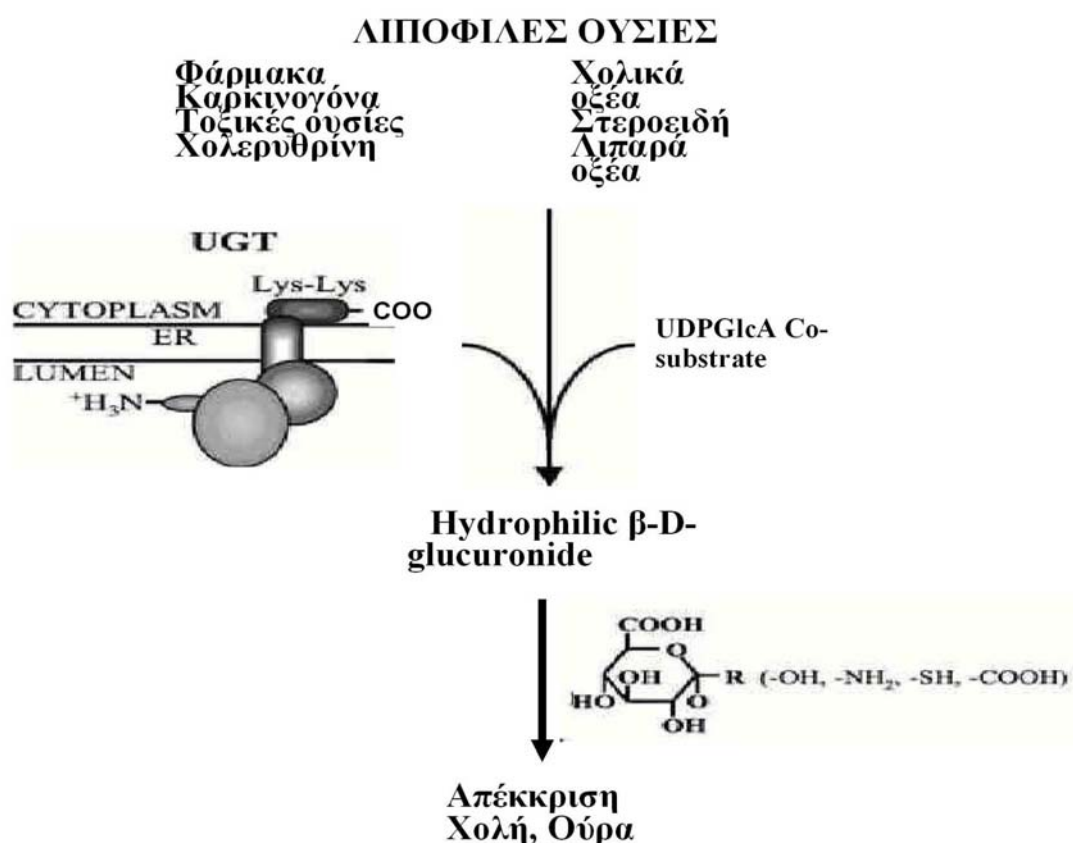
### ΟΥΡΙΔΙΝΟ-ΔΙΦΩΣΦΟ-ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΟΣΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ 1A1(UGT1A1) ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

Η γλυκουρονοποίηση αποτελεί μια εξαιρετικά σημαντική μεταβολική διαδικασία, κατά την οποία ενδογενή και εξωγενή συστατικά μετατρέπονται σε πιο υδρόφιλα σύμπλοκα που μπορούν ευκολότερα να αποβληθούν από τα ούρα και τη χολή (168). Πρόκειται για την σύζευξη του UDP-γλυκουρονικού οξέος με διάφορα υποστρώματα, ανάμεσα στα οποία συγκαταλέγονται και τα στεροειδή (Εικόνα 14). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από μια κατηγορία ενζύμων που ονομάζεται ουριδινό-διφωσφο-γλυκουρονοσυλοτρανσφεράσες (UGTs) και εντοπίζονται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου και στον πυρήνα των κυττάρων του ήπατος και άλλων οργάνων (169). Μέχρι σήμερα, περισσότερες από 40 ισομορφές UGTs έχουν περιγραφεί στα θηλαστικά, οι οποίες κατατάσσονται σε 2 κυρίως οικογένειες, την UGT1 και UGT2 (169,170). Κάθε μία από τις ομάδες έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, κυρίως στον τρόπο με τον οποίο ασκούν τη δράση τους.

Στον άνθρωπο, το γονίδιο της UGT1A οικογένειας εντοπίζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 2 (2q37) και περιέχει τουλάχιστον 16 εξώνια, συνολικού μήκους 500 kb. Έχει βρεθεί ότι κωδικοποιεί έως και 12 διαφορετικά ισοένζυμα, ο κύριος ρόλος των οποίων είναι η αδρανοποίηση ενδογενών και εξωγενών ουσιών, όπως η χολερυθρίνη, ξеноβιοτικές ουσίες και τα C18 στεροειδή (οιστρογόνα) (171). Η φυσική σημασία των UGT1A ενζύμων αποδεικνύεται από το γεγονός ότι αλλαγές στο γονίδιο που τα κωδικοποιεί



μπορεί να οδηγήσουν σε διάφορες παθήσεις που συνδυάζονται με υπερχολερυθριναιμία, όπως το σύνδρομο Gilbert και το σύνδρομο Crigler-Najjar, τύπου I και τύπου II (172). Αυτές οι αλλαγές καταδεικνύουν ότι η μειωμένη δραστηριότητα των παραπάνω ενζύμων μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη συσσώρευση των ουσιών που μεταβολίζουν σε τοξικά επίπεδα, με σημαντικές επιπτώσεις για τον οργανισμό.



**Εικόνα 14:** Ο μηχανισμός της γλυκουρονοποίησης: η αντίδραση περιλαμβάνει τη μεταφορά του υποστρώματος ουριδινοδιφωσφογλυκουρονικού οξέος (UDPGlcUA) σε υδρόφοβα μακρομόρια (αγλυκόνες) και το σχηματισμό β-D-γλυκοπυρανοσιδουρονικού οξέος ή γλυκουρονιδιομένων παραγώγων (-G). Η γλυκουρονοποίηση έχει σαν τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητας υδρόφοβων κατά τα άλλα μορίων και τη διευκόλυνση της αποβολής τους από τα ούρα και τη χολή.

Το γονίδιο της UGT2 οικογένειας, από την άλλη, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 4 και αποτελείται από 6 εξώνια (173). Με εξαίρεση τα 2 μέλη της UGT2A οικογένειας (UGT2A1 και UGT2A2) που εντοπίζονται αποκλειστικά στον οσφρητικό βλεννογόνο, τα περισσότερα ένζυμα της UGT2B οικογένειας συντίθενται σε διάφορους ιστούς σε όλο το σώμα. Στον άνθρωπο, 7 λειτουργικές ισομορφές έχουν περιγραφεί, οι UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17 και UGT2B28 (174). Το UGT2B4 ένζυμο κυρίως μεταβολίζει τα χολικά και λιπαρά οξέα, ενώ τα UGT2B10 και UGT2B11 μεταβολίζουν λιπαρά οξέα, κυρίως τα εικοσανοειδή (175). Το UGT2B28 εντοπίζεται μόνο στο ήπαρ και στον μαστό και μεταβολίζει την οιστραδιόλη και την 3α-DIOL, ενώ τα UGT2B7, UGT2B15 και UGT2B17 ισοένζυμα αποτελούν τα κύρια ένζυμα γλυκουρονίδιασης των ανδρογόνων (C19 στεροειδή) (174).

Είναι γενικώς αποδεκτό ότι το ήπαρ αποτελεί το κύριο όργανο γλυκουρονοποίησης στον οργανισμό, χωρίς αυτό να αποκλείει και άλλα όργανα-στόχους (176). Έτσι, έχει αποδειχτεί ότι γλυκουρονοποίηση μπορεί να επιτευχθεί στους νεφρούς, στους πνεύμονες, στο έντερο, στο δέρμα, στον εγκέφαλο, στον λιπώδη ιστό, στον θύμο αδέν, στον μαστό και στον προστάτη (177). Ειδικότερα στον προστάτη, υπάρχουν μελέτες με θετική συσχέτιση των πολυμορφισμών στα UGT2B15 και UGT2B17 γονίδια και του καρκίνου (178,179). Απόλυτα λογικό, αν αναλογιστεί κανείς ότι τα ένζυμα της οικογένειας UGT2B παρεμβάλλονται στον μεταβολισμό των ανδρογόνων και κυρίως στον μεταβολισμό της DHT (εικόνα 15).

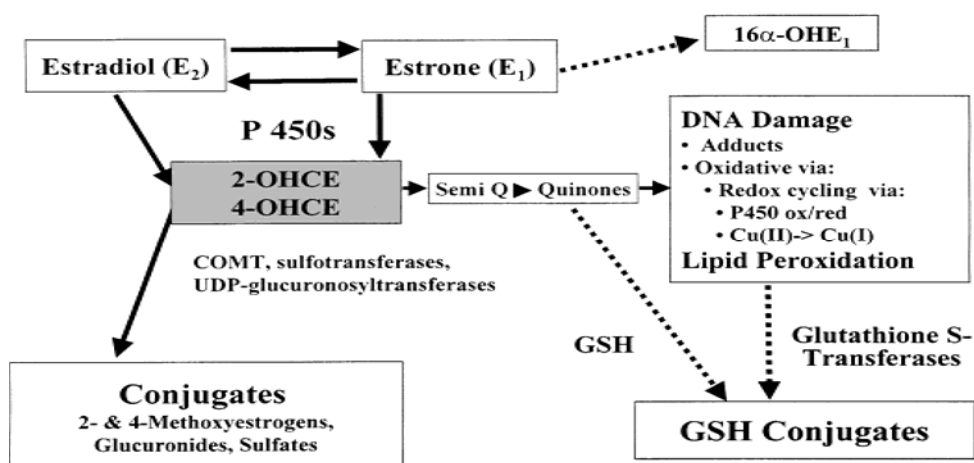
Από την άλλη, ενώ ο ρόλος των οιστρογόνων στην προστατική καρκινογένεση γίνεται ολοένα πιο κατανοητός και αποδεκτός, η συσχέτιση των UGT και ειδικότερα του UGT1A1, που ενέχονται στον μεταβολισμό των οιστρογόνων (UGT1A) με τον καρκίνο του προστάτη δεν είναι πλήρως μελετημένη.

Το UGT1A1 αποτελεί από τη μία τον κύριο εκφραστή της γλυκουρονοποίησης της χολερυθρίνης, ενός παραγώγου της αίμης που πρέπει να απομακρύνεται από τον οργανισμό και από την άλλη, έναν από τους κύριους παράγοντες σύζευξης και αδρανοποίησης των κατεχολοιστρογόνων (εικόνα 16). Ιστορικά, γενετικές αλλαγές στο γονίδιο του UGT1A και κυρίως αυτές που επηρεάζουν την έκφραση του UGT1A1

ενζύμου, έχει συσχετιστεί με την παρουσία δύο παθήσεων που συνδυάζονται με υπερχολερυθριναιμία, όπως το σύνδρομο Gilbert και το σύνδρομο Crigler-Najjar, τύπου I και τύπου II. Χαρακτηριστικό γνώρισμα στην αιτιοπαθογένεια των παραπάνω νόσων είναι πολυμορφισμοί στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου και πιο συγκεκριμένα στο TATA κουτί, όπου ανάλογα με τον αριθμό των δινουκλεοτιδικών επαναλήψεων TA εκφράζονται 4 αλληλίες (n=5, UGT1A1\*33 - n=6, UGT1A1\*1 - n=7, UGT1A1\*28 - n=8, UGT1A1\*34). Μελέτες λειτουργικότητας έδειξαν ότι η αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων στον υποκινητή του UGT1A1 γονιδίου οδηγεί στην μείωση της μεταγραφικής ικανότητας του γονιδίου (180-182). Ο 'άγριος' τύπος UGT1A1\*1 περιέχει 6 επαναλήψεις, ενώ η πιο συχνή παραλλαγή (UGT1A1\*28) περιέχει 7 επαναλήψεις και ανευρίσκεται σε ποσοστό 0-3% στους Ασιάτες, 2-13% στους Καυκάσιους και φτάνει σε ένα ποσοστό της τάξης του 16-19% στους ΑφροΑμερικανούς (183-187). Η παρουσία του παραπάνω αλληλομόρφου σχετίζεται με το σύνδρομο Gilbert, μια αρκετά συχνή πάθηση (6-12% του γενικού πληθυσμού), που εκδηλώνεται με απουσία ηπατικής νόσου και την παρουσία διαλειπόντων επεισοδίων ικτέρου (188,189). Για τη νόσο ευθύνονται αλλαγές στο γονίδιο UGT1A1 και πιο συγκεκριμένα, ως κύρια αιτία της ενοχοποιείται η ομοζυγωτία για το αλληλίο UGT1A1\*28 (190).

Ο συσχετισμός του UGT1A1 ενζύμου με τον καρκίνο του προστάτη έχει να κάνει με τον ρόλο που παίζουν τα οιστρογόνα στον μηχανισμό της καρκινογένεσης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα οιστρογόνα μέσω των τοξικών μεταβολιτών τους μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία μεταλλάξεων χωρίς την εμπλοκή των οιστρογονικών υποδοχέων και να ενεργοποιήσουν τις διαδικασίες της καρκινογένεσης. Έτσι, η Τεστοστερόνη μέσω της αρωματάσης μπορεί να μεταβολιστεί σε Οιστραδιόλη, η οποία με τη σειρά της, μέσω ενζύμων του κυτοχρώματος P 450, μπορεί να μεταβολιστεί σε κατεχολοιστρογόνα. Αν τα κατεχολοιστρογόνα δεν αδρανοποιηθούν και δεν απομακρυνθούν από τον οργανισμό, μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία μεγάλων ποσοτήτων ελεύθερων ριζών οξυγόνου, οι οποίες με τη σειρά τους μπορεί να οδηγήσουν στην καταστροφή του DNA. Ένας από τους μηχανισμούς αδρανοποίησης των κατεχολοιστρογόνων αποτελεί και η γλυκουρονοποίηση, με τα ένζυμα της UGT1A οικογενείας, και κυρίως το UGT1A1, να αποτελούν τον κύριο εκφραστή της (εικόνα 17)





**Εικόνα 17:** Οξειδωτικός μεταβολισμός των οιστρογόνων. 2-OHCE και 4-OHCE, 2-υδρόξυ και 4-υδρόξυ κατεχολοιστρογόνα, COMT, κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράση, GSH, γλουταθειόνη, UGT, ουριδινο-διφωσφο-γλυκουρονοσυλοτρανσφεράση

## ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Οι γενετικές παραλλαγές στην αλληλουχία του DNA μπορούν να πάρουν διάφορες μορφές: αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου, εισαγωγή ή αποκοπή ενός ή πολλαπλών νουκλεοτιδίων, αλλαγές στον αριθμό επαναλαμβανόμενων ακολουθιών και μεγαλύτερες αλλαγές στην δομή των χρωμοσωμάτων. Ανάλογα με τη συχνότητα εμφάνισης και την νοσογόνο ικανότητά τους, αυτές οι παραλλαγές αποτελούν είτε πολυμορφισμούς (με συχνότητα εμφάνισης >1% στον γενικό πληθυσμό), είτε μεταλλάξεις (με συχνότητα εμφάνισης <1% στον γενικό πληθυσμό και υψηλή νοσογόνο ικανότητα). Αξίζει να σημειωθεί ότι όλες οι μεταλλάξεις δεν οδηγούν σε νόσο, όπως και ότι υπάρχουν πολυμορφισμοί που εμπλέκονται ενεργά στην αιτιοπαθογένεια συγκεκριμένων παθήσεων.

Οι πολυμορφισμοί παρουσιάζονται με τρεις κυρίως μορφές: είτε ως αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου από κάποιο άλλο στην γονιδιακή αλληλουχία (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), είτε ως εισαγωγή ή αποκοπή κάποιου νουκλεοτιδίου, είτε, τέλος, ως διαταραχή στον αριθμό επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων (Short Tandem Repeat Polymorphisms, STRP) (191-194). Μπορούν να εμφανιστούν σε όλες τις περιοχές του ανθρώπινου γονιδιώματος, όπως σε περιοχές κωδικοποίησης πρωτεϊνών, σε

ρυθμιστικές περιοχές της γονιδιακής έκφρασης και σε ιντρόνια (introns), δηλαδή περιοχές που χωρίζουν τις κωδικοποιούσες περιοχές ή τα εξώνια (exons) ενός γονιδίου. Η πλειοψηφία τους έχουν ουδέτερη δράση, δεν επηρεάζουν τη δομή ή τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης και αποτελούν απλά κομμάτι της εξελικτικής διαδικασίας (195). Παρόλα αυτά, υπάρχουν κάποιοι πολυμορφισμοί που λόγω θέσης μπορούν να μεταβάλουν τον γενετικό κώδικα. Αυτοί οι πολυμορφισμοί δρουν μέσω αλλαγής της μεταγραφικής ικανότητας του γονιδίου (εντοπίζονται στον υποκινητή και σε άλλες ρυθμιστικές περιοχές), της σταθερότητας του mRNA (εντοπίζονται στο 3'-άκρο), της ένωσης των τμημάτων του RNA (εντοπίζονται στην περιοχή σύνδεσης των εξωνίων με τα ιντρόνια) και τέλος, μέσω της αλλαγής της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών (εντοπίζονται στα εξώνια). Αυτές οι αλλαγές μπορεί να αποδειχτούν σημαντικές, όσον αφορά την αυξημένη ή μειωμένη νοσηρότητα, τη σοβαρότητα της νόσου, την ανταπόκριση στη θεραπεία και τις παρενέργειες από αυτή (194,196).

## **ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ**

### **Ανδρογονικός υποδοχέας**

Η μεταγραφική περιοχή του ανδρογονικού υποδοχέα περιέχει μια έντονα πολυμορφική τρινουκλεοτιδική περιοχή (CAGn), το μήκος της οποίας έχει συσχετιστεί με τον κίνδυνο για την ανάπτυξη διαφόρων παθήσεων, ανάμεσα στις οποίες και του προστατικού καρκίνου. Λαμβάνοντας υπ'όψιν μελέτες που έχουν δείξει ότι ο αριθμός των επαναλήψεων κυμαίνεται από 11 έως 31 σε υγιείς άνδρες (197), οι Giovannucci et al. έδειξαν ότι άνδρες με  $\leq 19$  επαναλήψεις είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν καλοήγη υπερπλασία του προστάτη, συγκριτικά με αυτούς που είχαν  $\geq 25$  επαναλήψεις (198). Οι Tut et al. έδειξαν ότι όσοι άνδρες είχαν  $\geq 28$  επαναλήψεις παρουσίασαν τετραπλάσιο κίνδυνο για ελαττωματική σπερματογένεση (199). Επιπλέον, ασθενείς με τη σπάνια νόσο του Kennedy (Μυική Δυστροφία Νωτιαίου και Προμήκη Μυελού) παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό CAG επαναλήψεων (40-52) (200). Στη συγκεκριμένη νόσο η πρόωμη έναρξη, η σοβαρότητα της μυικής ατροφίας, ο βαθμός της αντοχής στα ανδρογόνα και τα μειωμένα επίπεδα του ανδρογονικού υποδοχέα φαίνεται ότι σχετίζονται με περισσότερες τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις CAG.

Ο αριθμός των CAG επαναλήψεων έχει συνδεθεί με τον καρκίνο του προστάτη σε αρκετές μελέτες, με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Μεγάλες πληθυσμιακές μελέτες έχουν δείξει ότι, συγκριτικά με άλλες φυλετικές ομάδες, οι Αφρο-Αμερικανοί έχουν υψηλότερη επίπτωση προστατικού καρκίνου, μικρότερη ηλικία και συχνότερα, αρκετά προχωρημένο στάδιο κατά την αρχική διάγνωση (201-203). Κατά μέσο όρο, οι Αφρο-Αμερικανοί έχουν 18 επαναλήψεις, οι Καυκάσιοι 21 και οι Ασιάτες 22, αντίστοιχα (204). Αυτή η παρατήρηση, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ του αριθμού των CAG επαναλήψεων και της μεταγραφικής λειτουργίας του ανδρογονικού υποδοχέα, τέτοια ώστε όσο μικρότερες οι επαναλήψεις, τόσο καλύτερη η μεταγραφική δραστηριότητα (205), οδήγησαν τους Coetzee και Ross στην υπόθεση ότι οι φυλετικές διαφορές στον καρκίνο του προστάτη πιθανά να οφείλονται και στην ποικιλία του αριθμού των CAG επαναλήψεων στον ανδρογονικό υποδοχέα (204).

Από τότε, διάφορες μελέτες έχουν δημοσιευτεί που ασχολούνται με την πιθανή σχέση του αριθμού των CAG επαναλήψεων και διάφορων κλινικών και επιδημιολογικών παραμέτρων του καρκίνου του προστάτη (πίνακας 1). Έτσι, λιγότερες επαναλήψεις (<17 ή <23, ανάλογα με τη μελέτη) έχουν συσχετιστεί με μικρότερη ηλικία διάγνωσης (206,207), αυξημένο συνολικό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου (208,209), εξωπροστατική επέκταση του όγκου (208-210) και θετικούς λεμφαδένες κατά τη διάγνωση (210). Αντίθετα, αρκετές μελέτες έρχονται να δείξουν ότι δεν υπάρχει κάποιος συσχετισμός μεταξύ των μικρού αριθμού επαναλήψεων και του κινδύνου για καρκίνο του προστάτη (211-213), της ηλικίας της διάγνωσης (212), του βαθμού διαφοροποίησης του όγκου (212,214), της σταδιοποίησης της νόσου κατά τη διάγνωση (214), καθώς και με άλλους κλινικούς παράγοντες, όπως η ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία (207), η επιβίωση ελεύθερης νόσου (207) και η συνολική επιβίωση (214).

Σε όλες τις παραπάνω μελέτες, από τη στιγμή που έχουν διαφορετικό σχεδιασμό, διαφορετικό ορισμό του αριθμού αναφοράς των CAG επαναλήψεων, καθώς και διαφορετικούς πληθυσμούς είναι πολύ δύσκολο να συγκριθούν όσον αφορά τα αποτελέσματά τους. Επιπλέον, στις μελέτες συσχέτισης ασθενών/υγείων είναι αδύνατο να είναι κανείς σίγουρος για το γεγονός ότι κάποιος από την ομάδα των υγείων μαρτύρων δεν πάσχει από

υποκλινικό καρκίνο ή δεν θα νοσήσει στο μέλλον-συνεπώς, επηρεάζοντας την αξιοπιστία του αποτελέσματος (208-212,214).

### **Οιστρογονικοί υποδοχείς**

Μελέτες έχουν αποδείξει την πιθανή συσχέτιση των πολυμορφισμών του ERα με τον κίνδυνο του προστατικού καρκίνου. Πράγματι, οι Hernández et al, έδειξαν ότι οι Μαύροι με πολυμορφισμούς στον ERα είχαν αυξημένη πιθανότητα για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Κάτι τέτοιο δεν φάνηκε να ισχύει με τους Λατινογενείς και τους μη Λατινογενείς ασθενείς που πήραν μέρος στην ίδια μελέτη, σημειώνοντας ότι πιθανά η φυλή να παίζει κάποιο ρόλο στην έκφραση των συγκεκριμένων πολυμορφισμών και του καρκίνου του προστάτη (215). Συνολικά, η παραπάνω μελέτη έδειξε μη στατιστικώς σημαντική αύξηση της πιθανότητας για καρκίνο του προστάτη σε ασθενείς με SNPs στις PvuII και XbaI περιοχές του ERα γονιδίου. Από την άλλη, οι Tanaka et al, ήταν από τους πρώτους που απέδειξαν τη θετική συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών στο γονίδιο του ERα (κωδικόνιο10, exon 1) και του καρκίνου του προστάτη σε πληθυσμό Ασιατών (Ιάπωνες) (216), ενώ σε παρόμοιο δείγμα Ιαπώνων ασθενών, βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών στην PvuII περιοχή του ERα γονιδίου και του καρκίνου του προστάτη (217). Το παραπάνω εύρημα έρχονται να επιβεβαιώσουν άλλες δύο μελέτες που έγιναν στο Ηνωμένο Βασίλειο και στην Ινδία, αντίστοιχα (218,219). Επιπλέον, οι Cussenot et al. μελετώντας 13 πολυμορφισμούς στο γονίδιο του ERα, παρατήρησαν ότι όσοι Καυκάσιοι έφεραν τον GGGA πολυμορφισμό παρουσίαζαν μεγαλύτερο κίνδυνο να παρουσιάσουν καρκίνο του προστάτη (220). Από την άλλη, πρόσφατη μελέτη δεν κατάφερε να αναδείξει κάποια συσχέτιση μεταξύ των SNPs: IVS1-397, g34288C/T (rs2234693), IVS1-351, g3433A/G (rs9340799) και των TA STRPs και του καρκίνου του προστάτη (221). Παρ'όλα αυτά, οι McIntyre et al, μελετώντας πιθανή σύνδεση των STRPs στο ERα γονίδιο με τον προστατικό καρκίνο κατάφεραν να δείξουν ότι όσοι είχαν 24 και 25 TA επαναλήψεις είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του προστάτη (222).

Σε αντίθεση με τον ERα, οι πολυμορφισμοί του ERβ δεν είναι αρκετά μελετημένοι. Οι λίγες μελέτες πάνω στο θέμα δεν έχουν αποδείξει κάποια



συσχέτιση μεταξύ διαφόρων πολυμορφισμών του ERβ και αυξημένου κινδύνου για καρκίνο του προστάτη. Μελέτη που έγινε σε Κινέζικο πληθυσμό έδειξε ότι οι rs3829768 (A/G) και rs1271572 (C/A) στην περιοχή του υποκινητή του ERβ γονιδίου σχετίζονται με μειωμένη πιθανότητα για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη (223). Οι Karlsson et al. μελετώντας τέσσερις πολυμορφισμούς στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου του ERβ κατάφεραν να δείξουν μια πιθανή θετική συσχέτιση σε μόλις έναν από αυτούς (-13950 T/C), καταλήγοντας στην υπόθεση ότι γενετικές παραλλαγές του συγκεκριμένου γονιδίου μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στην έκφρασή του και, κατ'επέκταση, στον κίνδυνο για την ανάπτυξη του προστατικού καρκίνου (224). Από την άλλη, οι Chae et al. μελέτησαν δέκα πολυμορφισμούς χωρίς να αναδείξουν κάποια θετική συσχέτιση (225), ενώ στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν οι Nicolaiew et al. αφού μελέτησαν δεκατέσσερις πολυμορφισμούς σε συνάρτηση με τον κίνδυνο για ανάπτυξη προστατικού καρκίνου (226).

## UGT1A1

Ο ακριβής ρόλος των γενετικών αλλαγών του UGT1A1 γονιδίου στην αιτιοπαθογένεια ορμονικά σχετιζόμενων καρκίνων είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Στα πλαίσια της συσχέτισης της δράσης του UGT1A1 ενζύμου με τον μεταβολισμό των οιστρογόνων, αρχικά μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί στον οιστρογονοεξαρτώμενο καρκίνο του μαστού. Το σκεπτικό των συγκεκριμένων μελετών στηρίχθηκε στο γεγονός ότι αφενός το UGT1A1 μεταβολίζει την οιστραδιόλη και τους τοξικούς μεταβολίτες της, αφετέρου εντοπίζεται στο παρέγχυμα του μαζικού αδένα, κατά συνέπεια επάγει την γλυκουρονοποίηση και σε τοπικό-ιστικό επίπεδο. Έτσι, δύο επιδημιολογικές μελέτες σχεδιάστηκαν να ερευνήσουν την πιθανή συσχέτιση των πολυμορφισμών (STRPs, TA επαναλήψεις) της περιοχής του υποκινητή του UGT1A1 γονιδίου και του καρκίνου του μαστού: στην μία πήραν μέρος ΑφροΑμερικανίδες και στην άλλη Καυκάσιες (227,228). Κοινός παρονομαστής η διαπίστωση ότι η παρουσία του A(TA)<sub>8</sub>TAA έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση κατά 50% της μεταγραφικής ικανότητας του γονιδίου, ενώ η παρουσία του A(TA)<sub>7</sub>TAA οδηγεί σε μείωση κατά 30% της μεταγραφικής του ικανότητας (180). Έτσι, 200 ΑφροΑμερικανίδες με διηθητικό καρκίνο του μαστού και 200 controls συγκρίθηκαν μεταξύ τους, καταλήγοντας στη

διαπίστωση ότι η παρουσία κάποιου από τα A(TA)<sub>7</sub>TAA ή A(TA)<sub>8</sub>TAA αλληλία είχε αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου (227). Από την άλλη, όταν μελετήθηκαν οι παραπάνω πολυμορφισμοί σε πληθυσμό Καυκάσιων γυναικών με καρκίνο του μαστού, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της παρουσίας των παραπάνω αλληλίων με την πιθανότητα για ανάπτυξη καρκίνου. Στη συγκεκριμένη μελέτη, ακόμα και όταν μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί σε συσχέτιση με άλλους παράγοντες, όπως η εμμηναρχή, η εμμηνόπαυση και κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου, δεν αναδείχθηκε επίσης θετική σχέση μεταξύ των πολυμορφισμών και του καρκίνου του μαστού (228).

Από την άλλη, οι Dugay et al. μελετώντας τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς προσπάθησαν να τους συσχετίσουν με ακόμα έναν οιστρογονοεξαρτώμενο καρκίνο, τον καρκίνο του ενδομητρίου. Στην μελέτη αυτή κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία ομοζυγωτίας για το A(TA)<sub>7</sub>TAA αλληλίο σχετίζονταν αντίστροφα με τον κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου του ενδομητρίου, υποδηλώνοντας ότι η μειωμένη έκφραση του UGT1A1 ενζύμου μπορεί να έχει ογκοκατασταλτική επίδραση στο ενδομήτριο (229). Τέλος, μελέτες που έγιναν με σκοπό την διερεύνηση της σχέσης των παραπάνω πολυμορφισμών με τον κίνδυνο για την ανάπτυξη του καρκίνου των ωοθηκών και του καρκίνου του εντέρου δεν κατάφεραν να αναδείξουν κάποια θετική ή αρνητική συσχέτιση (230,231).

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ

Η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση του προστάτη αδένα ελέγχονται από τα ανδρογόνα, κυρίως από την τεστοστερόνη και την 5α-διυδροτεστοστερόνη. Χωρίς την παρουσία των ανδρογόνων τα προστατικά κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση και κατά συνέπεια, ατροφία (232). Η δράση των ορμονών αυτών βρίσκεται σε άμεση συνάρτηση με την παρουσία του ανδρογονικού υποδοχέα (AR), ο οποίος εκφράζεται στα προστατικά επιθηλιακά κύτταρα (233). Η μεταγραφική περιοχή του ανδρογονικού υποδοχέα περιέχει μια έντονα πολυμορφική τρινουκλεοτιδική περιοχή (CAGn), το μήκος της οποίας έχει συσχετιστεί με τον κίνδυνο για ανάπτυξη του προστατικού καρκίνου. Μεγαλύτερο μήκος CAG επαναλήψεων έχει βρεθεί ότι οδηγεί στην μείωση της έκφρασης του AR mRNA και της παραγωγής της AR πρωτεΐνης, αλλά και της μεταγραφικής ικανότητας του ανδρογονικού υποδοχέα σε καλλιέργειες προστατικών επιθηλιακών κυττάρων. Συνεπώς, μικρότερο μήκος CAG επαναλήψεων μπορεί να καταστήσει τον προστατικό ιστό πιο ευάλωτο στη μακροχρόνια δράση των ανδρογόνων, οδηγώντας σε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κατά συνέπεια, σε αύξηση του κινδύνου για προστατική καρκινογένεση (204,205,234).

Τα οιστρογόνα από την άλλη, παράγονται από την περιφερική αρωματοποίηση της τεστοστερόνης και ασκούν την δράση τους στον προστάτη, είτε μέσω των τοξικών μεταβολιτών τους, είτε μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων ERα και ERβ. Όσον αφορά τους οιστρογονικούς υποδοχείς, αυτοί εντοπίζονται τόσο στον φυσιολογικό όσο και στον καρκινικό προστάτικό αδένα και μάλιστα ο ERα εντοπίζεται στο στρώμα και ο ERβ στο προστατικό επιθήλιο (147,235). Μείωση της έκφρασης του ERβ έχει παρατηρηθεί στην προστατική καρκινογένεση και μάλιστα η δράση του συγκεκριμένου υποδοχέα έχει συνδεθεί με την διατήρηση του φυσιολογικού προστατικού επιθηλίου. Έχει παρατηρηθεί δε ότι προστατικοί καρκίνοι στους οποίους διατηρείται η έκφραση του ERβ σχετίζονται με πιο επιθετική συμπεριφορά (236-238). Από την άλλη, μειωμένη έκφραση του ERα έχει επίσης συνδεθεί με τον κίνδυνο για καρκίνο του προστάτη και ιδιαίτερα με τους ορμονοανθεκτικούς τύπους (143). Μελέτες έχουν δείξει ότι πολυμορφισμοί στα γονίδια των δύο οιστρογονικών υποδοχέων μπορεί να

οδηγήσουν σε αλλαγές στην έκφρασή τους και, κατ'επέκταση, στον κίνδυνο για την ανάπτυξη του προστατικού καρκίνου (216-226).

Τέλος, ολοένα και περισσότερο γίνεται πλέον αποδεκτό το γεγονός ότι η δράση των τοξικών μεταβολιτών των οιστρογόνων (ημικινόνες-κινόνες) αποτελεί σημαντικό παράγοντα καρκινογένεσης στους ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους και συνεπώς και στον καρκίνο του προστάτη (239). Η γλυκουρονοποίηση αυτών των μεταβολιτών αποτελεί σημαντικό παράγοντα αδρανοποίησής τους, με το UGT1A1 ένζυμο να αποτελεί έναν από τους κύριους εκφραστές της. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο του UGT1A1 και πιο συγκεκριμένα η αύξηση των (TA) επαναλήψεων στον υποκινητή του γονιδίου, οδηγεί σε μείωση της μεταγραφικής του ικανότητας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον μειωμένο καταβολισμό των κατεχολοιστρογόνων, την παραμονή αυξημένων ποσοτήτων τοξικών μεταβολιτών και κατά συνέπεια την αύξηση της πιθανότητας για καρκινογένεση.

Σκοπός της παρούσας διατριβής αποτελεί η μελέτη της συσχέτισης των πολυμορφισμών των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών με τον καρκίνο του προστάτη. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι επαναληπτικές πολυμορφικές αλληλουχίες (CAG)<sub>n</sub> στο γονίδιο του ανδρογονικού υποδοχέα, ο δινουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (TA)<sub>n</sub> στο γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα α, ο δινουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (CA)<sub>n</sub> στο γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα β, καθώς επίσης και ο πολυμορφισμός (TA)<sub>n</sub> του UGT1A1 γονιδίου. Οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί μελετήθηκαν τόσο όσον αφορά την κατανομή τους σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό, αλλά και όσον αφορά την συσχέτισή τους με δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του προστατικού καρκίνου, όπως είναι τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου, το κληρονομικό ιστορικό και οι διατροφικές συνήθειες των συμμετεχόντων στην μελέτη.

## **ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Στην μελέτη συμμετείχαν συνολικά 470 άνδρες που προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της Ουρολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και εξετάστηκαν λόγω συμπτωμάτων από το κατώτερο ουροποιητικό. Όλοι οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν για το περιεχόμενο της

μελέτης και έδωσαν προφορικά τη συγκατάθεσή τους για την ένταξή τους σε αυτή.

Τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη περιελάμβαναν τιμή PSA  $\geq 4$  ng/ml και/ή θετική δακτυλική εξέταση, τα οποία σε συνδυασμό με ή χωρίς την εύρεση ύποπτης για καρκίνο (υποηχοϊκής) υπερηχογραφικά περιοχής στην περιφερική ζώνη του αδένα αποτελούσαν ένδειξη για τη διενέργεια βιοψίας του προστάτη.

Η υπερηχογραφική μελέτη των ασθενών πραγματοποιήθηκε με τον υπερηχοτομογράφο Philips HD7®, χρησιμοποιώντας τη διορθική κεφαλή E6509 (multiplane 7,5 MHz). Η εξέταση γινόταν με τον ασθενή σε πλάγια θέση, κατόπιν προετοιμασίας του εντέρου με υποκλυσμό και μετά από προφυλακτική λήψη αντιβίωσης. Πιο συγκεκριμένα το πρωτόκολλο διορθικής υπερηχοτομογραφίας  $\pm$  βιοψία προστάτη της μελέτης μας είχε ως εξής:

- Έναρξη αντιβιοτικής αγωγής τρεις μέρες πριν από την διενέργεια διορθικού υπερηχογραφήματος προστάτη (transrectal ultrasonography, TRUS), κυρίως κινολόνης per os (σιπροφλοξασίνη, Ciproxin, Bayer®), ιδιαίτερα αν συνοδεύεται και από βιοψία προστάτη. Υποκλυσμός το προηγούμενο βράδυ.
- Την ημέρα της εξέτασης και πριν από τη διενέργειά της πραγματοποιείται πάντα δακτυλική εξέταση (DRE). Ο λόγος είναι διπλός: από τη μία για να αποκλειστεί κάποια τοπική παθολογία που θα κάνει δυσχερή ή ακόμα και απαγορευτική την είσοδο της διορθικής κεφαλής και από την άλλη για να εντοπιστούν πιθανές αλλοιώσεις του αδένα (ψηλαφητή σκληρία), που θέτει την υπόνοια όγκου και προσανατολίζει τον ιατρό κατά την διάρκεια της υπερηχοτομογραφικής εξέτασης.
- Τοποθέτηση του ασθενή σε πλάγια θέση. Είσοδος της διορθικής κεφαλής, αφού προηγουμένως λιπανθεί με gel xylocaine 1% και αναγνώριση των δομών του προστάτη αδένα. Η κεφαλή αρχικά τοποθετείται εγκάρσια, αναγνωρίζονται κατά σειρά οι δυο σπερματοδόχες κύστεις, ο αυχένας, η μεσότητα του αδένα και τέλος η κορυφή του (apex). Στη συνέχεια, η κεφαλή τοποθετείται επιμήκως και γίνεται η αναγνώριση των αντίστοιχων δομών. Σ' αυτό το σημείο

δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην αναγνώριση υποηχοϊκών ή/και υπερηχοϊκών περιοχών σε σχέση με την ομοιογενή υπερηχογραφικά περιφερική ζώνη του προστάτη, περιοχές που ενισχύουν την υποψία για την παρουσία όγκου.

- Μέτρηση των διαστάσεων του αδένος. Αυτή πραγματοποιείται σε δύο διαστάσεις, εγκάρσια και επιμήκως. Οι μετρήσεις αυτές χρησιμοποιούνται για να υπολογίσουν τον όγκο του προστάτη, στηριζόμενοι στην υπόθεση ότι ο αδένος έχει ελλειπτικό σχήμα. Μάλιστα, το λογισμικό της συσκευής υπερήχων της μελέτης υπολογίζει αυτόματα τον όγκο του προστάτη, χρησιμοποιώντας την μαθηματική σχέση:

$$\text{Όγκος προστάτη} = (\text{εγκάρσια διάμετρος}) \times (\text{κεφαλοουραία διάμετρος}) \times (\text{προσθιοπίσθια διάμετρος}) \times \pi/6$$

Ο λόγος για τον οποίο είναι απαραίτητη η μέτρηση του μεγέθους του προστάτη έχει να κάνει με τον καθορισμό του αριθμού των κομματιών που θα πρέπει να παρθούν κατά τη διενέργεια της βιοψίας. Όσο μεγαλύτερος ο προστάτης, τόσο περισσότερα κομμάτια θα πρέπει να παρθούν στην βιοψία του αδένος (240).

1. Επιλογή ασθενών για βιοψία προστάτη. Όλοι οι ασθενείς που είχαν αυξημένο PSA ( $\geq 4\text{ng/ml}$ ) ή/και θετικό εύρημα στην δακτυλική εξέταση υποβλήθηκαν σε προγραμματισμένη βιοψία του προστάτη αδένος. Η μέτρηση του PSA πραγματοποιούνταν στο ίδιο εργαστήριο σε όλους τους ασθενείς (Μικροβιολογικό Εργαστήριο Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας) και αφού προηγουμένως είχαν τηρηθεί κάποιοι κανόνες προς αποφυγή παραπλανητικών τιμών των μετρήσεων. Πιο συγκεκριμένα, δεν θα έπρεπε πριν από την μέτρηση του PSA να έχει προηγηθεί δακτυλική εξέταση, κυστεοσκόπηση, TRUS, εκσπερμάτιση, τοποθέτηση διουρηθρικού ουροκαθετήρα και τέλος, δεν θα έπρεπε ο ασθενής να παρουσιάζει συμπτώματα λοίμωξης κατώτερου ουροποιητικού. Σ'όλες τις παραπάνω περιπτώσεις η τιμή του PSA είναι αυξημένη και δεν μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστη. Παρ'όλο που σε χαμηλές τιμές του PSA ο κίνδυνος για την παρουσία καρκίνου του προστάτη εξακολουθεί να παραμένει, έστω και σε ένα μικρό ποσοστό

(πίνακας), ως κατώτερο όριο για την διενέργεια βιοψίας του προστάτη, όταν η δακτυλική εξέταση ήταν αρνητική, ορίστηκε η τιμή 4ng/ml, σύμφωνα και με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρείας.

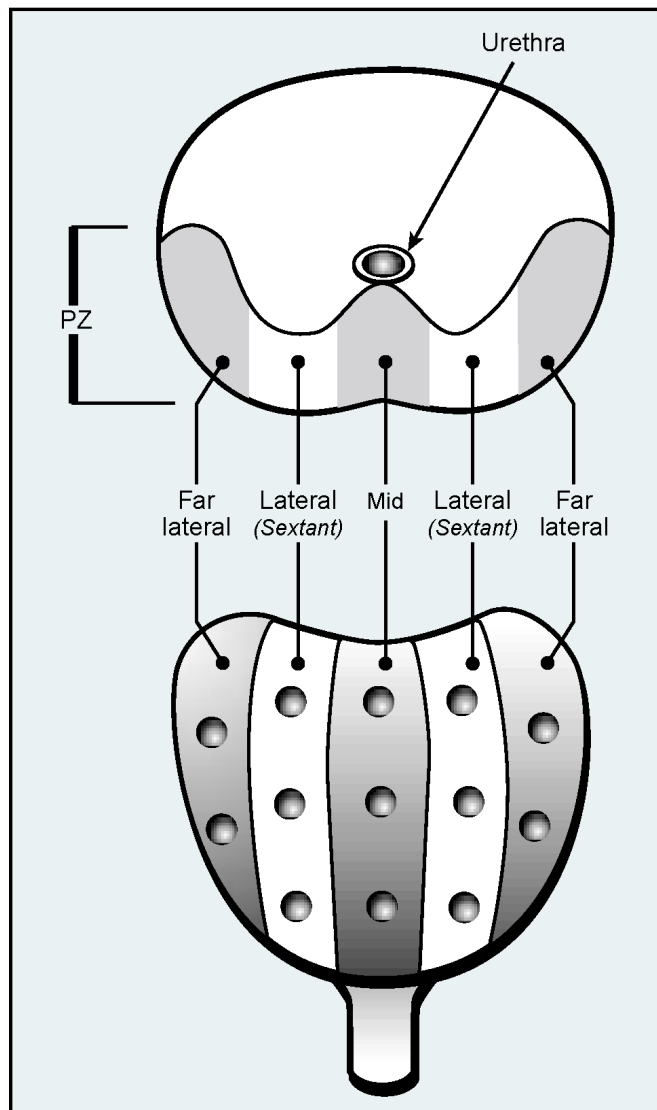
PSA level (ng/ml)	Κίνδυνος για CaP
• 0-0.5	6.6%
• 0.6-1	9.8 %
• 1.1-2	17.0%
• 2.1-3	23.9%
• 3.1-4	26.9%

**Πίνακας 2:** Κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη σε συνάρτηση με τις τιμές του PSA

2. Διενέργεια βιοψίας προστάτη. Οι υποψήφιοι πριν τη βιοψία ελέγχονται για την λήψη κάποιων φαρμάκων που πρέπει να διακοπούν πριν από την πραγματοποίηση της, όπως είναι τα αντιπηκτικά και αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα. Στη συνέχεια χορηγείται αντιβίωση ενδομυικά (συνήθως νετιλμικίνη i.m) και οι ασθενείς τοποθετούνται σε πλάγια θέση, προκειμένου να γίνει η είσοδος της διορθικής κεφαλής Philips E6509, στην οποία και προσαρμόζεται το κανάλι βιοψίας. Για την αντιμετώπιση του πόνου χρησιμοποιήθηκε gel xylocaine 1% τοπικά, το οποίο ήταν και αρκετό για την πραγματοποίηση της εξέτασης. Για τη λήψη των βιοψιών χρησιμοποιήθηκε αυτόματο σύστημα βιοψίας (Magnum Biopsy gun, Bard®) με βελόνες μεγέθους 18G που εξαγουν κυλίνδρους προστατικού ιστού μήκους 17 mm. Κατόπιν, ακολουθούσαν κατευθυνόμενες βιοψίες 12 σημείων (6 ανά προστατικό λοβό), καθώς και όλων των υπόπτων περιοχών της περιφερικής ζώνης. Οι βιοψίες γινόταν σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Presti et al. (241), το οποίο περιελάμβανε, πέρα από την κλασική βιοψία των έξι σημείων (242), την λήψη δυο επιπλέον κυλίνδρων από τα πλάγια της βάσης και της μεσότητας του κάθε λοβού (Εικόνα 18). Στην



αρχική βιοψία δεν λαμβανόταν βιοψίες από την μεταβατική ζώνη του αδένος. Επιπλέον των τυχαίων βιοψιών, κομμάτια λαμβάνονται και από ύποπτες για καρκίνο υπερηχογραφικά περιοχές του αδένος, ανεξαρτήτως εντόπισης.



**Εικόνα 18:** κατευθυνόμενες τυχαίες βιοψίες προστάτη  
*PZ:* περιφερική ζώνη προστάτη

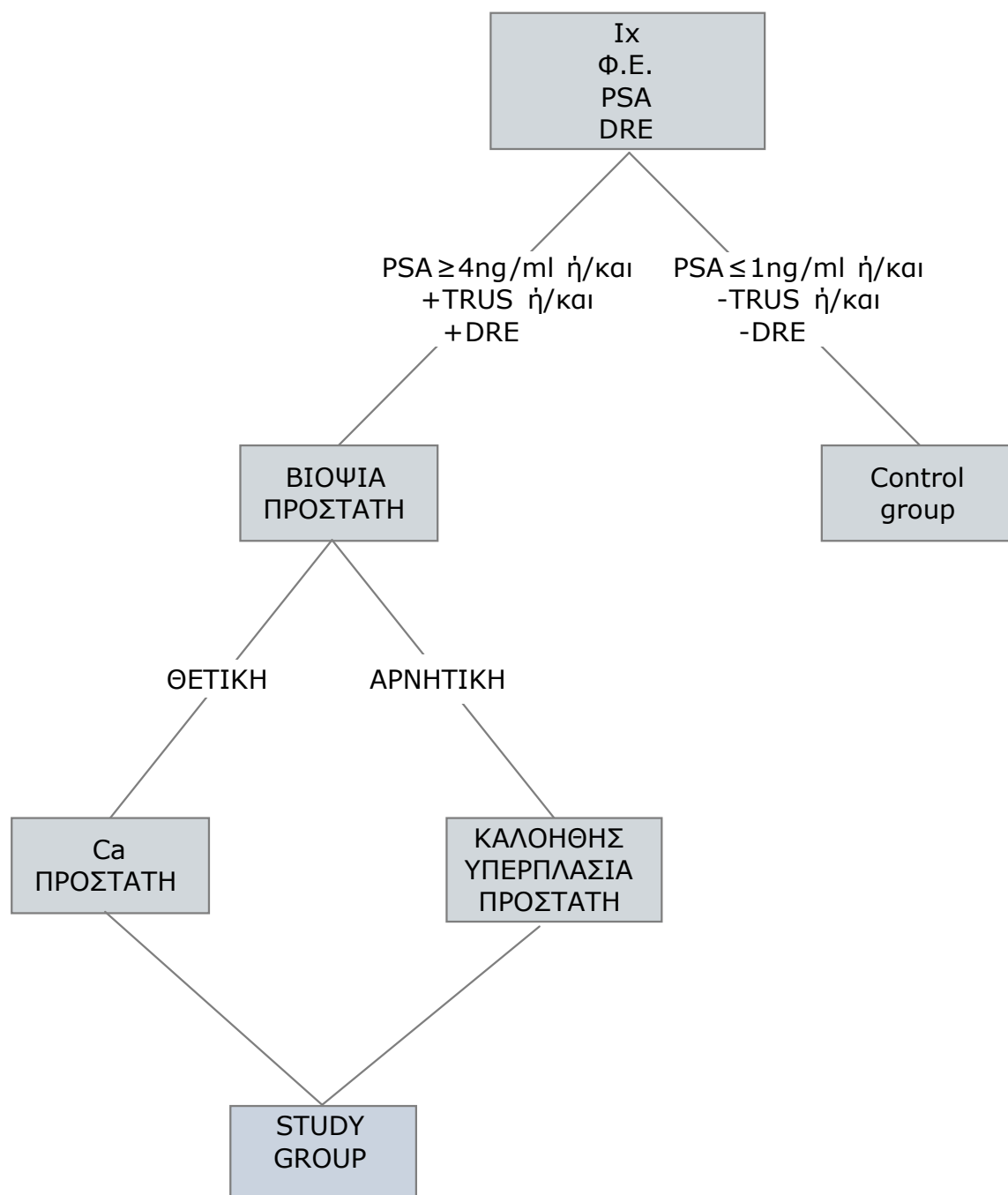
3. Τα ιστολογικά ευρήματα από τις βιοψίες ταξινομήθηκαν σαν θετικά (καρκίνος) και αρνητικά (φυσιολογικός αδένος, καλοήγη υπερπλασία), κατατάσσοντας τους ασθενείς σε δύο ομάδες: την

ομάδα καρκίνου και την ομάδα καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη.

Τα κριτήρια για την επιλογή των συμμετεχόντων στην ομάδα ελέγχου ήταν η πολύ χαμηλή τιμή του PSA ( $\leq 1$  ng/ml) και η απουσία, από το ιστορικό και την φυσική εξέταση, προστατικού καρκίνου. Όσον αφορά το PSA, είναι πλέον αποδεκτό ότι όλες οι τιμές του παρουσιάζουν θεωρητικά κάποιο κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου (243). Προκειμένου λοιπόν, να ελαχιστοποιήσουμε τις πιθανότητες για την ύπαρξη καρκίνου στην ομάδα ελέγχου, ορίσαμε ως ανώτερη τιμή του PSA το 1 ng/ml, αφού σε αυτές τις τιμές ο κίνδυνος για την παρουσία καρκίνου ανέρχεται σε ποσοστά  $< 10\%$  (244). Επιπλέον, οι υποψήφιοι για την ομάδα ελέγχου δεν θα έπρεπε να πάσχουν ήδη από καρκίνο του προστάτη, αλλά και ούτε να παρουσιάζουν κάποια συμπτωματολογία ή/και σημειολογία καρκίνου. Αυτό σημαίνει ότι όλοι οι υποψήφιοι θα έπρεπε να έχουν αρνητική δακτυλική εξέταση και φυσιολογική υπερηχογραφική εικόνα του προστάτη κατά την TRUS, χωρίς την παρουσία υποηχοϊκών ή υπερηχοϊκών περιοχών που θα έχριζαν την ανάγκη για την διενέργεια βιοψίας. Τέλος, οι υποψήφιοι δεν θα έπρεπε να είχαν κληρονομικό ιστορικό κακοήθειας στον προστάτη, αφού ως γνωστό, αυτοί οι άρρενες παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα για την ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη κατά τη διάρκεια της ζωής τους, κάτι που αυτομάτως τους καθιστά ακατάλληλους για την ένταξή τους στην ομάδα ελέγχου (Εικόνα 19).

Κριτήρια αποκλεισμού από την μελέτη αποτέλεσαν η ύπαρξη γνωστής νεοπλασίας του προστάτη, λοίμωξης του ουροποιογεννητικού, μόνιμου ουρηθρικού καθετήρα και προηγηθείσας βιοψίας του αδένος. Επίσης, η ύπαρξη καρκίνου σε άλλα όργανα και κυρίως ορμονοεξαρτώμενοι καρκίνοι, όπως ο καρκίνος του εντέρου, μεταβολικές διαταραχές, αλλά και όσοι ελάμβαναν ορμονικά σκευάσματα για οποιονδήποτε λόγο.

Τέλος, σε όλους τους συμμετέχοντες στη μελέτη ελήφθησαν εξετάσεις αίματος και ούρων για τον έλεγχο ορμονικών μεταβολών, αλλά και τον αποκλεισμό λοίμωξης του κατώτερου ουροποιητικού. Επιπλέον, όλα τα κατάλληλα άτομα για την ένταξή τους στην μελέτη υποβλήθηκαν σε αιμοληψία για την συλλογή, επεξεργασία και απομόνωση του γενετικού υλικού.



**Εικόνα 19:** Πρωτόκολλο της μελέτης. TRUS: Διορθική υπερηχοτομογραφία, DRE: Δακτυλική εξέταση, Ιχ: Ιστορικό, Φ.Ε: Φυσική εξέταση

## ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Το γενωμικό DNA απομονώθηκε από 3ml περιφερικού αίματος με τη βοήθεια ενός πακέτου απομόνωσης διαθέσιμου στο εμπόριο (Puregene DNA extraction kit; Gentra Systems, Inc., Research Triangle Park, NC, USA) και με βάση τις οδηγίες των κατασκευαστών.

Η όλη διαδικασία της απομόνωσης του DNA είχε ως εξής, για κάθε έναν από τους συμμετέχοντες:

### **Λύση των κυττάρων**

1. Προσθέτουμε 3 ml αίματος σε ένα σωληνάριο των 15 ml που περιέχει 9 ml RBC Lysis Solution (λυτικό διάλυμα ερυθρών αιμοσφαιρίων). Αναστρέφουμε για ανάμειξη-αφήνουμε 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αναστρέφουμε ακόμα μια φορά μέσα σ' αυτό το δεκάλεπτο
2. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 3000 rpm. Αφαιρούμε το υπερκείμενο, αφήνοντας πίσω το ορατό λευκό ίζημα κυττάρων και 200-400 μl εναπομείναντος υγρού
3. Βάζουμε το σωληνάριο στο Vortex, ώστε να αναδευτεί έντονα και να αιωρηθούν τα λευκά αιμοσφαίρια στο εναπομείναν υπερκείμενο υγρό
4. Προσθέτουμε 3 ml Cell Lysis Solution (λυτικό διάλυμα κυττάρων) στο σωληνάριο που περιέχει τα αιωρούμενα κύτταρα και αναρροφούμε με μικρή πιπέτα μέσα-έξω συνεχώς, ώστε να γίνει η λύση των κυττάρων. Αφήνουμε στους 37° C (γύρω στα 10 λεπτά) μέχρι το διάλυμα να γίνει ομοιογενές (να μην υπάρχουν συσσωματώματα). Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου να κρυώσει.

### **Ιζηματοποίηση πρωτεϊνών**

1. Προσθέτουμε 1 ml Protein Precipitation Solution (διάλυμα ιζηματοποίησης πρωτεϊνών) στο κυτταρικό διάλυμα
2. Το τοποθετούμε στο Vortex ώστε να αναδευτεί έντονα και με υψηλή ταχύτητα για 20 δευτερόλεπτα ώστε να αναμειχθεί ομοιόμορφα το Protein Precipitation Solution με το κυτταρικό διάλυμα
3. Φυγοκεντρούμε στις 3000 rpm για 10 δευτερόλεπτα. Οι πρωτεΐνες θα σχηματίσουν ένα συμπαγές σκούρο καφέ ίζημα

### **Ιζηματοποίηση DNA**

1. Αδειάζουμε το υπερκείμενο διάλυμα που περιέχει το DNA (αφήνοντας πίσω το ίζημα των πρωτεϊνών) σε ένα καθαρό σωληνάριο των 15 ml που περιέχει 3 ml ισοπροπανόλη 100%

2. Αναμιγνύουμε το δείγμα με ανάδευση με ήπιες κινήσεις, γύρω στις 50 φορές, μέχρι να σχηματιστούν ορατά λευκά συσσωματώματα από DNA
3. Φυγοκεντρούμε στις 2500 rpm για 3 λεπτά και το DNA θα γίνει ορατό σαν ένα μικρό λευκό ίζημα
4. Αδειάζουμε το υπερκείμενο διάλυμα αφήνοντας μικρή ποσότητα πάνω από το ίζημα και στεγνώνουμε το σωληνάριο πάνω σε καθαρό απορροφητικό χαρτί. Προσθέτουμε 3 ml αιθανόλη 70%. Αναδεύουμε το σωληνάριο αρκετές φορές ώστε να ξεπλύνουμε το ίζημα του DNA
5. Φυγοκεντρούμε στις 2500 rpm για 1 λεπτό. Αδειάζουμε προσεκτικά την αιθανόλη. Το ίζημα μπορεί να είναι πολύ χαλαρό, γι'αυτό αδειάζουμε αργά, προσέχοντας πάντα το ίζημα
6. Στεγνώνουμε το σωληνάριο σε καθαρό απορροφητικό χαρτί, ώστε το δείγμα να βρίσκεται σε ξηρή ατμόσφαιρα για 12 τουλάχιστον ώρες

### **Ενυδάτωση DNA**

Αφού το δείγμα στεγνώσει καλά, προσθέτουμε 250 μl dd H<sub>2</sub>O ή DNA Hydration Solytion (διάλυμα ενυδάτωσης DNA) και τοποθετούμε τα δείγματα σε ψυγείο στους 4° C.

**Προσδιορισμός των πολυμορφισμών (CAG)<sub>n</sub> του γονιδίου του ανδρογονικού υποδοχέα, (TA)<sub>n</sub> του γονιδίου του οιστρογονικού υποδοχέα α, (CA)<sub>n</sub> του γονιδίου του οιστρογονικού υποδοχέα β και (TA)<sub>n</sub> του γονιδίου UGT1A1.**

Με βάση τις αλληλουχίες των ανθρώπινων γονιδίων για τους υποδοχείς των οιστρογόνων ERα και ERβ και τους υποδοχείς των ανδρογόνων (AR) που είναι διαθέσιμες από την Τράπεζα Γονιδίων (Gene Bank) και με τη χρήση του λογισμικού Primer 3 ([www.jstbio.com](http://www.jstbio.com)) σχεδιάστηκαν οι εκκινητές που χρειαζόνταν για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος του DNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

Για το γονίδιο AR χρησιμοποιήθηκαν ένας οδηγός εκκινητή (5'-Cy5, 0-AAT CTG TTC CAG AGC GTG C-3') και ένας αντίστροφος εκκινητή (5'-GGA ACA GCA ACC TTC ACA G-3') που ενίσχυαν την επανάληψη c.172(CAG)<sub>n</sub> μέσα στο εξόνιο 1 του γονιδίου.

Για το γονίδιο ERα χρησιμοποιήθηκαν ένας οδηγός εκκινητή (5'- Cy5,0-AGA CGC ATG ATA TAC TTC ACC- 3') και ένας αντίστροφος εκκινητή (5'- GTT CAG TTG GGC TAG GAT AT-3') που ενίσχυαν την επανάληψη (TA)<sub>n</sub> σε απόσταση -1174 bp από το εξόνιο 1, στην περιοχή που προωθεί τη μεταγραφή του γονιδίου (υποκινητής) 1A.

Για το γονίδιο ERβ χρησιμοποιήθηκαν ένας οδηγός εκκινητή (5'- Cy5,0-GGT AAA CCA TGG TCT GTA CC-3') και ένας αντίστροφος εκκινητή (5'- AAC AAA ATG TTG AAT GAG TGG G-3') που ενίσχυαν την επανάληψη c 1092+3607 (CA)<sub>n</sub> στην πλευρική περιοχή του γονιδίου.

Για το γονίδιο UGT1A1 χρησιμοποιήθηκαν ένας οδηγός εκκινητή (5'-GTC ACG TGA CAC AGT CAA AC-3') και ένα αντίστροφος εκκινητή (5'-TTT GCT CCT GCC AGA GGT T-3') που ενίσχυαν τμήματα 98, 100 και 102 bp στον υποκινητή του γονιδίου UGT1A1.

Ακολούθησε πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (multiplex PCR) σε τελικό όγκο 25μl, που περιείχε 50ng DNA, 5pmol από τον κάθε εκκινητή και 12,5μl Taq πολυμεράση Master Mix (Multiplex PCR kit, Qiagen Science, Hilden, Germany). Οι συνθήκες της PCR είχαν ως ακολούθως: 95°C για 15 min, στη συνέχεια 38 κύκλοι στους 95°C για 30 sec, 58°C για 90 sec και 72°C για 90 sec, με ένα τελευταίο στάδιο παράτασης στους 72°C για 10 min.

Όλοι οι οδηγοί εκκινητή σημάνθηκαν με τη φθορίζουσα χρωστική Cy5,0 (Proligo LLC, Boulder, CO, USA). Ένα κλάσμα της αντίδρασης αναμίχθηκε με μια χρωστική και με δείκτες (markers) μεγέθους 50bp και 300 bp (Visible Genetics, Toronto, Canada), θερμάνθηκε στους 95°C για 5 min και κατόπιν ψύχθηκε στον πάγο. Στη συνέχεια έγινε διαχωρισμός σε γέλη πολυακρυλαμίδης 6%. Τα μεγέθη των αλληλόμορφων προσδιορίστηκαν σε σχέση με τα μεγέθη εξωτερικών δεικτών, με τη βοήθεια ενός αυτοματοποιημένου αναλυτή αλληλουχιών DNA (το οποίο ανιχνεύει την αλληλουχία και συνεπώς και τις επαναλήψεις των νουκλεοτιδίων σε συγκεκριμένο τμήμα DNA) και αναλύθηκαν με τη χρήση του Fragment Analysis Software (Visible Genetics, Toronto, Canada).

Τα προϊόντα της PCR ποίκιλαν σε μέγεθος: για το γονίδιο AR από 243 bp (8 CAG επαναλήψεις) έως 315 bp (32 CAG επαναλήψεις), για το γονίδιο του ERα από 172 bp (4 TA επαναλήψεις) έως 206 bp (21 TA επαναλήψεις), για το

γονίδιο ERβ από 137 bp (9 CA επαναλήψεις) έως 163 bp (22 TA επαναλήψεις) και τέλος για το γονίδιο UGT1A1 από 98 bp (6 TA επαναλήψεις) έως και 100 bp (7 TA επαναλήψεις).

## ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση της διατριβής χωρίστηκε σε δυο μέρη, στην ανάλυση των πολυμορφισμών των ERα, ERβ και AR και στην ανάλυση των πολυμορφισμών του UGT1A1 γονιδίου και τον συσχετισμό τους με τον καρκίνο του προστάτη.

Οι συχνότητες των αλληλομόρφων συνοψίστηκαν από τη μέση τιμή (mean) και το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (standard mean error, SME). Οι διαφορές στις συχνότητες των αλληλομόρφων ανάμεσα σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και σε υγιείς μάρτυρες εξετάστηκαν με τη βοήθεια του  $\chi^2$  test και του Student's t-test.

Όσον αφορά τους ERα, ERβ και AR πολυμορφισμούς, με βάση προηγούμενες έρευνες, χωρίσαμε όλα τα αλληλόμορφα σε δυο ομάδες με περίπου ίδιο μέγεθος: ομάδα με βραχεία και ομάδα με μακρά αλληλόμορφα. Ο διαχωρισμός των υποομάδων έγινε με όριο το μέσο και έτσι οι ομάδες που δημιουργήθηκαν είχαν περίπου τα ίδια μεγέθη. Έτσι όλοι οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν σε υποομάδες που αποτελούνταν από αυτούς με δύο μακρά αλληλόμορφα (LL), αυτούς με ένα βραχύ και ένα μακρύ αλληλόμορφο (SL) και αυτούς με δύο βραχεία αλληλόμορφα (SS). Τα όρια διαχωρισμού ήταν 19 επαναλήψεις (τα αλληλόμορφα που περιείχαν  $< ή = 19$  επαναλήψεις: βραχεία) για το γονίδιο AR, 10 επαναλήψεις (τα αλληλόμορφα που περιείχαν  $< ή = 10$  επαναλήψεις: βραχεία) για το ERα και 17 επαναλήψεις (τα αλληλόμορφα που περιείχαν  $< ή = 17$  επαναλήψεις: βραχεία) για το ERβ. Τα ποσοστά πιθανοτήτων (odds ratio, OR) υπολογίστηκαν με τη λογιστική ανάλυση σχέσης μεταβλητών (logistic regression analysis) με διαστήματα βεβαιότητας 95% (95% confidence interval, CIs). Υπολογίσαμε τα ORs χρησιμοποιώντας άτομα ομόζυγα για τα βραχεία αλληλόμορφα -1174 (TAn), c.1092+3607 (CA)n και c.172 (CAG)n, σαν σημεία αναφοράς.

Υπολογίσαμε τα ποσοστά πιθανοτήτων (odds ratio, ORs) για διάφορους γονότυπους και στη συνέχεια περιλάβαμε στα μοντέλα λογιστικής σχέσης μεταβλητών, μεταβλητές που ήταν γνωστό ότι σχετίζονταν με τον καρκίνο του

προστάτη. Αυτές οι μεταβλητές ήταν το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του προστάτη, το κάπνισμα και οι διατροφικές συνήθειες - κύρια η αυξημένη κατανάλωση ζωικού λίπους. Σε όλες τις περιπτώσεις μια τιμή  $p < 0,05$  θεωρούνταν στατιστικώς σημαντική. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με το στατιστικό πακέτο SPSS 16.0.

Όσον αφορά τους UGT1A1 πολυμορφισμούς, η ανάλυση  $\chi^2$  χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθούν οι διαφορές στην κατανομή των αλληλομόρφων στους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και στους υγιείς μάρτυρες. Επιπλέον, η  $\chi^2$  ανάλυση χρησιμοποιήθηκε για τη πιθανή συσχέτιση των διαφορετικών γονοτύπων με ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του προστατικού καρκίνου. Τέλος, με βάση τα ποσοστά πιθανοτήτων (odds ratio, OR) και τα διαστήματα βεβαιότητας 95% (95% confidence interval, CIs) υπολογίστηκε ο κίνδυνος για την ανάπτυξη καρκίνου και ο συσχετισμός του με τον A(TA)7TAA/A(TA)7TAA γονότυπο.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην μελέτη πήραν μέρος συνολικά 470 άρρενες: 210 ασθενείς με  $PSA \geq 4 \text{ ng/ml}$  (ομάδα βιοψίας) και 260 με  $PSA \leq 1 \text{ ng/ml}$  (ομάδα ελέγχου). Η μέση ηλικία των μελών της ομάδας βιοψίας ήταν  $68,64 \pm 6,03$  έτη, ενώ η μέση ηλικία των μελών της ομάδας ελέγχου ήταν  $69,32 \pm 5,59$  ( $p = 0,208$ ). Από τα 210 μέλη της ομάδας βιοψίας, 106 εμφάνισαν θετική βιοψία προστάτη (ομάδα καρκίνου) και 104 αρνητική (ομάδα καλοήθους υπερπλασίας προστάτη). Η μέση τιμή της ηλικίας των μελών της ομάδας καρκίνου ήταν  $68,65 \pm 6,42$  έτη, η αντίστοιχη δε για την ομάδα καλοήθους υπερπλασίας ήταν  $68,63 \pm 5,62$  έτη ( $p = 0,975$ ).

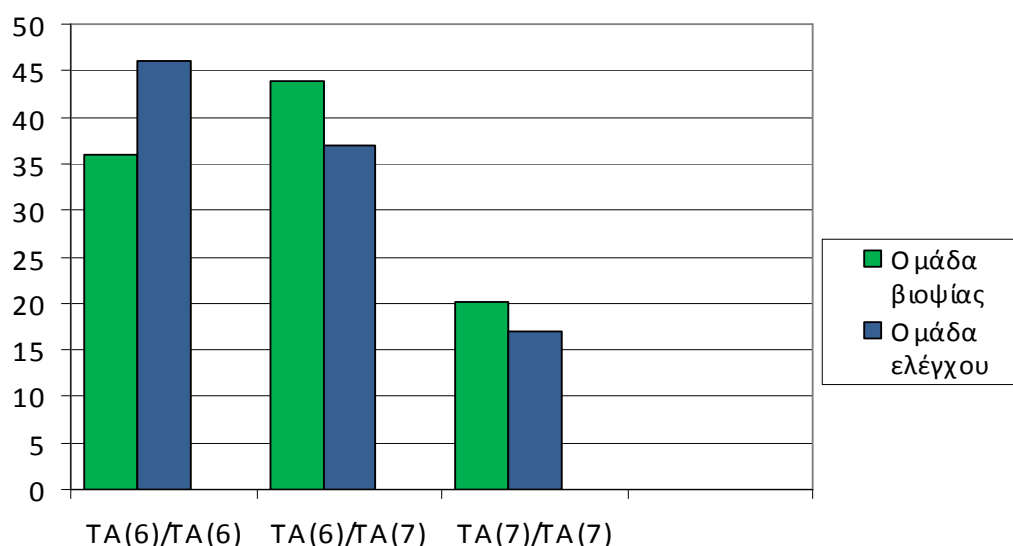
Η μέση τιμή του PSA στην ομάδα βιοψίας ήταν  $11,81 \text{ ng/ml}$  (εύρος: 2,9-188  $\text{ng/ml}$ ), ενώ στην ομάδα ελέγχου η μέση τιμή του PSA ήταν  $0,29 \text{ ng/ml}$  (εύρος: 0,1-1  $\text{ng/ml}$ ). Επιπλέον, η μέση τιμή του PSA στην ομάδα καρκίνου ήταν  $13,77 \text{ ng/ml}$  (εύρος: 4-188  $\text{ng/ml}$ ) και  $9,97 \text{ ng/ml}$  (εύρος: 2,9-12  $\text{ng/ml}$ ) στην ομάδα καλοήθους υπερπλασίας, αντίστοιχα. Τέλος, τα μέλη της ομάδας καρκίνου ταξινομήθηκαν, ανάλογα με το αποτέλεσμα της ιστολογικής εξέτασης (Gleason score, GS), σε τρεις υποομάδες: ομάδα χαμηλού GS ( $< 7$ ), ομάδα ενδιάμεσου GS ( $= 7$ ) και ομάδα υψηλού GS ( $> 7$ ). Τα ποσοστά



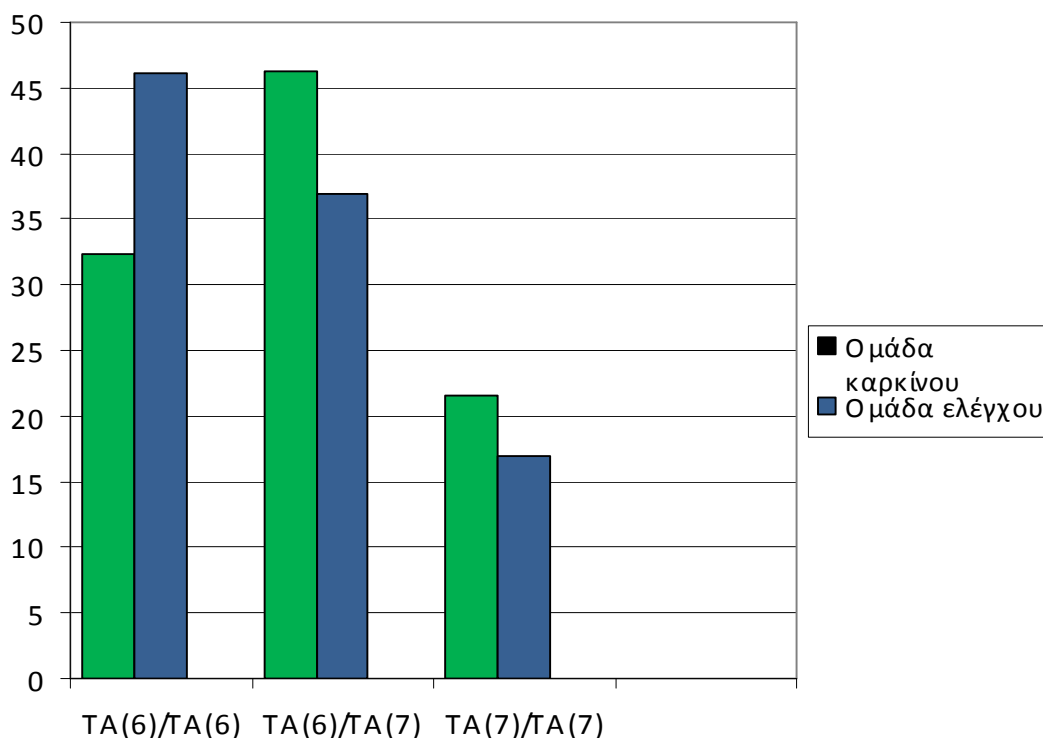
κατανομής τους σε αυτές τις υποομάδες ήταν 36,7% για την ομάδα χαμηλού GS, 37,5% για την ενδιάμεσου και 25,8% για την ομάδα υψηλού GS, αντίστοιχα.

### Πολυμορφισμοί A(TA)<sub>n</sub>TAA στο γονίδιο UGT1A1.

Όσον αφορά το γονίδιο του UGT1A1 ενζύμου, η κατανομή των γονοτύπων στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου ανάμεσα στην ομάδα βιοψίας και στην ομάδα ελέγχου απεικονίζεται στην εικόνα 20. Αντιστοίχως, η κατανομή των γονοτύπων ανάμεσα στην ομάδα καρκίνου και την ομάδα ελέγχου απεικονίζεται στην εικόνα 21.



**Εικόνα 20.** Η συχνότητα της κατανομής των τριών γονοτύπων του UGT1A1 γονιδίου στην ομάδα βιοψίας και στην ομάδα ελέγχου



**Εικόνα 21:** Η συχνότητα της κατανομής των τριών γονοτύπων του γονιδίου UGT1A1 στην ομάδα καρκίνου και στην ομάδα ελέγχου.

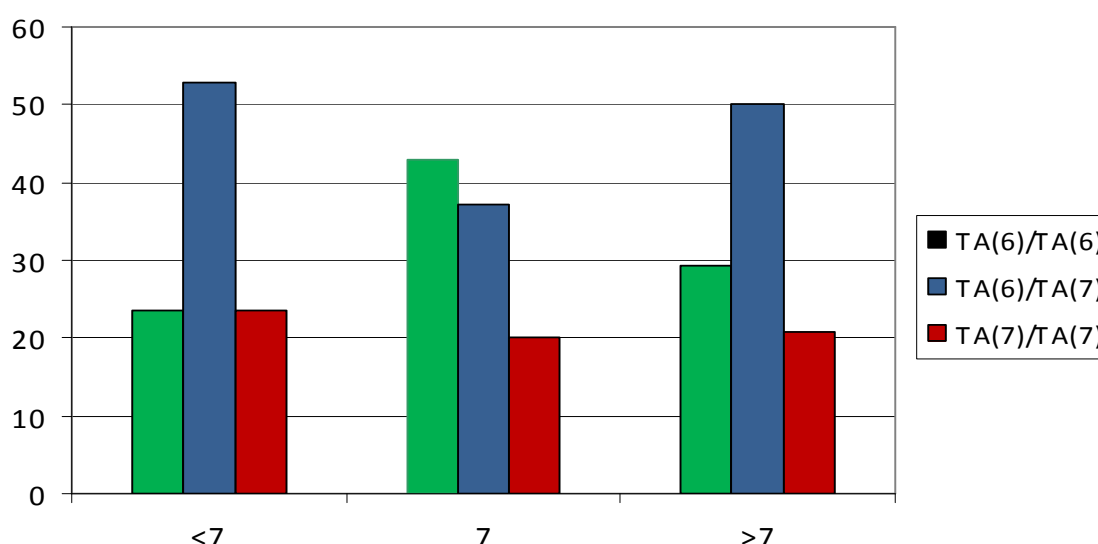
Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά όσον αφορά την κατανομή των τριών γονοτύπων στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου UGT1A1 ανάμεσα στην ομάδα βιοψίας και την ομάδα ελέγχου ( $p=0,109$ ). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ούτε ανάμεσα στην ομάδα καρκίνου και την ομάδα ελέγχου, όσον αφορά τους αντίστοιχους πολυμορφισμούς ( $p=0,09$ ). Τα ποσοστά πιθανοτήτων (ORs) των μελών της ομάδας καρκίνου να φέρουν ομοζυγωτία για το A(TA) $\gamma$ TAA αλληλίο ήταν 1.33 (95% CI: 0.7349-2.4303,  $p=0.34$ ). Η αντίστοιχη πιθανότητα για τα μέλη της ομάδας αυτής να φέρουν την παρουσία τουλάχιστον ενός A(TA) $\gamma$ TAA αλληλίου στον γονότυπό τους ήταν 1.48 (95% CI: 1.048-2.086).

Όσον αφορά τον κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη σε όσους είναι ομοζυγώτες για τον πολυμορφικό γονότυπο A(TA) $\gamma$ TAA, δεν παρατηρήθηκε σημαντικός συσχετισμός μεταξύ των ομοζυγωτών (TA(7)/TA(7) προς τους ετεροζυγώτες TA(6)/TA(7) ή/και τους ομοζυγώτες TA(6)/TA(6) ( $p=0.34$ , πίνακας 3). Τέλος, μελετώντας την κατανομή των γονοτύπων στις GS υποομάδες, δεν αναδείχθηκε σημαντικός συσχετισμός

ανάμεσα στους πολυμορφικούς γονότυπους και το Gleason score των ασθενών με καρκίνο του προστάτη ( $p=0.52$ ) (Εικόνα 22).

UGT1A1 γονότυποι	Ομάδα καρκίνου N (%)	Ομάδα ελέγχου N (%)	p-value
6/6	30 (32,26)	111 (46,06)	$p=0.109$
6/7	43 (46,24)	89 (36,93)	
7/7	20 (21,51)	41 (17,01)	
7/7	20(21,51)	41(17,01)	$p=0.34$
6/6+6/7	73(78,5)	200(82,99)	

**Πίνακας 3:** UGT1A1 γονότυποι ανάμεσα στις ομάδες καρκίνου και ελέγχου.

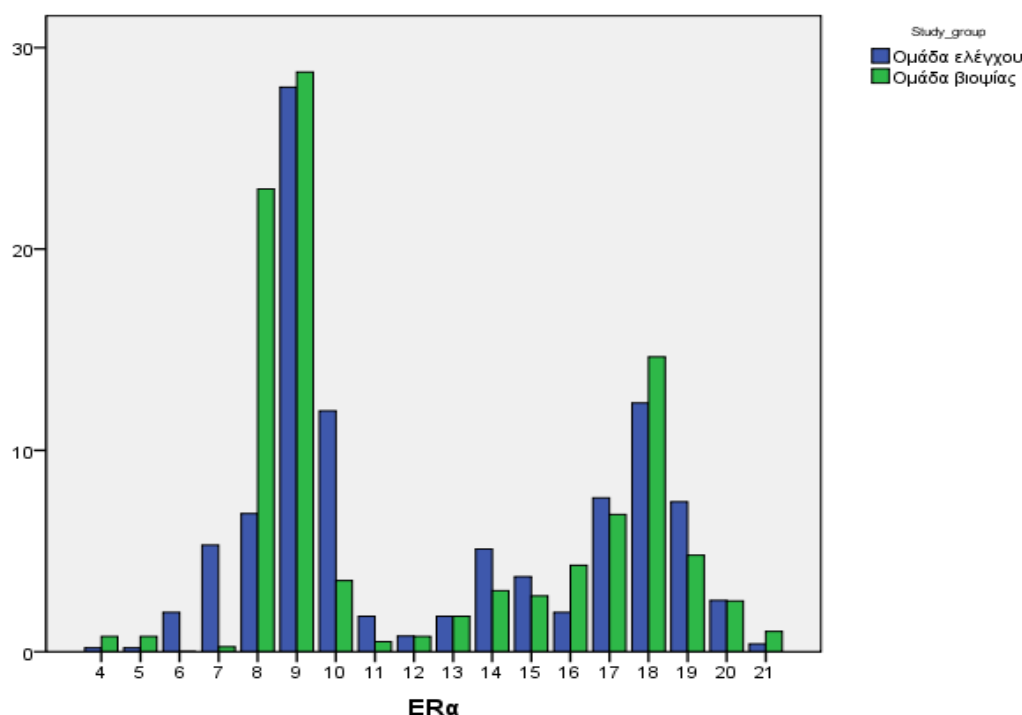


**Εικόνα 22:** Η συχνότητα των τριών γονοτύπων του UGT1A1 γονιδίου σε σχέση με το Gleason Score (GS: <7, 7, >7)

### Πολυμορφισμός (TA)<sub>n</sub> του γονιδίου ERα.

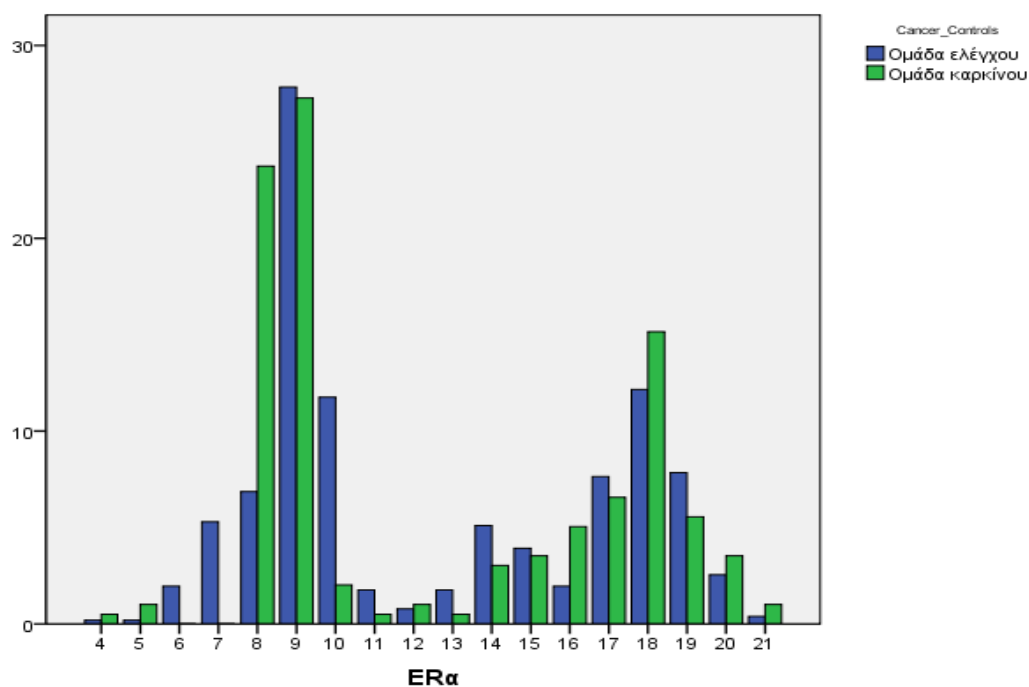
Οι TA επαναλήψεις στο γονίδιο ERα ποίκιλαν από 4 έως 21 όταν συγκρίθηκαν οι ομάδες βιοψίας και ελέγχου, με ένα μέσο μέγεθος της τάξης των 10 επαναλήψεων. Η συχνότητα κατανομής του πολυμορφισμού επαναλήψεων του δινουκλεοτιδίου -1174 (TA)<sub>4-21</sub> στο γονίδιο ERα στους συμμετέχοντες στην ομάδα βιοψίας και στην ομάδα ελέγχου παρουσίαζε δυο

κορυφές στις επαναλήψεις 9 και 18 και μια χαμηλή κατανομή στις ενδιάμεσες επαναλήψεις αλληλομόρφων (Εικόνα 23).



**Εικόνα 23:** Κατανομή (%) αλληλομόρφων ERα στην ομάδα βιοψίας και στην ομάδα ελέγχου.

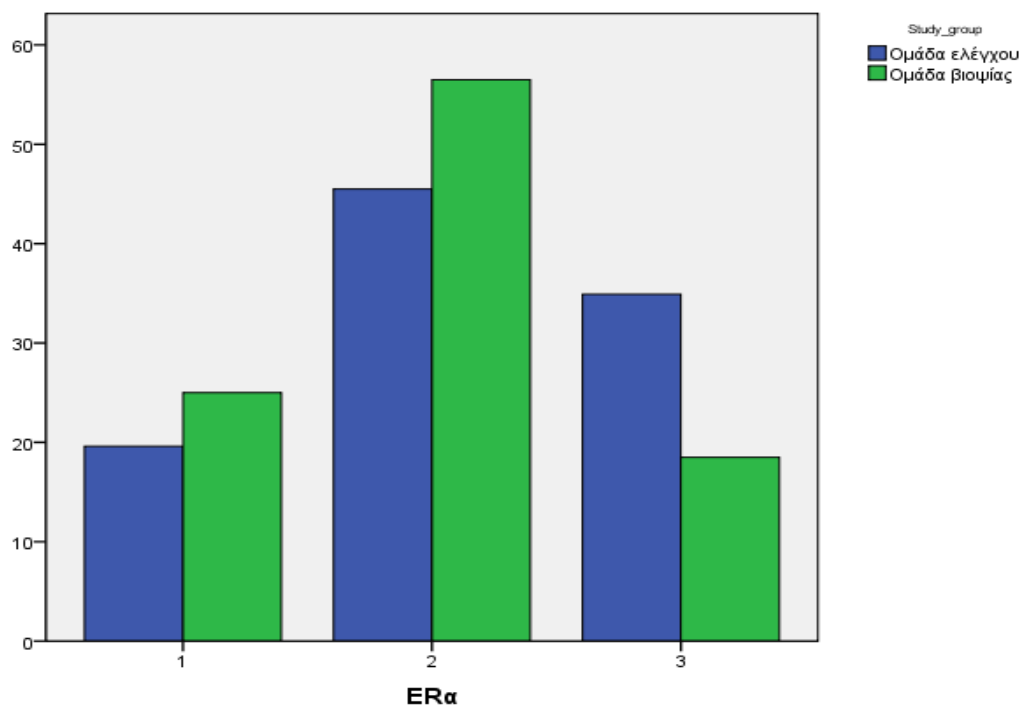
Αντίστοιχες ήταν και οι συχνότητες της κατανομής για το ERα, όταν συγκρίθηκαν οι ομάδες καρκίνου και ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα, οι TA επαναλήψεις στο γονίδιο ERα ποίκιλαν από 4 έως 21 με ένα μέσο μέγεθος της τάξης των 10 επαναλήψεων. Η συχνότητα κατανομής του πολυμορφισμού επαναλήψεων του δινουκλεοτιδίου -1174 (TA)<sub>4-21</sub> στο γονίδιο ERα στους συμμετέχοντες στην ομάδα καρκίνου και στην ομάδα ελέγχου παρουσίαζε και εδώ, δυο κορυφές στις επαναλήψεις 9 και 18, με μια χαμηλή κατανομή στις ενδιάμεσες επαναλήψεις αλληλομόρφων, αντίστοιχα (Εικόνα 24).



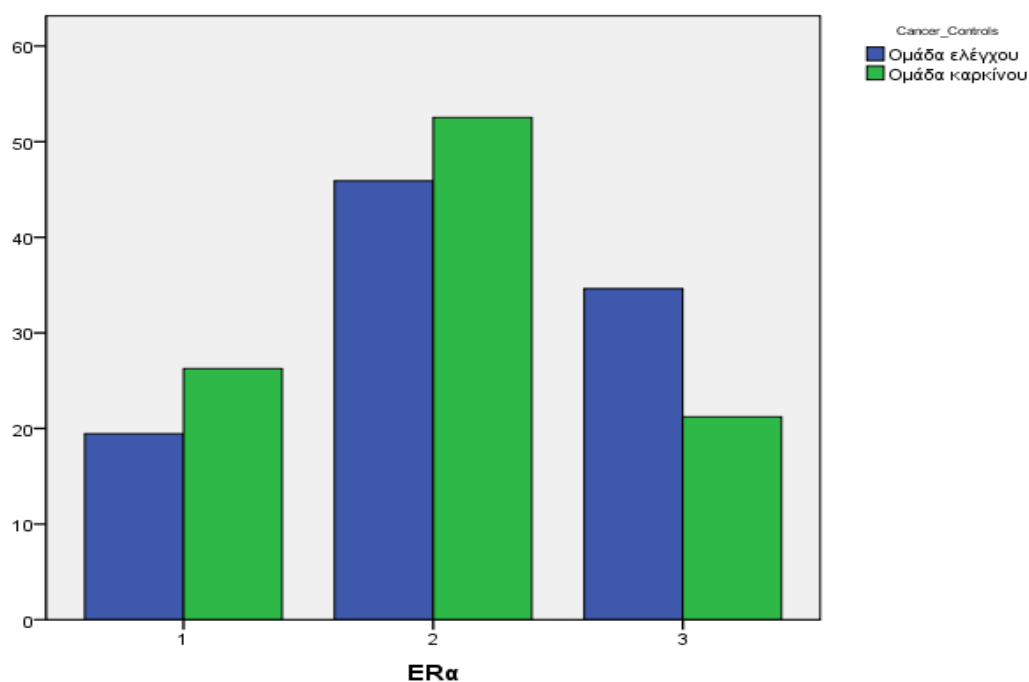
**Εικόνα 24:** Κατανομή (%) αλληλομόρφων ERα στην ομάδα καρκίνου και στην ομάδα ελέγχου.

Ο μέσος όρος των επαναλήψεων -1174 (TA)<sub>4-21</sub> ανάμεσα στις ομάδες καρκίνου και ελέγχου δεν διέφερε σημαντικά (ομάδα καρκίνου:  $12,5 \pm 4,6$ , ομάδα ελέγχου:  $12,4 \pm 4,3$ ,  $p > 0,05$ ). Αντίστοιχα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στον μέσο όρο των επαναλήψεων -1174 (TA)<sub>4-21</sub>, όταν συγκρίθηκαν οι ομάδες βιοψίας και ελέγχου (ομάδα βιοψίας:  $12,2 \pm 4,5$ , ομάδα ελέγχου:  $12,4 \pm 4,3$ ,  $p > 0,05$ ).

Η κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού -1174 (TA)<sub>4-21</sub> στις ομάδες βιοψίας και ελέγχου φαίνονται στην εικόνα 25. Αντίστοιχα, η κατανομή του ίδιου πολυμορφισμού στις ομάδες καρκίνου και ελέγχου φαίνεται στην εικόνα 26.



**Εικόνα 25:** Κατανομή (%) των γονοτύπων ERα στην ομάδα βιοψίας και στην ομάδα ελέγχου. (1: SS, 2: SL, 3: LL)



**Εικόνα 26:** Κατανομή (%) των γονοτύπων ERα στην ομάδα καρκίνου και στην ομάδα ελέγχου. (1: SS, 2: SL, 3: LL)

Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού -1174 (TA)<sub>4-21</sub> (SS, SL,LL) ανάμεσα στους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (ομάδα καρκίνου) και στους μάρτυρες (ομάδα ελέγχου) ( $p<0,05$ ). Επίσης, σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε και στην κατανομή των γονοτύπων του ίδιου πολυμορφισμού ανάμεσα στις ομάδες βιοψίας και ελέγχου (πίνακας 4).

		O.R	p-value	95%CI
<b>1) ERalpha</b>	SS	1		
	SL	0,862	0,613	0,485-1,533
	LL	0,454	0,021	0,232-0,888
<b>2) ERalpha</b>	SS	1		
	SL	0.974	0.913	0.609-1.558
	LL	0.416	0.002	0.240-0.719

**Πίνακας 4:** 1) ORs των ασθενών με προστατικό καρκίνο για το ERα γονίδιο.

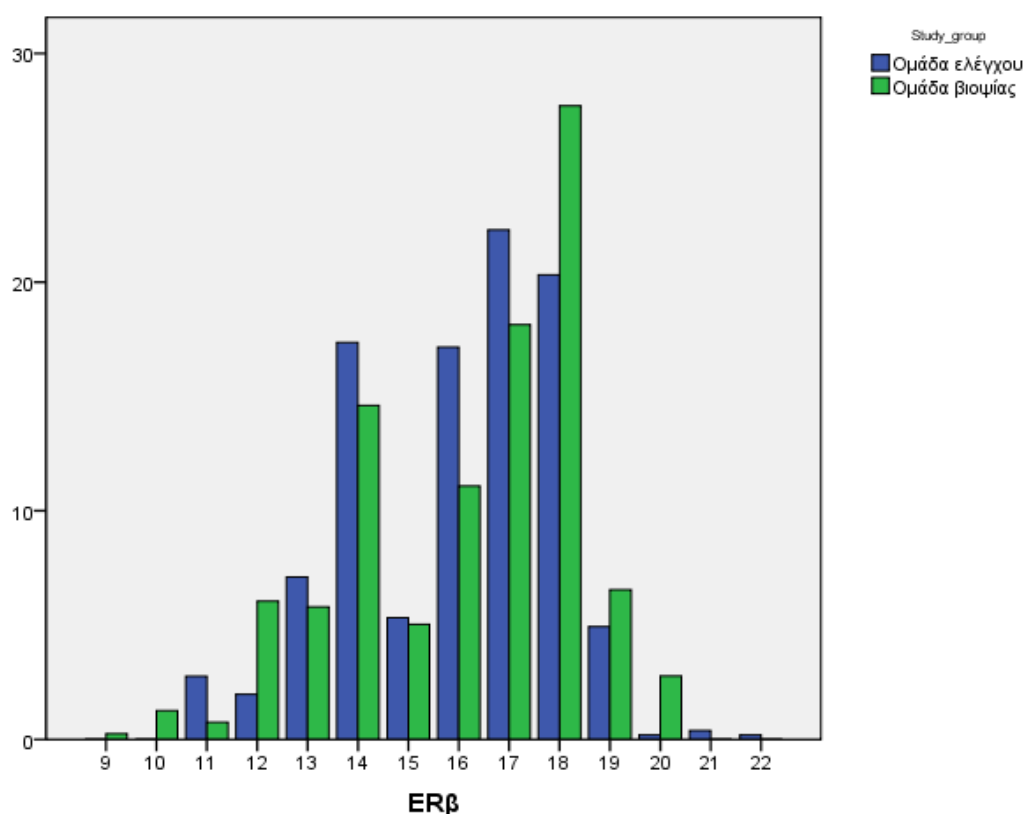
2) ORs για το ERα γονίδιο των υποψηφίων για βιοψία προστάτη.

Όταν τα ORs προσαρμόστηκαν για την ηλικία, κληρονομικό ιστορικό, κάπνισμα και διατροφικές συνήθειες (αυξημένη κατανάλωση κρέατος) παρατηρήθηκε ότι η στατιστικώς σημαντική διαφορά παρέμεινε όσον αφορά την κατανομή του πολυμορφισμού -1174 (TA)<sub>4-21</sub> και μάλιστα, ο γονότυπος LL (ομοζυγωτία για  $\geq 10$  επαναλήψεις) φαίνεται ότι σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη κατά 2,2 φορές σε σχέση με τον SS γονότυπο ( $p=0,02$ , 95% CI=0,198-0,868).

### **Πολυμορφισμός (CA)<sub>n</sub> του γονιδίου ERβ.**

Οι επαναλήψεις CA στο γονίδιο του υποδοχέα των οιστρογόνων β (ERβ) ποίκιλαν από 9 έως 22 επαναλήψεις, με μέσο όρο της τάξης των 17 επαναλήψεων, όταν συγκρίθηκαν οι ομάδες βιοψίας και ελέγχου. Η συχνότητα

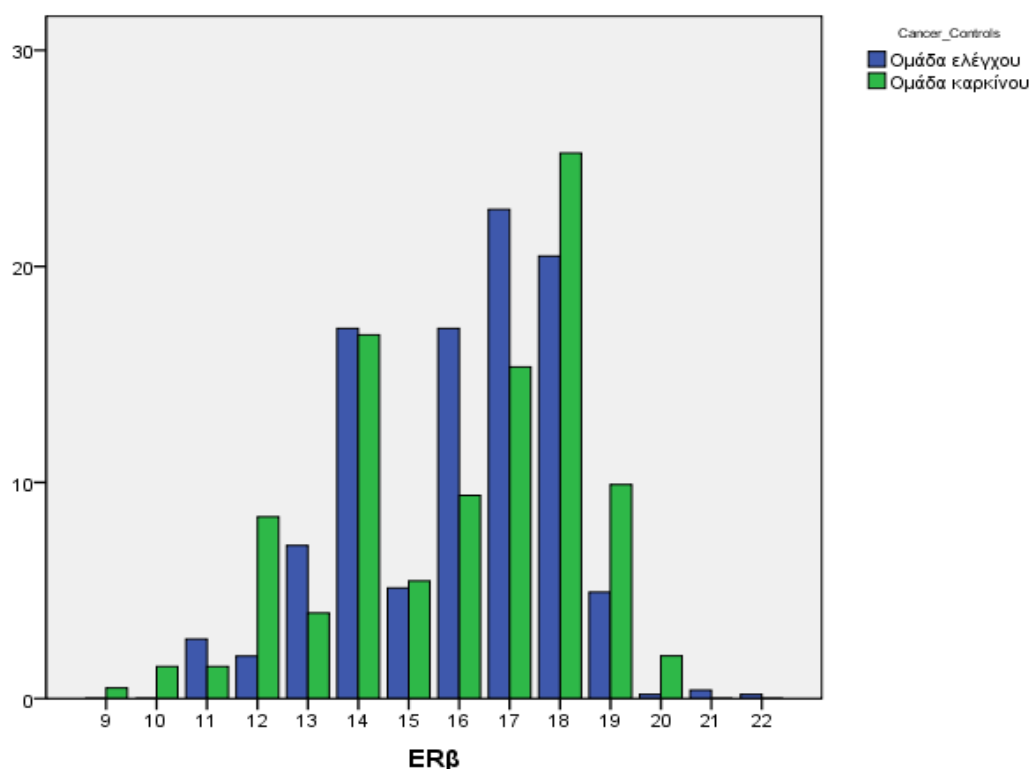
κατανομής του πολυμορφισμού επαναλήψεων του δινουκλεοτιδίου c.1902+3607 (CA)<sub>9-22</sub> στο γονίδιο ERβ στους συμμετέχοντες στην ομάδα βιοψίας και στην ομάδα ελέγχου παρουσίαζε δυο κορυφές στις επαναλήψεις 14 και 16-18 και μια χαμηλή κατανομή στις ενδιάμεσες επαναλήψεις αλληλομόρφων (Εικόνα 27).



**Εικόνα 27:** Κατανομή (%) αλληλομόρφων ERβ στην ομάδα βιοψίας και στην ομάδα ελέγχου.

Αντίστοιχες ήταν και οι συχνότητες της κατανομής για το ERβ, όταν συγκρίθηκαν οι ομάδες καρκίνου και ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα, οι CA επαναλήψεις στο γονίδιο ERβ ποίκιλαν από 9 έως 22 με μέσο μέγεθος της τάξης του 17. Η συχνότητα κατανομής του πολυμορφισμού επαναλήψεων του δινουκλεοτιδίου c.1902+3607 (CA)<sub>9-22</sub> στο γονίδιο ERβ στους συμμετέχοντες στην ομάδα καρκίνου και στην ομάδα ελέγχου παρουσίαζε και εδώ, δυο κορυφές στις επαναλήψεις 14 και 16-18, με μια χαμηλή κατανομή στις ενδιάμεσες επαναλήψεις αλληλομόρφων, αντίστοιχα (Εικόνα 28).

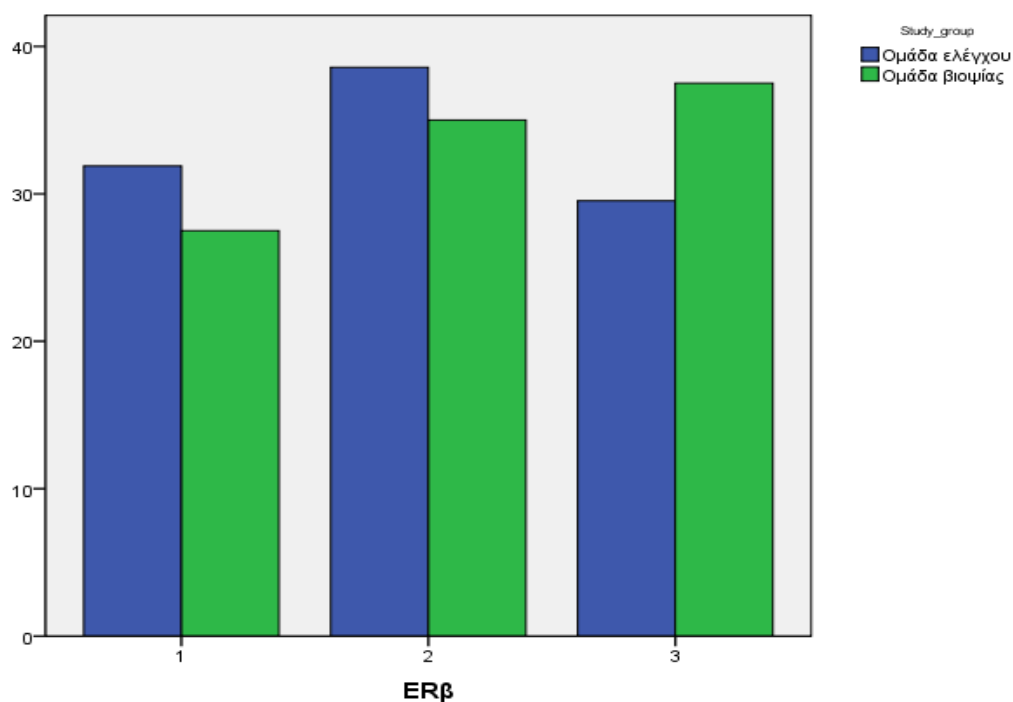




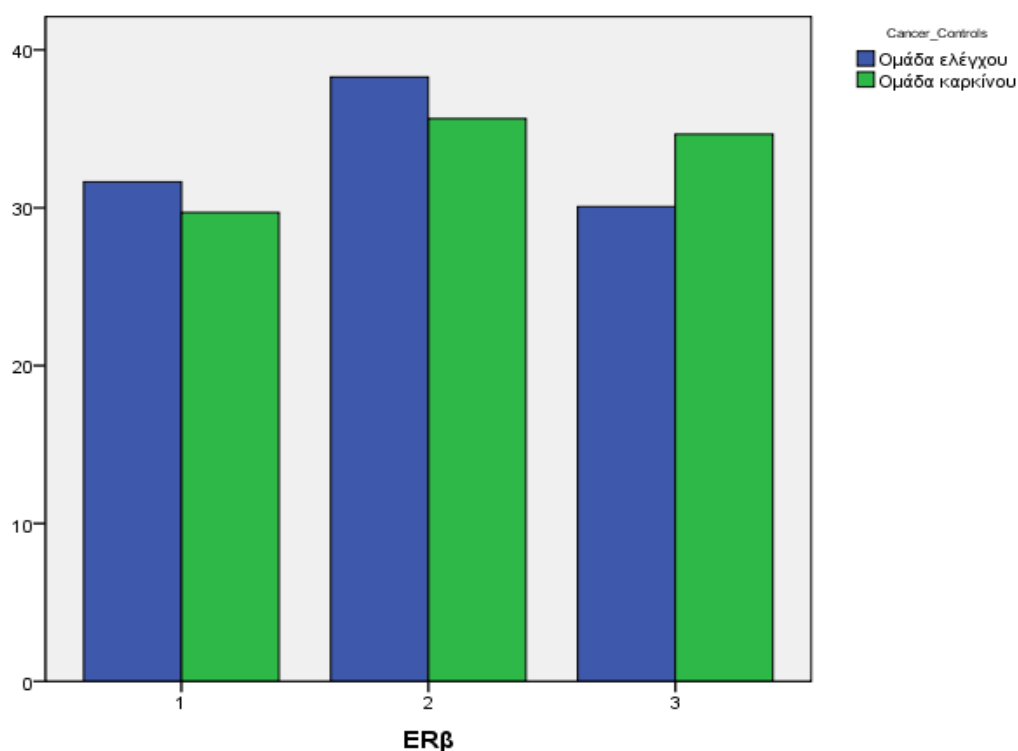
**Εικόνα 28:** Κατανομή (%) αλληλομόρφων ERβ στην ομάδα καρκίνου και στην ομάδα ελέγχου.

Ο μέσος όρος των επαναλήψεων c.1902+3607 (CA)<sub>9-22</sub> ανάμεσα στις ομάδες καρκίνου και ελέγχου δεν διέφερε σημαντικά (ομάδα καρκίνου:  $15,9 \pm 2,445$ , ομάδα ελέγχου:  $12,4 \pm 4,3$ ,  $p > 0,05$ ). Αντίστοιχα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στον μέσο όρο των επαναλήψεων c.1902+3607 (CA)<sub>9-22</sub>, όταν συγκρίθηκαν οι ομάδες βιοψίας και ελέγχου (ομάδα βιοψίας:  $16,15 \pm 2,276$ , ομάδα ελέγχου:  $16 \pm 2,019$ ,  $p > 0,05$ ).

Η κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού c.1902+3607 (CA)<sub>9-22</sub> στις ομάδες βιοψίας και ελέγχου φαίνονται στην εικόνα 29. Αντίστοιχα, η κατανομή του ίδιου πολυμορφισμού στις ομάδες καρκίνου και ελέγχου φαίνεται στην εικόνα 30.



**Εικόνα 29:** Κατανομή (%) των γονοτύπων ERβ στην ομάδα βιοψίας και στην ομάδα ελέγχου.(1: SS, 2: SL, 3: LL)



**Εικόνα 30:** Κατανομή (%) των γονοτύπων ERβ στην ομάδα καρκίνου και στην ομάδα ελέγχου.(1: SS, 2: SL, 3: LL)

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά όσον αφορά την κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού c.1902+3607 (CA)<sup>9-22</sup> (SS, SL,LL) ανάμεσα στους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (ομάδα καρκίνου) και στους μάρτυρες (ομάδα ελέγχου) ( $p>0,05$ ). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων του ίδιου πολυμορφισμού ανάμεσα στις ομάδες βιοψίας και ελέγχου ( $p>0,05$ )(πίνακας 5).

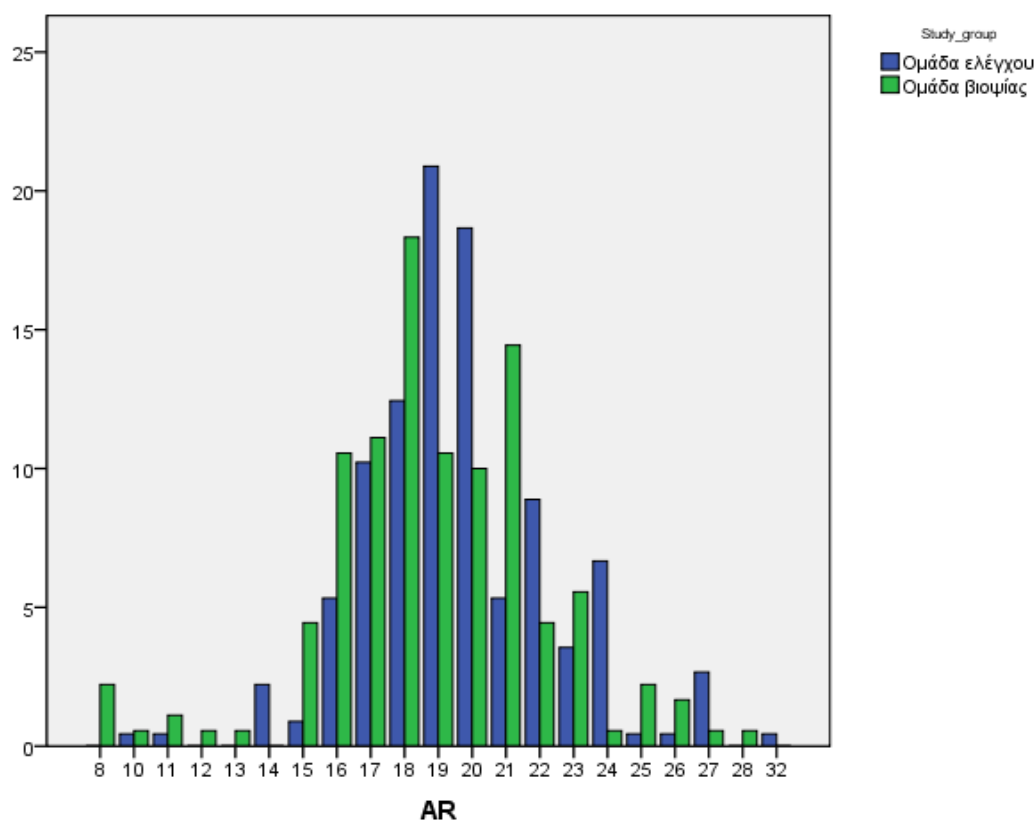
			O.R	p-value	95%CI
1)	ERβ	SS	1		
		SL	0,992	0,977	0,563-1,748
		LL	1,260	0,435	0,705-2,251
2)	ERβ	SS	1		
		SL	1,052	0,829	0,664-1.666
		LL	1,473	0,106	0,922-2,353

**Πίνακας 5:** 1) ORs των ασθενών με προστατικό καρκίνο για το ERβ γονίδιο.

2) ORs για το ERβ γονίδιο των υποψηφίων για βιοψία προστάτη.

### Πολυμορφισμός (CAG)<sub>n</sub> του γονιδίου AR.

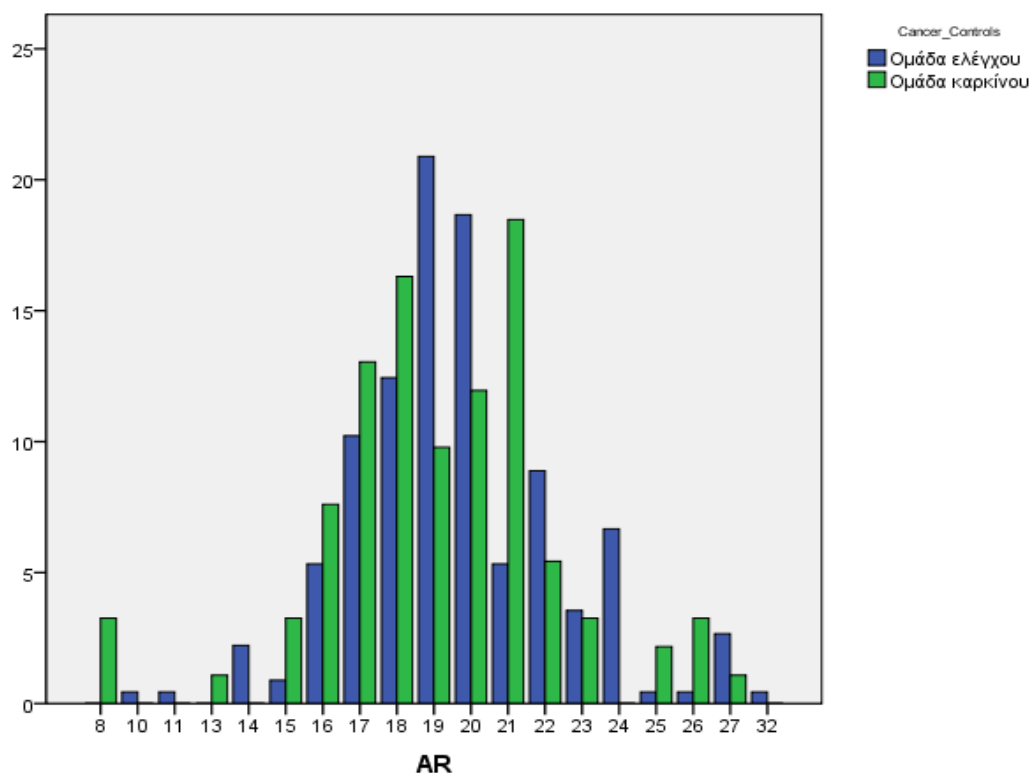
Οι CAG επαναλήψεις στο γονίδιο AR ποίκιλαν από 8 έως 32 όταν συγκρίθηκαν οι ομάδες βιοψίας και ελέγχου, με ένα μέσο μέγεθος της τάξης των 19 επαναλήψεων. Η συχνότητα κατανομής του πολυμορφισμού επαναλήψεων του τρινουκλεοτιδίου c.172 (CAG)<sup>8-32</sup> στο γονίδιο AR στους συμμετέχοντες στην ομάδα βιοψίας και στην ομάδα ελέγχου παρουσίαζε δυο κορυφές στις επαναλήψεις 18-19 και 20-21 και μια χαμηλή κατανομή στις ενδιάμεσες επαναλήψεις αλληλομόρφων (Εικόνα 31).



**Εικόνα 31:** Κατανομή (%) αλληλομόρφων AR στην ομάδα βιοψίας και στην ομάδα ελέγχου.

Αντίστοιχες ήταν και οι συχνότητες της κατανομής για τον AR, όταν συγκρίθηκαν οι ομάδες καρκίνου και ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα, οι CAG επαναλήψεις στο γονίδιο AR ποίκιλαν από 8 έως 32 με μέσο μέγεθος της τάξης των 19 επαναλήψεων. Η συχνότητα κατανομής του πολυμορφισμού επαναλήψεων του τρινουκλεοτιδίου c.172 (CAG)<sub>8-32</sub> στο γονίδιο AR στους συμμετέχοντες στην ομάδα καρκίνου και στην ομάδα ελέγχου παρουσίαζε και εδώ, δυο κορυφές στις επαναλήψεις 18-19 και 20-21, με μια χαμηλή κατανομή στις ενδιάμεσες επαναλήψεις αλληλομόρφων, αντίστοιχα (Εικόνα 32).

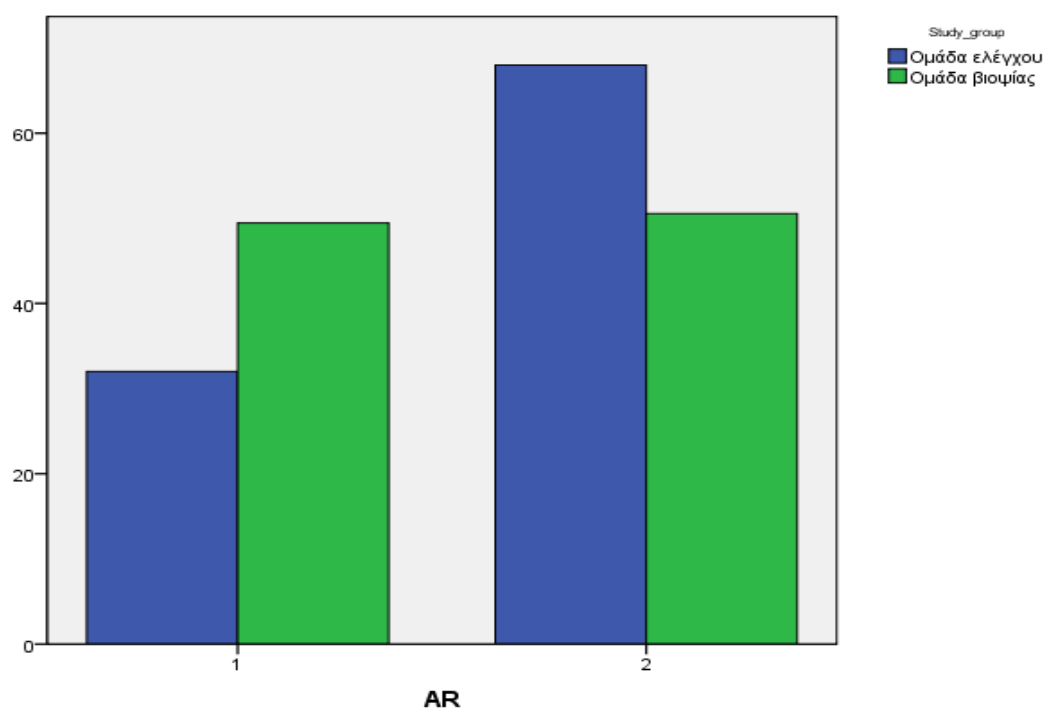
Ο μέσος όρος των επαναλήψεων c.172 (CAG)<sub>8-32</sub> ανάμεσα στις ομάδες βιοψίας και ελέγχου δεν διέφερε σημαντικά (ομάδα καρκίνου:  $18,76 \pm 3,33$ , ομάδα ελέγχου:  $19,65 \pm 2,87$ ,  $p > 0,05$ ). Αντίστοιχα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στον μέσο όρο των επαναλήψεων c.172 (CAG)<sub>8-32</sub>, όταν συγκρίθηκαν οι ομάδες καρκίνου και ελέγχου (ομάδα βιοψίας:  $19,02 \pm 3,36$ , ομάδα ελέγχου:  $12,4 \pm 4,3$ ,  $p > 0,05$ ).



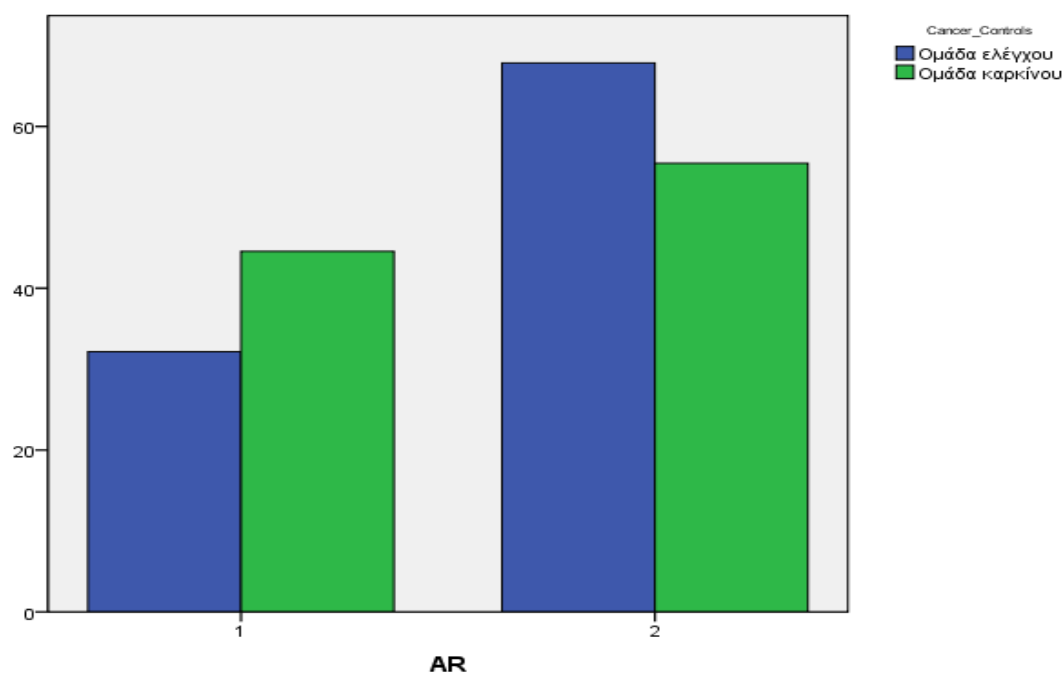
**Εικόνα 32:** Κατανομή (%) αλληλομόρφων AR στην ομάδα καρκίνου και στην ομάδα ελέγχου.

Η κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού c.172 (CAG)<sub>8-32</sub> στις ομάδες βιοψίας και ελέγχου φαίνονται στην εικόνα 33. Αντίστοιχα, η κατανομή του ίδιου πολυμορφισμού στις ομάδες καρκίνου και ελέγχου φαίνεται στην εικόνα 34.

Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού c.172 (CAG)<sub>8-32</sub> (SS, SL,LL) ανάμεσα στους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (ομάδα καρκίνου) και στους μάρτυρες (ομάδα ελέγχου) ( $p < 0,05$ ). Επίσης, σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε και στην κατανομή των γονοτύπων του ίδιου πολυμορφισμού ανάμεσα στις ομάδες βιοψίας και ελέγχου (πίνακας 6).



**Εικόνα 33:** Κατανομή (%) των γονοτύπων AR στην ομάδα βιοψίας και στην ομάδα ελέγχου. (1:S, 2:L)



**Εικόνα 34:** Κατανομή (%) των γονοτύπων AR στην ομάδα καρκίνου και στην ομάδα ελέγχου. (1: S, 2: L)

			O.R	p-value	95%CI
1)	AR	S	1		
		L	0,585	0,035	0,356-0,963
2)	AR	S	1		
		L	0,481	0,001	0,321-0,721

**Πίνακας 6:** 1) ORs των ασθενών με προστατικό καρκίνο για το AR γονίδιο.

2) ORs για το AR γονίδιο των υποψηφίων για βιοψία προστάτη.

Όταν τα ORs προσαρμόστηκαν για την ηλικία, κληρονομικό ιστορικό, κάπνισμα και διατροφικές συνήθειες (αυξημένη κατανάλωση κρέατος) η στατιστικώς σημαντική διαφορά διατηρήθηκε όσον αφορά την κατανομή του πολυμορφισμού c.172 (CAG)<sup>8-32</sup>. Πιο συγκεκριμένα, ο γονότυπος L ( $\geq 19$  επαναλήψεις) φαίνεται ότι σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη κατά 1,7 φορές σε σχέση με τον S γονότυπο ( $< 19$  επαναλήψεις, OR:0,585, 95% CI: 0,356-0,963,  $p=0,035$ ).

Τέλος, όταν μελετήθηκαν οι παραπάνω πολυμορφισμοί σε σχέση με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του καρκίνου, δεν αναδείχθηκε κάποια σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον καρκίνο και το Gleason score (πίνακας 7).

Η κατανομή των συχνοτήτων για τους γονότυπους SS, SL και LL των γονιδίων ER $\alpha$ , ER $\beta$  και AR ήταν σύμφωνη με τα κριτήρια της ισορροπίας κατά Hardy-Weinberg.

	AR	ERα	ERβ	UGT1A1
<b>Gleason score</b>	p=0,28	p=0,6	p=0,9	p=0,38

**Πίνακας 7:** Συσχέτιση πολυμορφισμών και ιστολογικού χαρακτήρα των όγκων ασθενών με καρκίνο του προστάτη (Gleason score)

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ορμονοεξαρτώμενος καρκίνος. Οι στεροειδείς ορμόνες και κυρίως η τεστοστερόνη και η διυδροτεστοστερόνη (DHT), παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της νόσου, ασκώντας τη δράση τους μέσω των ειδικών υποδοχέων τους. Ο ανδρογονικός υποδοχέας στο μεταγραφικό του τμήμα παρουσιάζει μια εξαιρετικά πολυμορφική περιοχή τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων (CAG)<sub>n</sub>, το μήκος της οποίας κυμαίνεται από 11 έως 31 επαναλήψεις (88,89). Μεγαλύτερο μήκος CAG επαναλήψεων σχετίζεται με μειωμένη μεταγραφική ικανότητα και συγγένεια για τη σύνδεση του υποδοχέα με τα ανδρογόνα, γεγονός που πιθανά δρα προστατευτικά για το προστατικό κύτταρο έναντι του καρκίνου (199,245-248). Αντίθετα, η αυξημένη μεταγραφική ικανότητα και σύνδεση με τα ανδρογόνα των βραχύτερων πολυμορφικών περιοχών σχετίζεται με χρόνια υπερέκθεση στα ανδρογόνα και πιθανά με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης προστατικού καρκίνου (249,250).

Στηριζόμενοι στην παραπάνω παραδοχή αρκετές μελέτες προσπάθησαν να συνδέσουν τον αριθμό των πολυμορφικών CAG επαναλήψεων με τον καρκίνο του προστάτη, με αντικρουόμενα, όμως, αποτελέσματα. Οι Ingles et al. σε μια μελέτη συσχέτισης με 57 ασθενείς μη Ισπανικής προέλευσης (non-Hispanic) με καρκίνο του προστάτη και 169 υγιείς άνδρες έδειξαν ότι όσοι ασθενείς είχαν λιγότερες από 20 επαναλήψεις παρουσίαζαν αυξημένο κίνδυνο



για ανάπτυξη προστατικού καρκίνου σε σχέση με όσους έφεραν 20 ή παραπάνω από 20 επαναλήψεις. Οι συγγραφείς μάλιστα καταλήγουν ότι τα βραχύτερα αλληλία σχετίζονταν με πιο επιθετικές μορφές καρκίνου (209).

Σε μια ακόμα μελέτη συσχέτισης με 587 ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και 588 υγιείς μάρτυρες, οι Gionannuci et al. βρήκαν ότι άνδρες με λιγότερες από 18 επαναλήψεις είχαν αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου σε σχέση με όσους είχαν πάνω από 26 επαναλήψεις (208). Σε ανάλογα συμπεράσματα κατέληξαν και οι Stanford et al. σε μια μελέτη συσχέτισης ασθενών/υγιών, όπου σύγκριναν 257 ασθενείς με 250 υγιείς μάρτυρες- όσοι είχαν < 22 επαναλήψεις είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο καρκίνου σε σχέση με όσους είχαν  $\geq 22$  επαναλήψεις (214). Τέλος, σε μια μελέτη με 190 Κινέζους ασθενείς και 304 υγιείς μάρτυρες, όσοι παρουσίαζαν < 23 επαναλήψεις είχαν και αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου (251).

Από την άλλη, υπάρχουν μελέτες που δεν κατάφεραν να αποδείξουν πιθανή συσχέτιση μεταξύ των CAG πολυμορφισμών και του κινδύνου για προστατικό καρκίνο. Οι Bratt et al. σύγκριναν Σουηδούς ασθενείς με καρκίνο του προστάτη καταλήγοντας σε αρνητική συσχέτιση, κάτι που ήρθε να επιβεβαιώσει και μια μελέτη από τους Li et al., οι οποίοι σύγκριναν 118 Σουηδούς ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, 33 Ιάπωνες και 141 υγιείς μάρτυρες. Ομοίως, αντίστοιχες μελέτες σε Ευρωπαίους Καυκάσιους ασθενείς (Αυστριακούς, Γάλλους και Γερμανούς) έδειξαν ότι ο κίνδυνος για καρκίνο του προστάτη δεν σχετίζεται με το μήκος των CAG επαναλήψεων (206,212,252,253).

Στην παρούσα μελέτη βρήκαμε ότι τα άτομα της ομάδας βιοψίας έφεραν περισσότερες τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις CAG στον ανδρογονικό υποδοχέα ( $\geq 19$  επαναλήψεις) σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (OR:0,481, 95% CI: 0,321-0,721,  $p=0,001$ ). Όταν απομονώσαμε από την ομάδα αυτή τα άτομα που παρουσίασαν θετική βιοψία προστάτη-κατά συνέπεια καρκίνο- βρήκαμε ότι οι φέροντες περισσότερες επαναλήψεις CAG εμφάνιζαν 1,7 φορές μικρότερη πιθανότητα για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (OR:0,585, 95% CI: 0,356-0,963,  $p=0,035$ ). Η παρατήρηση αυτή έρχεται να συμφωνήσει με τις μελέτες που έδειξαν θετική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των CAG επαναλήψεων και του κινδύνου για καρκίνο του προστάτη - και μάλιστα, υποστηρίζεται η υπόθεση

ότι όσοι φέρουν λιγότερες επαναλήψεις έχουν αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν προστατικό καρκίνο. Η πιθανή εξήγηση για το γεγονός αυτό είναι, όπως παρουσιάστηκε παραπάνω, η αυξημένη μεταγραφική ικανότητα των βραχέων αλληλομόρφων, η αυξημένη σύνδεση των ανδρογόνων με τον ανδρογονικό υποδοχέα και κατά συνέπεια, ο αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός των προστατικών κυττάρων, που σηματοδοτεί την έναρξη της καρκινογένεσης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι όταν οι πολυμορφισμοί του ανδρογονικού υποδοχέα μελετήθηκαν σε συνάρτηση με τα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του προστατικού καρκίνου, όπως η κληρονομικότητα, οι διατροφικές συνήθειες και το κάπνισμα, η στατιστική σημαντικότητα παρέμεινε αμετάβλητη ( $p < 0,05$ ), ενισχύοντας ακόμα περισσότερο την παρατήρηση ότι το μήκος των CAG επαναλήψεων παίζει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του προστάτη. Παρόλα αυτά, όταν επιχειρήσαμε να συσχετίσουμε τους πολυμορφισμούς στον ανδρογονικό υποδοχέα με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του προστατικού καρκίνου (Gleason score), δεν καταφέραμε να αναδείξουμε κάποια θετική συσχέτιση, σε αντίθεση με κάποιες μελέτες που υποστηρίζουν ότι μικρότερος αριθμός επαναλήψεων σχετίζεται με πιο επιθετικούς ή/και προχωρημένους καρκίνους (254,255).

Εκτός από τα ανδρογόνα, σημαντικό ρόλο στην προστατική καρκινογένεση φαίνεται ότι παίζουν και τα οιστρογόνα. Η δράση τους επιτυγχάνεται είτε μέσω των υποδοχέων τους (ERα και ERβ), είτε μέσω των τοξικών μεταβολιτών τους και την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Και στις δυο περιπτώσεις, πολυμορφισμοί που αλλοιώνουν την μεταγραφική ικανότητα των γονιδίων που εμπλέκονται στους παραπάνω μηχανισμούς δράσης έχουν ενοχοποιηθεί για πιθανή σύνδεσή τους με τον καρκίνο του προστάτη.

Πράγματι, αρκετές μελέτες προσπάθησαν να αποδείξουν την θετική συσχέτιση διαφόρων πολυμορφισμών του ERα με την προστατική καρκινογένεση, με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Οι Cussenot et al. παρατήρησαν ότι όσοι Καυκάσιοι έφεραν τον GGGA πολυμορφισμό παρουσίαζαν μεγαλύτερο κίνδυνο να παρουσιάσουν καρκίνο του προστάτη (220,226), όπως και όσοι, σύμφωνα με τους McIntyre et al., είχαν 24 και 25 (TA) δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις (222). Από την άλλη, οι Cancel-Tassin et

al. δεν παρατήρησαν κάποια συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού Ex1+392T.C με τον καρκίνο του προστάτη (220), όπως και οι Modugno et al., δεν κατάφεραν να συνδέσουν τους PvuII (rs2234693) και XbaI (rs9340799) πολυμορφισμούς με τον κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου (256).

Πολυμορφισμοί του αριθμού του (TA) δινουκλεοτιδίου στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου του ERα έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να αλλοιώσουν την δράση του ERα υποδοχέα. Στους Καυκάσιους, η συχνότητα των συγκεκριμένων πολυμορφισμών παρουσιάζει στατιστικά δυο κορυφές, η μία στις 14 επαναλήψεις και η άλλη στις 23 επαναλήψεις. Στη δική μας μελέτη, η κατανομή των αλληλομόρφων παρουσίασε, επίσης, δυο κορυφές, στις 9 και στις 18 επαναλήψεις, αντίστοιχα. Οι περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες σύγκριναν τα βραχεία με τα μακριά αλληλόμορφα, ορίζοντας τα με ποικίλους τρόπους. Πρόσφατες μελέτες έχουν συσχετίσει την παρουσία του LL γονότυπου των (TA) επαναλήψεων με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου (257,258), αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη οστεοαρθρίτιδας (259), μειωμένη οστική πυκνότητα και αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων (260) καθώς και μειωμένο κίνδυνο για ενδομητρίωση (261,262).

Στην παρούσα μελέτη, για τον ERα ορίσαμε ως βραχεία, όσα αλληλόμορφα είχαν λιγότερες από 10 (TA) επαναλήψεις, ενώ για τον ERβ, όσα είχαν λιγότερες από 17 (CA) επαναλήψεις. Τα άτομα της ομάδας βιοψίας βρέθηκαν να έχουν τον γονότυπο LL (ομοζυγωτία για τα μακριά αλληλόμορφα) σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (OR:0,416, 95% CI: 0,240-0,719,  $p=0,002$ ). Όταν απομονώσαμε από την ομάδα αυτή τα άτομα που παρουσίασαν καρκίνο του προστάτη βρήκαμε ότι οι φέροντες τον LL γονότυπο εμφάνιζαν 2,2 φορές μικρότερο κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (OR:0,454, 95% CI: 0,232-0,888,  $p=0,02$ ). Όταν τα ORs προσαρμόστηκαν για τα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του καρκίνου του προστάτη, ο κίνδυνος αυτός μειώθηκε ακόμα περισσότερο (2,44 φορές, OR:0,415, 95% CI: 0,198-0,868,  $p=0,02$ ). Το γεγονός αυτό πιθανά να οφείλεται στο ότι τα μακριά αλληλόμορφα οδηγούν σε μειωμένη έκφραση του ERα γονιδίου, μειωμένη μεταγραφική ικανότητα και κατά συνέπεια, στη μειωμένη δράση του. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο ERα επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την φλεγμονή και τον καρκίνο, τα αποτελέσματα της μελέτης μας έρχονται να επιβεβαιώσουν την παραπάνω

θεωρία, αφού αποδεικνύουν ότι τα μακριά αλληλόμορφα σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο για προστατικό καρκίνο.

Σε αντίθεση με τον ERα, οι πολυμορφισμοί του ERβ δεν είναι αρκετά μελετημένοι. Οι λίγες μελέτες πάνω στο θέμα αναφέρονται σε μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) και λιγότερο σε πολυμορφισμούς επανάληψης νουκλεοτιδίων (STRP), καθιστώντας ουσιαστικά τη μελέτη μας από τις πρώτες που ασχολούνται με πολυμορφισμούς μήκους του γονιδίου. Μέχρι τώρα, οι Sun et al. έδειξαν ότι οι rs3829768 (A/G) και rs1271572 (C/A) στην περιοχή του υποκινητή του ERβ γονιδίου σχετίζονται με μειωμένη πιθανότητα για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη (223), ενώ μελέτη στη Σουηδία έδειξε πιθανή θετική συσχέτιση μεταξύ του rs2987983 (T/C) πολυμορφισμού στην περιοχή του υποκινητή του ERβ γονιδίου και προστατικού καρκίνου (224). Βέβαια, ο έλεγχος διαφόρων πολυμορφισμών στο ERβ γονίδιο και η σύνδεσή τους με τον προστατικό καρκίνο δεν συνοδεύονταν πάντα από θετικά αποτελέσματα, όπως αποδεικνύεται σε μελέτες με απουσία ή αρνητική συσχέτιση των πολυμορφικών CA επαναλήψεων με τον συγκεκριμένο καρκίνο (221,222).

Οι πολυμορφισμοί του μήκους του (CA) δινουκλεοτιδίου στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου έχουν συσχετιστεί με διαταραχές στην έκφραση του γονιδίου και κατά συνέπεια, με αρκετές παθήσεις. Έτσι, περισσότερες επαναλήψεις έχουν συσχετιστεί με μειωμένα επίπεδα τεστοστερόνης και αυξημένα επίπεδα της SHBG πρωτεΐνης σε γυναίκες (263), αυξημένο κίνδυνο για οστεοαρθρίτιδα (262), μειωμένη οστική πυκνότητα (264,265), αυξημένη αρτηριακή πίεση (266) και ηπιότερα συμπτώματα εμμήνου ρύσης στις γυναίκες (267). Αντίθετα, δεν φάνηκε να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του ενδομητρίου σε μια μελέτη, όπου ως μακριά αλληλόμορφα ορίστηκαν όσα είχαν περισσότερες από 22 (CA) δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις (268).

Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των δινουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (CA) του ERβ με τον καρκίνο του προστάτη. Σε όσα άτομα είχαν ένδειξη και υποβλήθηκαν σε βιοψία του προστάτη φάνηκε ότι η κατανομή των γονοτύπων SS, SL και LL δεν διέφερε σημαντικά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (OR(SL):1,052, 95% CI: 0,664-1,666,  $p=0,829$  και OR (LL):1,473, 95% CI: 0,922-2,353,  $p=0,106$ ).

Αντίστοιχα, όταν έγινε σύγκριση ανάμεσα στην ομάδα με καρκίνο του προστάτη και στην ομάδα ελέγχου δεν αναδείχθηκε σημαντική διαφορά στην κατανομή των παραπάνω γονοτύπων (OR(SL):0,992, 95% CI: 0,563-1,748,  $p=0,977$  και OR (LL):1,260, 95% CI: 0,705-2,251,  $p=0,435$ ). Αν και οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς στον καρκίνο του προστάτη, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι οι πολυμορφισμοί των (CA) δινουκλεοτιδίων του οιστρογονικού υποδοχέα  $\beta$  δεν φαίνεται να επηρεάζουν τον κίνδυνο για ανάπτυξη προστατικού καρκίνου.

Από την άλλη, όταν οι πολυμορφισμοί του αριθμού των επαναλαμβανόμενων (TA) και (CA) δινουκλεοτιδίων του οιστρογονικού υποδοχέα  $\alpha$  και  $\beta$  αντίστοιχα, μελετήθηκαν για πιθανή σύνδεσή τους με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του προστατικού καρκίνου, δεν παρατηρήθηκε κάποια ιδιαίτερη συσχέτιση. Πράγματι, η μελέτη μας δεν ανέδειξε κάποια στατιστική σημαντικότητα για τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς και το Gleason score των προστατικών όγκων ( $p=0,6$  και  $p=0,9$  για τον ER $\alpha$  και τον ER $\beta$  αντίστοιχα). Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και λαμβάνοντας υπόψη ότι το Gleason score αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του προστάτη, φαίνεται ότι η δράση των οιστρογονικών υποδοχέων και κατ' επέκταση των οιστρογόνων, δεν αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της πορείας της νόσου. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί και με διάφορες μελέτες που έχουν δείξει ότι δεν υπάρχει συσχετισμός μεταξύ των κυκλοφορούντων οιστρογόνων και της επιθετικότητας του προστατικού καρκίνου (269).

Είναι πλέον κοινώς αποδεκτό ότι τα οιστρογόνα μπορούν να ασκήσουν καρκινογόνο δράση μέσω της δημιουργίας τοξικών μεταβολιτών, όπως οι ημικινόνες και οι κινόνες. Η έγκαιρη αδρανοποίηση των συγκεκριμένων ουσιών μέσω γλυκουρονοποίησης, σε αντίθεση με άλλους ιστούς και ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους, δεν έχει μελετηθεί στον καρκίνο του προστάτη. Οι περισσότερες μελέτες εστιάζονται στην γλυκουρονοποίηση των ανδρογόνων και την δράση των ενζύμων της UGT2B ομάδας, εντούτοις η δράση του UGT1A1 ενζύμου έχει αποδειχθεί στον μεταβολισμό των οιστρογόνων, τόσο στο ήπαρ, που αποτελεί και τον κύριο ιστό δράσης του, όσο και σε άλλους ιστούς, όπως ο μαστός και ο προστάτης αδένας (270,271). Πολυμορφισμοί επαναλαμβανόμενων (TA)η δινουκλεοτιδίων στην περιοχή

του υποκινητή του UGT1A1 γονιδίου, η οποία φυσιολογικά αποτελείται από 6 (TA) επαναλήψεις, μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση της έκφρασής του και κατά συνέπεια, της δράσης του UGT1A1 ενζύμου. Υπάρχει μάλιστα, μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των (TA) επαναλήψεων και της μεταγραφικής ικανότητας του UGT1A1 (187,227,272). Λιγότερες επαναλήψεις (<6) σχετίζονται με αυξημένη δραστηριότητα, ενώ περισσότερες επαναλήψεις (>6) σχετίζονται με μειωμένη μεταγραφική ικανότητα (180). Έτσι, οι (TA)7 πολυμορφισμοί έχουν σαν αποτέλεσμα την αυξημένη παραμονή των τοξικών μεταβολιτών των οιστρογόνων στον προστάτη, γεγονός που δυνητικά θα μπορούσε να αποτελέσει το έναυσμα για καρκινογένεση.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν και οι πολυμορφισμοί του UGT1A1 ενζύμου, που αποτελεί το κύριο ένζυμο γλυκουρονοποίησης των μεταβολιτών των οιστρογόνων και στον προστάτη αδένα. Το σκεπτικό μας στηρίχτηκε στην υπόθεση ότι ενδεχόμενη μεταβολή του μηχανισμού της γλυκουρονοποίησης, η οποία αδρανοποιεί τα οιστρογόνα απευθείας στα όργανα-στόχους, μπορεί δυνητικά να μεταβάλει την ιστική συγκέντρωση των οιστρογόνων και συνεπώς, να επηρεάσει τον μηχανισμό της καρκινογένεσης. Πράγματι, έχει βρεθεί σε λειτουργικές μελέτες της δραστηριότητας της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου ότι ο TA(7)/TA(7) γονότυπος σχετίζεται με 30% μείωση της μεταγραφικής του ικανότητας και συνεπώς, με μείωση της έκφρασης και της δράσης του UGT1A1 ενζύμου (180). Επιπλέον, διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι όσοι φέρουν τουλάχιστον ένα TA(7) αλληλίο παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα για γλυκουρονοποίηση σε σχέση με αυτούς που φέρουν ακόμα και ομοζυγωτία για το φυσιολογικό TA(6) αλληλίο (185,273).

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης της παρουσίας του TA(7) αλληλίου και του κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι οι ασθενείς με προστατικό καρκίνο έχουν 1,3 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να φέρουν τον TA(7)/TA(7) γονότυπο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και 1,48 φορές αυξημένη πιθανότητα να φέρουν τουλάχιστον ένα TA(7) αλληλίο. Παρόλα αυτά, δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των ασθενών αυτών και του κινδύνου για καρκίνο του προστάτη ( $p=0,34$ ). Η συχνότητα του TA(7) αλληλίου ήταν 35,5% στην ομάδα ελέγχου, ενώ η συχνότητα του TA(7)/TA(7)

γονοτύπου στην ίδια ομάδα ήταν 17%. Οι τιμές αυτές συμφωνούν με τις αντίστοιχες άλλων μελετών σε Καυκάσιους ασθενείς (183,274,275).

Επιπλέον, διερευνήσαμε την πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στον TA(7)/TA(7) γονότυπο και στο Gleason score των ασθενών με καρκίνο του προστάτη. Το ποσοστό των ασθενών που είχαν Gleason score < 7 ήταν 36,6%, για όσους είχαν 7 ήταν 37,6% και για όσους είχαν Gleason score > 7 το ποσοστό ήταν 25,8%. Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση ανάμεσα στην κατανομή του (TA)7 πολυμορφισμού και του Gleason score, επιβεβαιώνοντας, μέσω ενός άλλου μηχανισμού μιτογόνου δράσης των οιστρογόνων, την θεωρία ότι τα οιστρογόνα δεν αποτελούν τους ρυθμιστές της επιθετικότητας και της πορείας της νόσου.

Η παρούσα μελέτη χαρακτηρίζεται από πολλά 'ισχυρά στατιστικά' σημεία. Ένα από αυτά αποτελεί το γεγονός ότι περιλαμβάνει ομοιογενή πληθυσμό, αφού όλοι οι συμμετέχοντες ήταν Καυκάσιοι Έλληνες, μόνιμοι κάτοικοι της Κεντρικής Ελλάδας. Αυτό είναι πολύ σημαντικό γιατί σε περίπτωση που υπήρχαν κάποιες φυλετικές ή εθνικές διαφορές ανάμεσα στους ασθενείς και/ή στους μάρτυρες, φαινομενικοί συσχετισμοί ανάμεσα σε συγκεκριμένα αλληλόμορφα και τη νόσο θα μπορούσαν να αλλοιώσουν τη στατιστική ανάλυση. Επίσης, η ύπαρξη λεπτομερούς ερωτηματολογίου μας έδωσε πλήθος πληροφοριών και μας επέτρεψε να αναγνωρίσουμε και άλλες μεταβλητές-δυννητικούς παράγοντες πρόκλησης του προστατικού καρκίνου. Μάλιστα, το μέγεθος της στατιστικής σημαντικότητας ανάμεσα στους μικροδορυφορικούς πολυμορφισμούς επαναλήψεων των γονιδίων ERα και AR και στον καρκίνο του προστάτη διατηρήθηκε ακόμα και μετά την προσαρμογή σε πολλαπλούς παράγοντες κινδύνου όπως η ηλικία, το κληρονομικό ιστορικό, το κάπνισμα και οι διατροφικές συνήθειες.

Ένα επιπλέον σημαντικό 'στατιστικό' κριτήριο για την ένταξη στη μελέτη αποτέλεσε και η αυστηρή επιλογή των συμμετεχόντων στην ομάδα ελέγχου. Όλοι οι υποψήφιοι θα έπρεπε να είχαν ελεύθερο οικογενειακό ιστορικό για καρκίνο του προστάτη, αρνητικό για κακοήθεια ατομικό αναμνηστικό και κανένα ίχνος προστατικού καρκίνου κατά τη φυσική εξέταση, αλλά και τις απεικονιστικές εξετάσεις. Το πιο σημαντικό ίσως κριτήριο ένταξης, αποτέλεσε η τιμή του PSA των συμμετεχόντων. Σε μια κατανομή ηλικιών ( $69,32 \pm 5,59$  για την ομάδα ελέγχου) όπου η πιθανότητα για καρκίνο του προστάτη, είτε είναι

λανθάνων, είτε υποκλινικός, είναι αρκετά υψηλή, επιλέξαμε αυτούς που είχαν  $PSA \leq 1 \text{ ng/ml}$ , αφού στις τιμές αυτές η πιθανότητα για την ύπαρξη καρκίνου είναι πολύ μικρή ( $<10\%$ ) (244). Με τον τρόπο αυτό, ελαχιστοποιήσαμε τις πιθανότητες για σημαντικό στατιστικό λάθος της μελέτης μας, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων μας.

Συμπερασματικά, η παρούσα διατριβή δείχνει έναν σημαντικό συσχετισμό ανάμεσα στους πολυμορφισμούς επαναλήψεων c.172 (CAG)<sup>8-32</sup> και -1174 (TA)<sup>4-21</sup> των γονιδίων του AR και του ERα και του κινδύνου για την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη σε συγκεκριμένο Ελληνικό πληθυσμό. Αντίθετα, οι πολυμορφισμοί επαναλήψεων c.1902+3607 (CA)<sup>9-22</sup> του ERβ, αλλά και οι (TA)<sup>n</sup> πολυμορφισμοί του γονιδίου UGT1A1 φάνηκαν να μην έχουν κάποια σχέση με τον κίνδυνο για προστατικό καρκίνο. Επιπλέον, κανείς πολυμορφισμός από τα τέσσερα γονίδια που μελετήθηκαν δεν φάνηκε να σχετίζεται με την επιθετικότητα ή με την πρόοδο της νόσου, αφού δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση με το Gleason score των όγκων των ασθενών που πήραν μέρος στη μελέτη. Επιπρόσθετες μελέτες είναι αναγκαίες προκειμένου να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα για το κατά πόσο οι πολυμορφισμοί επαναλήψεων των γονιδίων AR, ERα, ERβ και UGT1A1 παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστατική καρκινογένεση.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την ανάλυση των δεδομένων της παρούσας μελέτης μπορούν να εξαχθούν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Μεγάλου μήκους (CAG) επαναλήψεις του AR γονιδίου ( $L, \geq 19$  επαναλήψεις) έχουν προστατευτικό ρόλο και άτομα που υποβάλλονται σε βιοψία προστάτη έχουν 2x φορές μικρότερη πιθανότητα να πάσχουν από καρκίνο του προστάτη.
- Μεγάλου μήκους (TA) επαναλήψεις του ERα γονιδίου ( $LL, \geq 10$  επαναλήψεις) έχουν προστατευτικό ρόλο και άτομα που υποβάλλονται σε βιοψία προστάτη έχουν 2,4x φορές μικρότερο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη.
- Όσοι άνδρες φέρουν μεγάλου μήκους αλληλόμορφα για τις (CAG) επαναλήψεις του AR γονιδίου ( $L, \geq 19$  επαναλήψεις) παρουσιάζουν 1,7x φορές μικρότερο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη.
- Όσοι άνδρες φέρουν ομοζυγωτία για μεγάλου μήκους αλληλόμορφα για τις (TA) επαναλήψεις του ERα γονιδίου ( $LL, \geq 10$  επαναλήψεις) παρουσιάζουν 2,2x φορές μικρότερο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη.
- Οι πολυμορφισμοί των (CA) επαναλήψεων του ERβ γονιδίου δεν φαίνεται να επηρεάζουν τον κίνδυνο για την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη.
- Οι πολυμορφισμοί των (TA) επαναλήψεων της περιοχής του υποκινητή του UGT1A1 γονιδίου και πιο συγκεκριμένα ο TA(7)/TA(7) γονότυπος, δεν φαίνεται να επηρεάζουν τον κίνδυνο για την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη.
- Τόσο οι πολυμορφισμοί του AR και του ERα γονιδίου, όσο και οι πολυμορφισμοί του ERβ και του UGT1A1 γονιδίου δεν φαίνεται να σχετίζονται με την επιθετικότητα και την πορεία της νόσου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ορμονοεξαρτώμενος καρκίνος. Οι στεροειδείς ορμόνες, κύρια η τεστοστερόνη και η διυδροτεστοστερόνη (DHT), παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της νόσου, ασκώντας τη δράση τους μέσω των ειδικών υποδοχέων τους. Ο ανδρογονικός υποδοχέας (AR) στο μεταγραφικό του τμήμα παρουσιάζει μια εξαιρετικά πολυμορφική περιοχή τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων CAG, το μήκος της οποίας κυμαίνεται από 11 έως 31 επαναλήψεις. Μεγαλύτερο μήκος CAG επαναλήψεων σχετίζεται με μειωμένη μεταγραφική ικανότητα και συγγένεια για τη σύνδεση του υποδοχέα με τα ανδρογόνα, γεγονός που πιθανά δρα προστατευτικά για το προστατικό κύτταρο έναντι του καρκίνου. Αντίθετα, η αυξημένη μεταγραφική ικανότητα και σύνδεση με τα ανδρογόνα των βραχύτερων πολυμορφικών περιοχών σχετίζεται με χρόνια υπερέκθεση στα ανδρογόνα και πιθανά με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης προστατικού καρκίνου.

Από την άλλη, σημαντικό ρόλο στην προστατική καρκινογένεση φαίνεται ότι παίζουν και τα οιστρογόνα. Ο κύριος μηχανισμός δράσης τους είναι μέσω των δύο κύριων οιστρογονικών υποδοχέων, ERα και ERβ. Η δράση τους είναι ανταγωνιστική και έτσι, ενώ ο ERα επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την φλεγμονή και κατά συνέπεια τον καρκίνο, ο ERβ φαίνεται να έχει προστατευτική δράση, αφού η δράση του είναι αντιμιτωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική. Πολυμορφισμοί επαναλαμβανόμενων δινουκλεοτιδίων στα γονίδια των οιστρογονικών υποδοχέων έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση του προστατικού καρκίνου, στα πλαίσια της διαταραχής της έκφρασής τους.

Επιπλέον, τα οιστρογόνα μπορούν να ασκήσουν καρκινογόνο δράση μέσω της δημιουργίας τοξικών μεταβολιτών, όπως οι ημικινόνες και οι κινόνες. Η έγκαιρη αδρανοποίηση των συγκεκριμένων ουσιών μέσω γλυκουρονοποίησης, από τη δράση του UGT1A1 ενζύμου έχει αποδειχθεί στον μεταβολισμό των οιστρογόνων, τόσο στο ήπαρ, που αποτελεί και τον κύριο ιστό δράσης του, όσο και σε άλλους ιστούς, όπως ο μαστός και ο προστάτης αδένας. Οι πολυμορφισμοί των επαναλαμβανόμενων (TA) δινουκλεοτιδίων στην περιοχή του υποκινητή του UGT1A1 γονιδίου, η οποία φυσιολογικά αποτελείται από 6 (TA) επαναλήψεις, μπορεί να οδηγήσουν σε αλλοίωση της έκφρασής του και κατά συνέπεια, της δράσης του UGT1A1

ενζύμου. Υπάρχει μάλιστα, μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των (TA) επαναλήψεων και της μεταγραφικής ικανότητας του UGT1A1. Λιγότερες επαναλήψεις (<6) σχετίζονται με αυξημένη δραστηριότητα, ενώ περισσότερες επαναλήψεις (>6) σχετίζονται με μειωμένη μεταγραφική ικανότητα.

Σκοπός της παρούσας διατριβής αποτελεί η μελέτη της συσχέτισης των πολυμορφισμών των νουκλεοτιδικών επαναλήψεων (CAG)<sub>n</sub> του AR, (TA)<sub>n</sub> του ERα, (CA)<sub>n</sub> του ERβ και (TA)<sub>n</sub> του γονιδίου UGT1A1 με τον καρκίνο του προστάτη. Οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί μελετήθηκαν τόσο όσον αφορά την κατανομή τους σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό, αλλά και όσον αφορά την συσχέτισή τους με δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του προστατικού καρκίνου, όπως είναι τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου, το κληρονομικό ιστορικό και οι διατροφικές συνήθειες των συμμετεχόντων στην μελέτη.

## **ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Στην μελέτη πήραν μέρος 470 άρρενες. 210 συμμετέχοντες που είχαν ένδειξη για βιοψία προστάτη (PSA≥4ng/ml ή/και θετική δακτυλική εξέταση ή/και ύποπτο εύρημα στον διορθικό υπέρηχο) αποτέλεσαν την ομάδα βιοψίας και 260 υγιείς μάρτυρες την ομάδα ελέγχου. Έγινε απομόνωση DNA από 3 ml περιφερικού αίματος και ακολούθησε PCR με τους κατάλληλους ανιχνευτές. Στη συνέχεια έγινε καθορισμός των μεγεθών των αλληλομόρφων με τη βοήθεια ενός αυτόματου αναλυτή αλληλουχιών του DNA και με τη χρήση του Fragment Software Analysis.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Από τα 210 μέλη της ομάδας βιοψίας, 106 εμφάνισαν θετική βιοψία προστάτη (ομάδα καρκίνου) και 104 αρνητική (ομάδα καλοήθους υπερπλασίας προστάτη). Η μέση τιμή του PSA στην ομάδα βιοψίας ήταν 11,81 ng/ml (εύρος: 2,9-188 ng/ml), ενώ στην ομάδα ελέγχου η μέση τιμή του PSA ήταν 0,29 ng/ml (εύρος: 0,1-1 ng/ml).

Τα προϊόντα της PCR ποίκιλαν σε μέγεθος: για το (AR) γονίδιο από 243 bp (8 CAG επαναλήψεις) έως 315 bp (32 CAG επαναλήψεις), για το ERα γονίδιο από 172 bp (4 TA επαναλήψεις) έως 206 bp (21 TA επαναλήψεις), για το ERβ γονίδιο από 137 bp (9 CA επαναλήψεις) έως 163 bp (22 TA επαναλήψεις) και τέλος για το γονίδιο του UGT1A1 από 98 bp (6 TA επαναλήψεις) έως και 100 bp (7 TA επαναλήψεις).

Όσον αφορά το UGT1A1 γονίδιο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην κατανομή των τριών γονοτύπων στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου UGT1A1 ανάμεσα στην ομάδα βιοψίας και την ομάδα ελέγχου. Επίσης, σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε ούτε ανάμεσα στην ομάδα καρκίνου και την ομάδα ελέγχου, όσον αφορά τους αντίστοιχους πολυμορφισμούς. Όσον αφορά τον κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη σε όσους είναι ομοζυγώτες για τον πολυμορφικό γονότυπο A(TA)<sup>7</sup>TAA, δεν παρατηρήθηκε κάποιος σημαντικός συσχετισμός από την μελέτη αυτή. Τέλος, δεν αναδείχθηκε κάποιος σημαντικός συσχετισμός ανάμεσα στους πολυμορφικούς γονότυπους και το Gleason score των ασθενών με καρκίνο του προστάτη.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό (TA)<sub>n</sub> του γονιδίου ERα, παρατηρήθηκε μια σημαντική διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού -1174 (TA)<sup>4-21</sup> ανάμεσα στους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (ομάδα καρκίνου) και στους μάρτυρες (ομάδα ελέγχου). Επίσης, σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε και στην κατανομή των γονοτύπων του ίδιου πολυμορφισμού ανάμεσα στις ομάδες βιοψίας και ελέγχου.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό (CA)<sub>n</sub> του γονιδίου ERβ, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού c.1902+3607 (CA)<sup>9-22</sup> ανάμεσα στους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (ομάδα καρκίνου) και στους μάρτυρες (ομάδα ελέγχου). Επίσης, σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε ούτε στην κατανομή των γονοτύπων του ίδιου πολυμορφισμού ανάμεσα στις ομάδες βιοψίας και ελέγχου.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό (CAG)<sub>n</sub> του γονιδίου AR, παρατηρήθηκε μια σημαντική διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού c.172 (CAG)<sup>8-32</sup> ανάμεσα στους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (ομάδα καρκίνου) και στους μάρτυρες (ομάδα ελέγχου). Επίσης, σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε και στην κατανομή των γονοτύπων του ίδιου πολυμορφισμού ανάμεσα στις ομάδες βιοψίας και ελέγχου.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι: α) Όσοι άρρενες φέρουν μεγάλου μήκους αλληλόμορφα για τις (CAG) επαναλήψεις του AR γονιδίου ( $L \geq 19$  επαναλήψεις) παρουσιάζουν 1,7x φορές μικρότερο κίνδυνο για ανάπτυξη

καρκίνου του προστάτη, ενώ όσοι άντρες φέρουν ομοζυγωτία για μεγάλου μήκους αλληλόμορφα για τις (TA) επαναλήψεις του ERα γονιδίου (LL,  $\geq 10$  επαναλήψεις) παρουσιάζουν 2,2x φορές μικρότερο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη. β) Μεγάλου μήκους (CAG) επαναλήψεις του AR γονιδίου (L,  $\geq 19$  επαναλήψεις) έχουν προστατευτικό ρόλο και άτομα που υποβάλλονται σε βιοψία προστάτη έχουν 2x φορές μικρότερη πιθανότητα να πάσχουν από καρκίνο του προστάτη. γ) Μεγάλου μήκους (TA) επαναλήψεις του ERα γονιδίου (LL,  $\geq 10$  επαναλήψεις) έχουν προστατευτικό ρόλο και άτομα που υποβάλλονται σε βιοψία προστάτη έχουν 2,4x φορές μικρότερο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη. δ) Οι πολυμορφισμοί των (CA) επαναλήψεων του ERβ γονιδίου και οι πολυμορφισμοί των (TA) επαναλήψεων της περιοχής του υποκινητή του UGT1A1 γονιδίου δεν φαίνεται να επηρεάζουν τον κίνδυνο για την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη. Τέλος, τόσο οι πολυμορφισμοί του AR και του ERα γονιδίου, όσο και οι πολυμορφισμοί του ERβ και του UGT1A1 γονιδίου δεν φαίνεται να σχετίζονται με την επιθετικότητα και την πορεία της νόσου.

## SUMMARY

Prostate cancer is a hormone related cancer. Steroid hormones, mainly testosterone and dihydrotestosterone (DHT), play an important role in the prostatic carcinogenesis, acting through androgen receptor (AR). In the transcriptional domain of the AR there is a highly (CAG)<sub>n</sub> polymorphic region, with repeat length ranging between 11 and 31 repeats. The transactivation potential of the AR is inversely correlated to repeat length, such that shorter CAG repeats are related to prostate cancer, mainly due to chronic androgen overstimulation on the prostate gland.

On the other hand, estrogens play also important role in the etiology of prostate cancer, acting mainly through the estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ . Their action is competitive and thus, while ER $\alpha$  promotes prostatic cell proliferation, inflammation and cancer, ER $\beta$  has antimitotic, anti-inflammatory and antioxidant action on the prostate tissue. Short tandem repeat polymorphisms in the estrogen receptor genes have been correlated to prostatic carcinogenesis, probably by altering their expression.

Furthermore, estrogens can be potentially carcinogenic through their toxic metabolites, such as semiquinones and quinines. Detoxification of estrogens through glucuronidation, mediated by the UGT1A1 enzyme, is already proved in the liver and other tissues, such as the mammary and prostate gland. Repeat (TA) dinucleotide polymorphisms in the promoter region of the UGT1A1 gene, normally consisting of 6 (TA) repeats, may alter gene expression. There is an inverse correlation between (TA) repeats and transactivation potential, such that shorter repeats (<6) are related to increased transactivation activity and longer repeats (>6) are related to decreased transactivation activity, respectively.

The aim of our study is to examine the correlation among (CAG)<sub>n</sub>, (TA)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub> and (TA)<sub>n</sub> repeat polymorphisms in the AR, ER $\alpha$ , ER $\beta$  and the UGT1A1 gene, respectively, with prostate cancer, in relation to secondary prostate cancer characteristics, such as family history, Gleason Score and dietary habits.

## MATERIALS AND METHODS

470 males were included into our study. 210 participants were candidates for prostate biopsy (PSA $\geq$ 4ng/ml or/+ positive DRE or/+ suspicious TRUS)

and entered the biopsy group, whether 260 healthy volunteers entered the control group. Genomic DNA was isolated and appropriate primers were designed for PCR amplification. Allele fragment sizes were determined in comparison with external size markers by an automated DNA sequencer and analyzed using the Fragment Software Analysis.

## RESULTS

Of the 210 men who underwent prostate biopsy, 106 had prostate cancer (cancer group) and 104 were negatives (BPH group). The mean PSA values were 11,81 ng/ml in the biopsy group (range: 2,9-188 ng/ml) and 0,29 ng/ml in the controls (range: 0.1 -1 ng/ml).

The PCR products ranged in length: for the AR gene between 243 bp (8 CAG repeats) and 315 bp (32 CAG repeats), for the ER $\alpha$  gene between 172 bp (4 TA repeats) and 206 bp (21 repeats), for the ER $\beta$  gene between 137 bp (9 CA repeats) and 163 bp (22 TA repeats) and for the UGT1A1 gene between 98 bp (6 TA repeats) and 100 bp (7 TA repeats).

Regarding the UGT1A1 gene, there was no correlation in the distribution of the three genotypes in the promoter region of the UGT1A1 gene between the biopsy group and the controls. In addition, not such a correlation existed between the cancer group and the controls. Furthermore, there was no association between overall disease risk and the presence of the polymorphic homozygous genotype. In addition, no association was revealed between UGT1A1 genotype distribution and Gleason score.

Regarding the ER $\alpha$  gene, there was a significant correlation in the genotype distribution of the -1174 (TA)<sub>4-21</sub> polymorphism among the biopsy group, the cancer group and the controls.

Regarding the ER $\beta$  gene, there was no correlation in the genotype distribution of the c.1902+3607 (CA)<sub>9-22</sub> polymorphism among the biopsy group, the cancer group and the controls.

Regarding the AR gene, there was a significant correlation in the genotype distribution of the c.172 (CAG)<sub>8-32</sub> polymorphism among the biopsy group, the cancer group and the controls.

## DISCUSSION

Our results indicate that: i) Men carrying longer (CAG) alleles in the AR gene ( $\geq 19$  repeats) and longer (TA) alleles in the ER $\alpha$  ( $\geq 10$  repeats) are

associated with 1,7x and 2,2x fold decreased risk of developing prostate cancer, respectively. ii) Longer (CAG) alleles in the AR gene ( $\geq 19$  repeats) are associated with 2x fold decreased risk of prostate cancer in men who undergo prostate biopsy. iii) Longer (TA) alleles in the ER $\alpha$  gene ( $\geq 10$  repeats) are associated with 2,4x fold decreased risk of prostate cancer in men who undergo prostate biopsy. iv) The (CA) repeat polymorphisms of the ER $\beta$  gene and the (TA) repeat polymorphisms of the UGT1A1 gene are not associated with the risk of prostate cancer. Finally, all the above polymorphisms are not associated with the aggressiveness and the prognosis of the prostate cancer.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58(2):71-96.
2. Baade PD, Coory MD, Aitken JF. International trends in prostate-cancer mortality: the decrease is continuing and spreading. *Cancer Causes Control* 2004;15(3):237-241.
3. McCracken M, Olsen M, Chen MS, Jr., Jemal A, Thun M, Cokkinides V, Deapen D, Ward E. Cancer incidence, mortality, and associated risk factors among Asian Americans of Chinese, Filipino, Vietnamese, Korean, and Japanese ethnicities. *CA Cancer J Clin* 2007;57(4):190-205.
4. Boyle P, Severi G, Giles GG. The epidemiology of prostate cancer. *Urol Clin North Am* 2003;30(2):209-217.
5. Vercelli M, Quaglia A, Marani E, Parodi S. Prostate cancer incidence and mortality trends among elderly and adult Europeans. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;35(2):133-144.
6. Micheli A, Mugno E, Krogh V, Quinn MJ, Coleman M, Hakulinen T, Gatta G, Berrino F, Capocaccia R. Cancer prevalence in European registry areas. *Ann Oncol* 2002;13(6):840-865.
7. Bantis A, Vasiliou O. Prostate cancer incidence, mortality, total and free prostate specific antigen. *Hell J Nucl Med* 2009;12(2):106-109.
8. Yin M, Bastacky S, Chandran U, Becich MJ, Dhir R. Prevalence of incidental prostate cancer in the general population: a study of healthy organ donors. *J Urol* 2008;179(3):892-895; discussion 895.
9. Mazhar D, Waxman J. Prostate cancer. *Postgrad Med J* 2002;78(924):590-595.
10. Heinzer H, Steuber T. Prostate cancer in the elderly. *Urol Oncol* 2009;27(6):668-672.
11. Crawford ED. Understanding the epidemiology, natural history, and key pathways involved in prostate cancer. *Urology* 2009;73(5 Suppl):S4-10.
12. Bartsch G, Horninger W, Klocker H, Reissigl A, Oberaigner W, Schonitzer D, Severi G, Robertson C, Boyle P. Prostate cancer mortality after introduction of prostate-specific antigen mass screening in the Federal State of Tyrol, Austria. *Urology* 2001;58(3):417-424.

13. Breslow N, Chan CW, Dhom G, Drury RA, Franks LM, Gellei B, Lee YS, Lundberg S, Sparke B, Sternby NH, Tulinius H. Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The International Agency for Research on Cancer, Lyons, France. *Int J Cancer* 1977;20(5):680-688.
14. Dhom G. [Epidemiologic and morphogenetic aspects of prostate cancer]. *Urologe A* 1991;30(3 Suppl):3-4.
15. Pienta KJ, Esper PS. Risk factors for prostate cancer. *Ann Intern Med* 1993;118(10):793-803.
16. Wingo PA, Bolden S, Tong T, Parker SL, Martin LM, Heath CW, Jr. Cancer statistics for African Americans, 1996. *CA Cancer J Clin* 1996;46(2):113-125.
17. Pienta KJ, Demers R, Hoff M, Kau TY, Montie JE, Severson RK. Effect of age and race on the survival of men with prostate cancer in the Metropolitan Detroit tricounty area, 1973 to 1987. *Urology* 1995;45(1):93-101; discussion 101-102.
18. Yu H, Harris RE, Gao YT, Gao R, Wynder EL. Comparative epidemiology of cancers of the colon, rectum, prostate and breast in Shanghai, China versus the United States. *Int J Epidemiol* 1991;20(1):76-81.
19. Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* 1991;63(6):963-966.
20. Shao YH, Demissie K, Shih W, Mehta AR, Stein MN, Roberts CB, Dipaola RS, Lu-Yao GL. Contemporary risk profile of prostate cancer in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(18):1280-1283.
21. Miller AB, Berrino F, Hill M, Pietinen P, Riboli E, Wahrendorf J. Diet in the aetiology of cancer: a review. *Eur J Cancer* 1994;30A(2):207-220; discussion 220-208.
22. Rose DP. Dietary fiber and breast cancer. *Nutr Cancer* 1990;13(1-2):1-8.
23. Fair WR, Fleshner NE, Heston W. Cancer of the prostate: a nutritional disease? *Urology* 1997;50(6):840-848.

24. Clinton SK, Palmer SS, Spriggs CE, Visek WJ. Growth of Dunning transplantable prostate adenocarcinomas in rats fed diets with various fat contents. *J Nutr* 1988;118(7):908-914.
25. Rose DP. Dietary fatty acids and prevention of hormone-responsive cancer. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;216(2):224-233.
26. Pienta KJ, Goodson JA, Esper PS. Epidemiology of prostate cancer: molecular and environmental clues. *Urology* 1996;48(5):676-683.
27. Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Ascherio A, Chute CC, Willett WC. A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(19):1571-1579.
28. Hirayama T. Life-style and cancer: from epidemiological evidence to public behavior change to mortality reduction of target cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1992(12):65-74.
29. Miksicek RJ. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol Pharmacol* 1993;44(1):37-43.
30. Rosenblum ER, Campbell IM, Van Thiel DH, Gavalier JS. Isolation and identification of phytoestrogens from beer. *Alcohol Clin Exp Res* 1992;16(5):843-845.
31. Price KR, Fenwick GR. Naturally occurring oestrogens in foods--a review. *Food Addit Contam* 1985;2(2):73-106.
32. Thompson LU, Robb P, Serraino M, Cheung F. Mammalian lignan production from various foods. *Nutr Cancer* 1991;16(1):43-52.
33. Setchell KD, Borriello SP, Hulme P, Kirk DN, Axelson M. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am J Clin Nutr* 1984;40(3):569-578.
34. Slawin K, Kadmon D, Park SH, Scardino PT, Anzano M, Sporn MB, Thompson TC. Dietary fenretinide, a synthetic retinoid, decreases the tumor incidence and the tumor mass of ras+myc-induced carcinomas in the mouse prostate reconstitution model system. *Cancer Res* 1993;53(19):4461-4465.
35. Hanchette CL, Schwartz GG. Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation. *Cancer* 1992;70(12):2861-2869.

36. Peehl DM, Skowronski RJ, Leung GK, Wong ST, Stamey TA, Feldman D. Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on primary cultures of human prostatic cells. *Cancer Res* 1994;54(3):805-810.
37. Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D. Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors and actions in human prostate cancer cell lines. *Endocrinology* 1993;132(5):1952-1960.
38. Corder EH, Guess HA, Hulka BS, Friedman GD, Sadler M, Vollmer RT, Lobaugh B, Drezner MK, Vogelmann JH, Orentreich N. Vitamin D and prostate cancer: a prediagnostic study with stored sera. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993;2(5):467-472.
39. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1994;330(15):1029-1035.
40. Clark LC, Combs GF, Jr., Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J, Davis LS, Glover RA, Graham GF, Gross EG, Krongrad A, Leshner JL, Jr., Park HK, Sanders BB, Jr., Smith CL, Taylor JR. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA* 1996;276(24):1957-1963.
41. Whelan P, Walker BE, Kelleher J. Zinc, vitamin A and prostatic cancer. *Br J Urol* 1983;55(5):525-528.
42. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(8):3367-3371.
43. Isaacs WB, Bova GS, Morton RA, Bussemakers MJ, Brooks JD, Ewing CM. Molecular biology of prostate cancer. *Semin Oncol* 1994;21(5):514-521.
44. Smith JR, Freije D, Carpten JD, Gronberg H, Xu J, Isaacs SD, Brownstein MJ, Bova GS, Guo H, Bujnovszky P, Nusskern DR, Damber JE, Bergh A, Emanuelsson M, Kallioniemi OP, Walker-Daniels J, Bailey-Wilson JE, Beaty TH, Meyers DA, Walsh PC, Collins FS, Trent JM, Isaacs WB. Major susceptibility locus for prostate cancer on

- chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* 1996;274(5291):1371-1374.
45. Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, Zattoni F. EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol* 2008;53(1):68-80.
  46. McNeal JE, Bostwick DG, Kindrachuk RA, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Patterns of progression in prostate cancer. *Lancet* 1986;1(8472):60-63.
  47. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 1987;317(15):909-916.
  48. Brawer MK, Lange PH. Prostate-specific antigen in management of prostatic carcinoma. *Urology* 1989;33(5 Suppl):11-16.
  49. Suzuki H, Flanigan RC, Okuyama A. Prostate specific antigen (PSA)-based screening. *Int J Urol* 2008;15(9):757-762.
  50. Lange PH. Future studies in localized prostate cancer. What should we think? What can we do? *J Urol* 1994;152(5 Pt 2):1932-1938.
  51. Johansson JE, Holmberg L, Johansson S, Bergstrom R, Adami HO. Fifteen-year survival in prostate cancer. A prospective, population-based study in Sweden. *JAMA* 1997;277(6):467-471.
  52. Albertsen PC, Fryback DG, Storer BE, Kolon TF, Fine J. Long-term survival among men with conservatively treated localized prostate cancer. *JAMA* 1995;274(8):626-631.
  53. Gronberg H, Damber JE, Jonsson H, Lenner P. Patient age as a prognostic factor in prostate cancer. *J Urol* 1994;152(3):892-895.
  54. McNeal JE, Villers AA, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Histologic differentiation, cancer volume, and pelvic lymph node metastasis in adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1990;66(6):1225-1233.
  55. Stamey TA, Freiha FS, McNeal JE, Redwine EA, Whittemore AS, Schmid HP. Localized prostate cancer. Relationship of tumor volume to clinical significance for treatment of prostate cancer. *Cancer* 1993;71(3 Suppl):933-938.

56. Stamey TA, McNeal JE, Yemoto CM, Sigal BM, Johnstone IM. Biological determinants of cancer progression in men with prostate cancer. *JAMA* 1999;281(15):1395-1400.
57. Tewari A, Divine G, Chang P, Shemtov MM, Milowsky M, Nanus D, Menon M. Long-term survival in men with high grade prostate cancer: a comparison between conservative treatment, radiation therapy and radical prostatectomy--a propensity scoring approach. *J Urol* 2007;177(3):911-915.
58. Freedland SJ, Isaacs WB, Platz EA, Terris MK, Aronson WJ, Amling CL, Presti JC, Jr., Kane CJ. Prostate size and risk of high-grade, advanced prostate cancer and biochemical progression after radical prostatectomy: a search database study. *J Clin Oncol* 2005;23(30):7546-7554.
59. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995;83(6):835-839.
60. Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 1999;64(5):310-319.
61. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 1999;20(3):321-344.
62. Knauf U, Jakob U, Engel K, Buchner J, Gaestel M. Stress- and mitogen-induced phosphorylation of the small heat shock protein Hsp25 by MAPKAP kinase 2 is not essential for chaperone properties and cellular thermoresistance. *EMBO J* 1994;13(1):54-60.
63. Parker MG. Transcriptional activation by oestrogen receptors. *Biochem Soc Symp* 1998;63:45-50.
64. Giguere V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 1999;20(5):689-725.
65. Wong CW, Privalsky ML. Transcriptional silencing is defined by isoform- and heterodimer-specific interactions between nuclear hormone receptors and corepressors. *Mol Cell Biol* 1998;18(10):5724-5733.

66. Moras D, Gronemeyer H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10(3):384-391.
67. Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, Fletterick RJ, Yamamoto KR. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev* 1998;12(21):3343-3356.
68. Janknecht R, Hunter T. Versatile molecular glue. *Transcriptional control*. *Curr Biol* 1996;6(8):951-954.
69. Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG. Nuclear receptor coactivators. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9(2):222-232.
70. Jenster G. Coactivators and corepressors as mediators of nuclear receptor function: an update. *Mol Cell Endocrinol* 1998;143(1-2):1-7.
71. Wolffe AP, Wong J, Pruss D. Activators and repressors: making use of chromatin to regulate transcription. *Genes Cells* 1997;2(5):291-302.
72. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 2000;14(2):121-141.
73. Westin S, Kurokawa R, Nolte RT, Wisely GB, McInerney EM, Rose DW, Milburn MV, Rosenfeld MG, Glass CK. Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. *Nature* 1998;395(6698):199-202.
74. Forman BM, Samuels HH. Dimerization among nuclear hormone receptors. *New Biol* 1990;2(7):587-594.
75. Wade PA, Wolffe AP. Transcriptional regulation: SWItching circuitry. *Curr Biol* 1999;9(6):R221-224.
76. Rhodes D. Chromatin structure. The nucleosome core all wrapped up. *Nature* 1997;389(6648):231, 233.
77. Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol* 2000;164(3):247-253.
78. Morales A, Heaton JP, Carson CC, 3rd. Andropause: a misnomer for a true clinical entity. *J Urol* 2000;163(3):705-712.
79. Hammond GL. Endogenous steroid levels in the human prostate from birth to old age: a comparison of normal and diseased tissues. *J Endocrinol* 1978;78(1):7-19.

80. Zhu YS, Sun GH. 5alpha-Reductase Isozymes in the Prostate. *J Med Sci* 2005;25(1):1-12.
81. Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, Casey ML, McConnell JD, Russell DW. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression. *J Clin Invest* 1993;92(2):903-910.
82. Marks LS. 5alpha-reductase: history and clinical importance. *Rev Urol* 2004;6 Suppl 9:S11-21.
83. Wilbert DM, Griffin JE, Wilson JD. Characterization of the cytosol androgen receptor of the human prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56(1):113-120.
84. Imperato-McGinley J, Zhu YS. Androgens and male physiology the syndrome of 5alpha-reductase-2 deficiency. *Mol Cell Endocrinol* 2002;198(1-2):51-59.
85. Griffiths K, Morton MS, Nicholson RI. Androgens, androgen receptors, antiandrogens and the treatment of prostate cancer. *Eur Urol* 1997;32 Suppl 3:24-40.
86. Chang CS, Kokontis J, Liao ST. Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(19):7211-7215.
87. Gnanapragasam VJ, Robson CN, Leung HY, Neal DE. Androgen receptor signalling in the prostate. *BJU Int* 2000;86(9):1001-1013.
88. Brinkmann AO, Faber PW, van Rooij HC, Kuiper GG, Ris C, Klaassen P, van der Korput JA, Voorhorst MM, van Laar JH, Mulder E, et al. The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *J Steroid Biochem* 1989;34(1-6):307-310.
89. Hakimi JM, Rondinelli RH, Schoenberg MP, Barrack ER. Androgen-receptor gene structure and function in prostate cancer. *World J Urol* 1996;14(5):329-337.
90. Graham-Lorence S, Khalil MW, Lorence MC, Mendelson CR, Simpson ER. Structure-function relationships of human aromatase cytochrome P-450 using molecular modeling and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1991;266(18):11939-11946.



91. Zondek T, Mansfield MD, Attree SL, Zondek LH. Hormone levels in the foetal and neonatal prostate. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1986;112(3):447-456.
92. Wernert N, Kern L, Heitz P, Bonkhoff H, Goebbels R, Seitz G, Inniger R, Remberger K, Dhom G. Morphological and immunohistochemical investigations of the utriculus prostaticus from the fetal period up to adulthood. *Prostate* 1990;17(1):19-30.
93. Rajfer J, Coffey DS. Sex steroid imprinting of the immature prostate. Long-term effects. *Invest Urol* 1978;16(3):186-190.
94. Ekblom A, Wu J, Adami HO, Lu CM, Laggou P, Trichopoulos D, Hsieh C. Duration of gestation and prostate cancer risk in offspring. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9(2):221-223.
95. Ekblom A, Hsieh CC, Lipworth L, Wolk A, Ponten J, Adami HO, Trichopoulos D. Perinatal characteristics in relation to incidence of and mortality from prostate cancer. *BMJ* 1996;313(7053):337-341.
96. Driscoll SG, Taylor SH. Effects of prenatal maternal estrogen on the male urogenital system. *Obstet Gynecol* 1980;56(5):537-542.
97. Yonemura CY, Cunha GR, Sugimura Y, Mee SL. Temporal and spatial factors in diethylstilbestrol-induced squamous metaplasia in the developing human prostate. II. Persistent changes after removal of diethylstilbestrol. *Acta Anat (Basel)* 1995;153(1):1-11.
98. Henderson BE, Bernstein L, Ross RK, Depue RH, Judd HL. The early in utero oestrogen and testosterone environment of blacks and whites: potential effects on male offspring. *Br J Cancer* 1988;57(2):216-218.
99. Platz EA, Giovannucci E. The epidemiology of sex steroid hormones and their signaling and metabolic pathways in the etiology of prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;92(4):237-253.
100. Ho SM. Estrogens and anti-estrogens: key mediators of prostate carcinogenesis and new therapeutic candidates. *J Cell Biochem* 2004;91(3):491-503.
101. King KJ, Nicholson HD, Assinder SJ. Effect of increasing ratio of estrogen: androgen on proliferation of normal human prostate stromal and epithelial cells, and the malignant cell line LNCaP. *Prostate* 2006;66(1):105-114.

102. Prins GS, Korach KS. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids* 2008;73(3):233-244.
103. Leav I, Ho SM, Ofner P, Merk FB, Kwan PW, Damassa D. Biochemical alterations in sex hormone-induced hyperplasia and dysplasia of the dorsolateral prostates of Noble rats. *J Natl Cancer Inst* 1988;80(13):1045-1053.
104. Coffey DS, Walsh PC. Clinical and experimental studies of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am* 1990;17(3):461-475.
105. Krieg M, Klotzl G, Kaufmann J, Voigt KD. Stroma of human benign prostatic hyperplasia: preferential tissue for androgen metabolism and oestrogen binding. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1981;96(3):422-432.
106. Sarabia SF, Zhu BT, Kurosawa T, Tohma M, Liehr JG. Mechanism of cytochrome P450-catalyzed aromatic hydroxylation of estrogens. *Chem Res Toxicol* 1997;10(7):767-771.
107. Zhang F, Chen Y, Pisha E, Shen L, Xiong Y, van Breemen RB, Bolton JL. The major metabolite of equilin, 4-hydroxyequilin, autoxidizes to an o-quinone which isomerizes to the potent cytotoxin 4-hydroxyequilenin-o-quinone. *Chem Res Toxicol* 1999;12(2):204-213.
108. Lee AJ, Cai MX, Thomas PE, Conney AH, Zhu BT. Characterization of the oxidative metabolites of 17beta-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms. *Endocrinology* 2003;144(8):3382-3398.
109. Hanna IH, Dawling S, Roodi N, Guengerich FP, Parl FF. Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) pharmacogenetics: association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxylation activity. *Cancer Res* 2000;60(13):3440-3444.
110. Raftogianis R, Creveling C, Weinshilboum R, Weisz J. Estrogen metabolism by conjugation. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000(27):113-124.
111. Zhang F, Bolton JL. Synthesis of the equine estrogen metabolites 2-hydroxyequilin and 2-hydroxyequilenin. *Chem Res Toxicol* 1999;12(2):200-203.
112. Roy D, Bernhardt A, Strobel HW, Liehr JG. Catalysis of the oxidation of steroid and stilbene estrogens to estrogen quinone metabolites by the

- beta-naphthoflavone-inducible cytochrome P450 1A family. Arch Biochem Biophys 1992;296(2):450-456.
113. Chang M, Zhang F, Shen L, Pauss N, Alam I, van Breemen RB, Blond SY, Bolton JL. Inhibition of glutathione S-transferase activity by the quinoid metabolites of equine estrogens. Chem Res Toxicol 1998;11(7):758-765.
  114. Devanesan P, Santen RJ, Bocchinfuso WP, Korach KS, Rogan EG, Cavalieri E. Catechol estrogen metabolites and conjugates in mammary tumors and hyperplastic tissue from estrogen receptor-alpha knock-out (ERKO)/Wnt-1 mice: implications for initiation of mammary tumors. Carcinogenesis 2001;22(9):1573-1576.
  115. Roy D, Liehr JG. Estrogen, DNA damage and mutations. Mutat Res 1999;424(1-2):107-115.
  116. Roy D, Cai Q, Felty Q, Narayan S. Estrogen-induced generation of reactive oxygen and nitrogen species, gene damage, and estrogen-dependent cancers. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 2007;10(4):235-257.
  117. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. Mol Interv 2003;3(5):281-292.
  118. Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrase G, Waterfield M, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1985;82(23):7889-7893.
  119. White R, Lees JA, Needham M, Ham J, Parker M. Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. Mol Endocrinol 1987;1(10):735-744.
  120. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93(12):5925-5930.
  121. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. FEBS Lett 1996;392(1):49-53.

122. Ueda T, Bruchovsky N, Sadar MD. Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways. *J Biol Chem* 2002;277(9):7076-7085.
123. Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ediger TR, Sun J, Ekena K, Lazennec G, Martini PG, McInerney EM, Delage-Mourroux R, Weis K, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. *Recent Prog Horm Res* 2000;55:163-193; discussion 194-165.
124. Delaunay F, Pettersson K, Tujague M, Gustafsson JA. Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. *Mol Pharmacol* 2000;58(3):584-590.
125. Watanabe T, Inoue S, Ogawa S, Ishii Y, Hiroi H, Ikeda K, Orimo A, Muramatsu M. Agonistic effect of tamoxifen is dependent on cell type, ERE-promoter context, and estrogen receptor subtype: functional difference between estrogen receptors alpha and beta. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236(1):140-145.
126. Cowley SM, Parker MG. A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69(1-6):165-175.
127. Stoica A, Saceda M, Fakhro A, Solomon HB, Fenster BD, Martin MB. Regulation of estrogen receptor-alpha gene expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D in MCF-7 cells. *J Cell Biochem* 1999;75(4):640-651.
128. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138(3):863-870.
129. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 1998;139(10):4252-4263.
130. Schulze H, Claus S. Histological localization of estrogen receptors in normal and diseased human prostates by immunocytochemistry. *Prostate* 1990;16(4):331-343.

131. Schulze H, Barrack ER. Immunocytochemical localization of estrogen receptors in spontaneous and experimentally induced canine benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 1987;11(2):145-162.
132. Brenner RM, West NB, McClellan MC. Estrogen and progestin receptors in the reproductive tract of male and female primates. *Biol Reprod* 1990;42(1):11-19.
133. Prins GS, Birch L. Neonatal estrogen exposure up-regulates estrogen receptor expression in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology* 1997;138(5):1801-1809.
134. Tsurusaki T, Aoki D, Kanetake H, Inoue S, Muramatsu M, Hishikawa Y, Koji T. Zone-dependent expression of estrogen receptors alpha and beta in human benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(3):1333-1340.
135. Tilley WD, Horsfall DJ, Skinner JM, Henderson DW, Marshall VR. Effect of pubertal development on estrogen receptor levels and stromal morphology in the guinea pig prostate. *Prostate* 1989;15(2):195-210.
136. Adams JY, Leav I, Lau KM, Ho SM, Pflueger SM. Expression of estrogen receptor beta in the fetal, neonatal, and prepubertal human prostate. *Prostate* 2002;52(1):69-81.
137. Shapiro E, Huang H, Masch RJ, McFadden DE, Wilson EL, Wu XR. Immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in human fetal prostate. *J Urol* 2005;174(5):2051-2053.
138. Kozak I, Bartsch W, Krieg M, Voigt KD. Nuclei of stroma: site of highest estrogen concentration in human benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 1982;3(5):433-438.
139. Risbridger G, Wang H, Young P, Kurita T, Wang YZ, Lubahn D, Gustafsson JA, Cunha G. Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor-alpha mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Dev Biol* 2001;229(2):432-442.
140. Prins GS, Birch L, Couse JF, Choi I, Katzenellenbogen B, Korach KS. Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: studies with alphaERKO and betaERKO mice. *Cancer Res* 2001;61(16):6089-6097.

141. Li LC, Chui R, Nakajima K, Oh BR, Au HC, Dahiya R. Frequent methylation of estrogen receptor in prostate cancer: correlation with tumor progression. *Cancer Res* 2000;60(3):702-706.
142. Lau KM, LaSpina M, Long J, Ho SM. Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. *Cancer Res* 2000;60(12):3175-3182.
143. Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K. Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostatic lesions. *Am J Pathol* 1999;155(2):641-647.
144. Leav I, Lau KM, Adams JY, McNeal JE, Taplin ME, Wang J, Singh H, Ho SM. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol* 2001;159(1):79-92.
145. Tanaka Y, Sasaki M, Kaneuchi M, Fujimoto S, Dahiya R. Estrogen receptor alpha polymorphisms and renal cell carcinoma--a possible risk. *Mol Cell Endocrinol* 2003;202(1-2):109-116.
146. Weihua Z, Makela S, Andersson LC, Salmi S, Saji S, Webster JI, Jensen EV, Nilsson S, Warner M, Gustafsson JA. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(11):6330-6335.
147. Prins GS, Marmer M, Woodham C, Chang W, Kuiper G, Gustafsson JA, Birch L. Estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats. *Endocrinology* 1998;139(3):874-883.
148. Weihua Z, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol Cell Endocrinol* 2002;193(1-2):1-5.
149. Couse JF, Curtis Hewitt S, Korach KS. Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;74(5):287-296.
150. Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha

- (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 2000;127(19):4277-4291.
151. McPherson SJ, Ellem SJ, Simpson ER, Patchev V, Fritzemeier KH, Risbridger GP. Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology* 2007;148(2):566-574.
  152. McMurray RW. Estrogen, prolactin, and autoimmunity: actions and interactions. *Int Immunopharmacol* 2001;1(6):995-1008.
  153. Yellayi S, Teuscher C, Woods JA, Welsh TH, Jr., Tung KS, Nakai M, Rosenfeld CS, Lubahn DB, Cooke PS. Normal development of thymus in male and female mice requires estrogen/estrogen receptor-alpha signaling pathway. *Endocrine* 2000;12(3):207-213.
  154. Harris HA, Albert LM, Leathurby Y, Malamas MS, Mewshaw RE, Miller CP, Kharode YP, Marzolf J, Komm BS, Winneker RC, Frail DE, Henderson RA, Zhu Y, Keith JC, Jr. Evaluation of an estrogen receptor-beta agonist in animal models of human disease. *Endocrinology* 2003;144(10):4241-4249.
  155. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 1999;155(6):1985-1992.
  156. Montano MM, Jaiswal AK, Katzenellenbogen BS. Transcriptional regulation of the human quinone reductase gene by antiestrogen-liganded estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta. *J Biol Chem* 1998;273(39):25443-25449.
  157. Nelson WG, DeWeese TL, DeMarzo AM. The diet, prostate inflammation, and the development of prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2002;21(1):3-16.
  158. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ogawa S, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Inoue S. Differential expression of estrogen receptor beta (ERbeta) and its C-terminal truncated splice variant ERbetacx as prognostic predictors in human prostatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289(3):692-699.
  159. Pasquali D, Rossi V, Esposito D, Abbondanza C, Puca GA, Bellastella A, Sinisi AA. Loss of estrogen receptor beta expression in malignant

- human prostate cells in primary cultures and in prostate cancer tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(5):2051-2055.
160. Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, Head DR, Quinn DI, Makela S, Delprado W, Golovsky D, Brenner PC, O'Neill G, Kooner R, Stricker PD, Grygiel JJ, Gustafsson JA, Sutherland RL. Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61(14):5331-5335.
  161. Zhu X, Leav I, Leung YK, Wu M, Liu Q, Gao Y, McNeal JE, Ho SM. Dynamic regulation of estrogen receptor-beta expression by DNA methylation during prostate cancer development and metastasis. *Am J Pathol* 2004;164(6):2003-2012.
  162. Zhang X, Leung YK, Ho SM. AP-2 regulates the transcription of estrogen receptor (ER)-beta by acting through a methylation hotspot of the ON promoter in prostate cancer cells. *Oncogene* 2007;26(52):7346-7354.
  163. Cheng J, Lee EJ, Madison LD, Lazennec G. Expression of estrogen receptor beta in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis. *FEBS Lett* 2004;566(1-3):169-172.
  164. Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H. Differential expression of the estrogen receptor beta (ERbeta) in human prostate tissue, premalignant changes, and in primary, metastatic, and recurrent prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 2003;54(2):79-87.
  165. Lai JS, Brown LG, True LD, Hawley SJ, Etzioni RB, Higano CS, Ho SM, Vessella RL, Corey E. Metastases of prostate cancer express estrogen receptor-beta. *Urology* 2004;64(4):814-820.
  166. Wilson JD. The pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Am J Med* 1980;68(5):745-756.
  167. Guerini V, Sau D, Scaccianoce E, Rusmini P, Ciana P, Maggi A, Martini PG, Katzenellenbogen BS, Martini L, Motta M, Poletti A. The androgen derivative 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol inhibits prostate cancer cell migration through activation of the estrogen receptor beta subtype. *Cancer Res* 2005;65(12):5445-5453.



168. Ritter JK. Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact* 2000;129(1-2):171-193.
169. Belanger A, Hum DW, Beaulieu M, Levesque E, Guillemette C, Tchernof A, Belanger G, Turgeon D, Dubois S. Characterization and regulation of UDP-glucuronosyltransferases in steroid target tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998;65(1-6):301-310.
170. Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 1997;7(4):255-269.
171. King CD, Rios GR, Green MD, Tephly TR. UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* 2000;1(2):143-161.
172. Burchell B. Genetic variation of human UDP-glucuronosyltransferase: implications in disease and drug glucuronidation. *Am J Pharmacogenomics* 2003;3(1):37-52.
173. Turgeon D, Carrier JS, Levesque E, Beatty BG, Belanger A, Hum DW. Isolation and characterization of the human UGT2B15 gene, localized within a cluster of UGT2B genes and pseudogenes on chromosome 4. *J Mol Biol* 2000;295(3):489-504.
174. Levesque E, Turgeon D, Carrier JS, Montminy V, Beaulieu M, Belanger A. Isolation and characterization of the UGT2B28 cDNA encoding a novel human steroid conjugating UDP-glucuronosyltransferase. *Biochemistry* 2001;40(13):3869-3881.
175. Turgeon D, Chouinard S, Belanger P, Picard S, Labbe JF, Borgeat P, Belanger A. Glucuronidation of arachidonic and linoleic acid metabolites by human UDP-glucuronosyltransferases. *J Lipid Res* 2003;44(6):1182-1191.
176. Belanger A, Pelletier G, Labrie F, Barbier O, Chouinard S. Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferase enzymes in humans. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14(10):473-479.

177. Dutton GJ. Developmental aspects of drug conjugation, with special reference to glucuronidation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1978;18:17-35.
178. MacLeod SL, Nowell S, Plaxco J, Lang NP. An allele-specific polymerase chain reaction method for the determination of the D85Y polymorphism in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B15 gene in a case-control study of prostate cancer. *Ann Surg Oncol* 2000;7(10):777-782.
179. Park J, Chen L, Shade K, Lazarus P, Seigne J, Patterson S, Helal M, Pow-Sang J. Asp85tyr polymorphism in the udp-glucuronosyltransferase (UGT) 2B15 gene and the risk of prostate cancer. *J Urol* 2004;171(6 Pt 1):2484-2488.
180. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA, Lindhout D, Tytgat GN, Jansen PL, Oude Elferink RP, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1995;333(18):1171-1175.
181. Mackenzie PI, Miners JO, McKinnon RA. Polymorphisms in UDP glucuronosyltransferase genes: functional consequences and clinical relevance. *Clin Chem Lab Med* 2000;38(9):889-892.
182. Miners JO, McKinnon RA, Mackenzie PI. Genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases and their functional significance. *Toxicology* 2002;181-182:453-456.
183. Lampe JW, Bigler J, Horner NK, Potter JD. UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1\*28 and UGT1A6\*2) polymorphisms in Caucasians and Asians: relationships to serum bilirubin concentrations. *Pharmacogenetics* 1999;9(3):341-349.
184. Fertrin KY, Goncalves MS, Saad ST, Costa FF. Frequencies of UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) gene promoter polymorphisms among distinct ethnic groups from Brazil. *Am J Med Genet* 2002;108(2):117-119.
185. Iyer L, Hall D, Das S, Mortell MA, Ramirez J, Kim S, Di Rienzo A, Ratain MJ. Phenotype-genotype correlation of in vitro SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver

- tissue with UGT1A1 promoter polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 1999;65(5):576-582.
186. Kitsiou-Tzeli S, Kanavakis E, Tzetis M, Kavazarakis E, Galla A, Tsezou A. Gilbert's syndrome as a predisposing factor for idiopathic cholelithiasis in children. *Haematologica* 2003;88(10):1193-1194.
  187. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(14):8170-8174.
  188. Danoff TM, Campbell DA, McCarthy LC, Lewis KF, Repasch MH, Saunders AM, Spurr NK, Purvis IJ, Roses AD, Xu CF. A Gilbert's syndrome UGT1A1 variant confers susceptibility to tranilast-induced hyperbilirubinemia. *Pharmacogenomics J* 2004;4(1):49-53.
  189. Peters WH, te Morsche RH, Roelofs HM. Combined polymorphisms in UDP-glucuronosyltransferases 1A1 and 1A6: implications for patients with Gilbert's syndrome. *J Hepatol* 2003;38(1):3-8.
  190. Maruo Y, Iwai M, Mori A, Sato H, Takeuchi Y. Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 2005;6(2):91-99.
  191. Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* 2002;34(3):275-305.
  192. Yue P, Moutt J. Identification and analysis of deleterious human SNPs. *J Mol Biol* 2006;356(5):1263-1274.
  193. Vali U, Brandstrom M, Johansson M, Ellegren H. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC Genet* 2008;9:8.
  194. Tran N, Bharaj BS, Diamandis EP, Smith M, Li BD, Yu H. Short tandem repeat polymorphism and cancer risk: influence of laboratory analysis on epidemiologic findings. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(12):2133-2140.
  195. Calafell F, Shuster A, Speed WC, Kidd JR, Kidd KK. Short tandem repeat polymorphism evolution in humans. *Eur J Hum Genet* 1998;6(1):38-49.

196. Dong LM, Potter JD, White E, Ulrich CM, Cardon LR, Peters U. Genetic susceptibility to cancer: the role of polymorphisms in candidate genes. *JAMA* 2008;299(20):2423-2436.
197. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 1992;12(2):241-253.
198. Giovannucci E, Platz EA, Stampfer MJ, Chan A, Krithivas K, Kawachi I, Willett WC, Kantoff PW. The CAG repeat within the androgen receptor gene and benign prostatic hyperplasia. *Urology* 1999;53(1):121-125.
199. Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(11):3777-3782.
200. Kennedy WR, Alter M, Sung JH. Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset. A sex-linked recessive trait. *Neurology* 1968;18(7):671-680.
201. Mebane C, Gibbs T, Horm J. Current status of prostate cancer in North American black males. *J Natl Med Assoc* 1990;82(11):782-788.
202. Boring CC, Squires TS, Health CW, Jr. Cancer statistics for African Americans. *CA Cancer J Clin* 1992;42(1):7-17.
203. Morton RA, Jr. Racial differences in adenocarcinoma of the prostate in North American men. *Urology* 1994;44(5):637-645.
204. Coetzee GA, Ross RK. Re: Prostate cancer and the androgen receptor. *J Natl Cancer Inst* 1994;86(11):872-873.
205. Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* 1994;22(15):3181-3186.
206. Bratt O, Borg A, Kristoffersson U, Lundgren R, Zhang QX, Olsson H. CAG repeat length in the androgen receptor gene is related to age at diagnosis of prostate cancer and response to endocrine therapy, but not to prostate cancer risk. *Br J Cancer* 1999;81(4):672-676.
207. Hardy DO, Scher HI, Bogenreider T, Sabbatini P, Zhang ZF, Nanus DM, Catterall JF. Androgen receptor CAG repeat lengths in prostate

- cancer: correlation with age of onset. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(12):4400-4405.
208. Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, Talcott J, Hennekens CH, Kantoff PW. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(7):3320-3323.
  209. Ingles SA, Ross RK, Yu MC, Irvine RA, La Pera G, Haile RW, Coetzee GA. Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(2):166-170.
  210. Hakimi JM, Schoenberg MP, Rondonelli RH, Piantadosi S, Barrack ER. Androgen receptor variants with short glutamine or glycine repeats may identify unique subpopulations of men with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3(9):1599-1608.
  211. Irvine RA, Yu MC, Ross RK, Coetzee GA. The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Res* 1995;55(9):1937-1940.
  212. Correa-Cerro L, Wohr G, Haussler J, Berthon P, Drelon E, Mangin P, Fournier G, Cussenot O, Kraus P, Just W, Paiss T, Cantu JM, Vogel W. (CAG)<sub>n</sub>CAA and GGN repeats in the human androgen receptor gene are not associated with prostate cancer in a French-German population. *Eur J Hum Genet* 1999;7(3):357-362.
  213. Edwards SM, Badzioch MD, Minter R, Hamoudi R, Collins N, Ardern-Jones A, Dowe A, Osborne S, Kelly J, Shearer R, Easton DF, Saunders GF, Dearnaley DP, Eeles RA. Androgen receptor polymorphisms: association with prostate cancer risk, relapse and overall survival. *Int J Cancer* 1999;84(5):458-465.
  214. Stanford JL, Just JJ, Gibbs M, Wicklund KG, Neal CL, Blumenstein BA, Ostrander EA. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res* 1997;57(6):1194-1198.
  215. Hernandez J, Balic I, Johnson-Pais TL, Higgins BA, Torkko KC, Thompson IM, Leach RJ. Association between an estrogen receptor

- alpha gene polymorphism and the risk of prostate cancer in black men. *J Urol* 2006;175(2):523-527.
216. Tanaka Y, Sasaki M, Kaneuchi M, Shiina H, Igawa M, Dahiya R. Polymorphisms of estrogen receptor alpha in prostate cancer. *Mol Carcinog* 2003;37(4):202-208.
  217. Suzuki K, Nakazato H, Matsui H, Koike H, Okugi H, Kashiwagi B, Nishii M, Ohtake N, Nakata S, Ito K, Yamanaka H. Genetic polymorphisms of estrogen receptor alpha, CYP19, catechol-O-methyltransferase are associated with familial prostate carcinoma risk in a Japanese population. *Cancer* 2003;98(7):1411-1416.
  218. Low YL, Taylor JI, Grace PB, Mulligan AA, Welch AA, Scollen S, Dunning AM, Luben RN, Khaw KT, Day NE, Wareham NJ, Bingham SA. Phytoestrogen exposure, polymorphisms in COMT, CYP19, ESR1, and SHBG genes, and their associations with prostate cancer risk. *Nutr Cancer* 2006;56(1):31-39.
  219. Sobti RC, Gupta L, Singh SK, Seth A, Kaur P, Thakur H. Role of hormonal genes and risk of prostate cancer: gene-gene interactions in a North Indian population. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;185(2):78-85.
  220. Cancel-Tassin G, Latil A, Rousseau F, Mangin P, Bottius E, Escary JL, Berthon P, Cussenot O. Association study of polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and prostate cancer risk. *Eur Urol* 2003;44(4):487-490.
  221. Cunningham JM, Hebring SJ, McDonnell SK, Cicek MS, Christensen GB, Wang L, Jacobsen SJ, Cerhan JR, Blute ML, Schaid DJ, Thibodeau SN. Evaluation of genetic variations in the androgen and estrogen metabolic pathways as risk factors for sporadic and familial prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(5):969-978.
  222. McIntyre MH, Kantoff PW, Stampfer MJ, Mucci LA, Parslow D, Li H, Gaziano JM, Abe M, Ma J. Prostate cancer risk and ESR1 TA, ESR2 CA repeat polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(11):2233-2236.
  223. Sun YH, Yang B, Wang XH, Xu CL, Gao XF, Gao X, Wang LH. [Association between single-nucleotide polymorphisms in estrogen

- receptor beta gene and risk of prostate cancer]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2005;43(14):948-951.
224. Thellenberg-Karlsson C, Lindstrom S, Malmer B, Wiklund F, Augustsson-Balter K, Adami HO, Stattin P, Nilsson M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Gronberg H. Estrogen receptor beta polymorphism is associated with prostate cancer risk. *Clin Cancer Res* 2006;12(6):1936-1941.
  225. Chae YK, Huang HY, Strickland P, Hoffman SC, Helzlsouer K. Genetic polymorphisms of estrogen receptors alpha and beta and the risk of developing prostate cancer. *PLoS One* 2009;4(8):e6523.
  226. Nicolaiew N, Cancel-Tassin G, Azzouzi AR, Grand BL, Mangin P, Cormier L, Fournier G, Giordanella JP, Pouchard M, Escary JL, Valeri A, Cussenot O. Association between estrogen and androgen receptor genes and prostate cancer risk. *Eur J Endocrinol* 2009;160(1):101-106.
  227. Guillemette C, Millikan RC, Newman B, Housman DE. Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 and association with breast cancer among African Americans. *Cancer Res* 2000;60(4):950-956.
  228. Guillemette C, De Vivo I, Hankinson SE, Haiman CA, Spiegelman D, Housman DE, Hunter DJ. Association of genetic polymorphisms in UGT1A1 with breast cancer and plasma hormone levels. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(6):711-714.
  229. Duguay Y, McGrath M, Lepine J, Gagne JF, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ, Plante M, Tetu B, Belanger A, Guillemette C, De Vivo I. The functional UGT1A1 promoter polymorphism decreases endometrial cancer risk. *Cancer Res* 2004;64(3):1202-1207.
  230. Cecchin E, Russo A, Corona G, Campagnutta E, Martella L, Boiocchi M, Toffoli G. UGT1A1\*28 polymorphism in ovarian cancer patients. *Oncol Rep* 2004;12(2):457-462.
  231. van der Logt EM, Bergevoet SM, Roelofs HM, van Hooijdonk Z, te Morsche RH, Wobbes T, de Kok JB, Nagengast FM, Peters WH. Genetic polymorphisms in UDP-glucuronosyltransferases and glutathione S-transferases and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis* 2004;25(12):2407-2415.

232. Trapman J, Brinkmann AO. The androgen receptor in prostate cancer. *Pathol Res Pract* 1996;192(7):752-760.
233. De Marzo AM, Nelson WG, Meeker AK, Coffey DS. Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *J Urol* 1998;160(6 Pt 2):2381-2392.
234. Cude KJ, Dixon SC, Guo Y, Lisella J, Figg WD. The androgen receptor: genetic considerations in the development and treatment of prostate cancer. *J Mol Med* 1999;77(5):419-426.
235. Bashirelahi N, Kneussl ES, Vassil TC, Young JD, Jr., Sanefugi H, Trump B. Measurement and characterization of estrogen receptors in the human prostate. *Prog Clin Biol Res* 1979;33:65-84.
236. Kregge JH, Hodgins JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(26):15677-15682.
237. Chang WY, Prins GS. Estrogen receptor-beta: implications for the prostate gland. *Prostate* 1999;40(2):115-124.
238. Gustafsson JA. Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 1999;163(3):379-383.
239. Bolton JL, Thatcher GR. Potential mechanisms of estrogen quinone carcinogenesis. *Chem Res Toxicol* 2008;21(1):93-101.
240. Chang JJ, Shinohara K, Hovey RM, Montgomery C, Presti JC, Jr. Prospective evaluation of systematic sextant transition zone biopsies in large prostates for cancer detection. *Urology* 1998;52(1):89-93.
241. Presti JC, Jr., Chang JJ, Bhargava V, Shinohara K. The optimal systematic prostate biopsy scheme should include 8 rather than 6 biopsies: results of a prospective clinical trial. *J Urol* 2000;163(1):163-166; discussion 166-167.
242. Hodge KK, McNeal JE, Terris MK, Stamey TA. Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate. *J Urol* 1989;142(1):71-74; discussion 74-75.
243. Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Lucia MS, Goodman PJ, Crowley JJ, Parnes HL, Coltman CA, Jr. Operating characteristics of prostate-



- specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/ml or lower. *JAMA* 2005;294(1):66-70.
244. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA, Jr. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004;350(22):2239-2246.
  245. Mhatre AN, Trifiro MA, Kaufman M, Kazemi-Esfarjani P, Figlewicz D, Rouleau G, Pinsky L. Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Genet* 1993;5(2):184-188.
  246. Shimada N, Sobue G, Doyu M, Yamamoto K, Yasuda T, Mukai E, Kachi T, Mitsuma T. X-linked recessive bulbospinal neuronopathy: clinical phenotypes and CAG repeat size in androgen receptor gene. *Muscle Nerve* 1995;18(12):1378-1384.
  247. Nakajima H, Kimura F, Nakagawa T, Ikemoto T, Furutama D, Shinoda K, Kato S, Shimizu A, Ohsawa N. Effects of androgen receptor polyglutamine tract expansion on proliferation of NG108-15 cells. *Neurosci Lett* 1997;222(2):83-86.
  248. MacLean HE, Warne GL, Zajac JD. Spinal and bulbar muscular atrophy: androgen receptor dysfunction caused by a trinucleotide repeat expansion. *J Neurol Sci* 1996;135(2):149-157.
  249. Trapman J, Cleutjens KB. Androgen-regulated gene expression in prostate cancer. *Semin Cancer Biol* 1997;8(1):29-36.
  250. Feldman D. Androgen and vitamin D receptor gene polymorphisms: the long and short of prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(2):109-111.
  251. Hsing AW, Gao YT, Wu G, Wang X, Deng J, Chen YL, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Benichou J, Chang C. Polymorphic CAG and GGN repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study in China. *Cancer Res* 2000;60(18):5111-5116.
  252. Li C, Gronberg H, Matsuyama H, Weber G, Nordenskjold M, Naito K, Bergh A, Bergerheim U, Damber JE, Larsson C, Ekman P. Difference

- between Swedish and Japanese men in the association between AR CAG repeats and prostate cancer suggesting a susceptibility-modifying locus overlapping the androgen receptor gene. *Int J Mol Med* 2003;11(4):529-533.
253. Gsur A, Preyer M, Haidinger G, Zidek T, Madersbacher S, Schatzl G, Marberger M, Vutuc C, Micksche M. Polymorphic CAG repeats in the androgen receptor gene, prostate-specific antigen polymorphism and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2002;23(10):1647-1651.
  254. Rodriguez-Gonzalez G, Cabrera S, Ramirez-Moreno R, Bilbao C, Diaz-Chico JC, Serra L, Chesa N, Cabrera JJ, Diaz-Chico BN. Short alleles of both GGN and CAG repeats at the exon-1 of the androgen receptor gene are associated to increased PSA staining and a higher Gleason score in human prostatic cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;113(1-2):85-91.
  255. Nam RK, Elhaji Y, Krahm MD, Hakimi J, Ho M, Chu W, Sweet J, Trachtenberg J, Jewett MA, Narod SA. Significance of the CAG repeat polymorphism of the androgen receptor gene in prostate cancer progression. *J Urol* 2000;164(2):567-572.
  256. Modugno F, Weissfeld JL, Trump DL, Zmuda JM, Shea P, Cauley JA, Ferrell RE. Allelic variants of aromatase and the androgen and estrogen receptors: toward a multigenic model of prostate cancer risk. *Clin Cancer Res* 2001;7(10):3092-3096.
  257. Kunnas TA, Laippala P, Penttila A, Lehtimäki T, Karhunen PJ. Association of polymorphism of human alpha oestrogen receptor gene with coronary artery disease in men: a necropsy study. *BMJ* 2000;321(7256):273-274.
  258. Lu H, Higashikata T, Inazu A, Nohara A, Yu W, Shimizu M, Mabuchi H. Association of estrogen receptor-alpha gene polymorphisms with coronary artery disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(5):817-823.
  259. Fytli P, Giannatou E, Papanikolaou V, Stripeli F, Karachalios T, Malizos K, Tsezou A. Association of repeat polymorphisms in the estrogen receptors alpha, beta, and androgen receptor genes with knee osteoarthritis. *Clin Genet* 2005;68(3):268-277.

260. van Meurs JB, Schuit SC, Weel AE, van der Klift M, Bergink AP, Arp PP, Colin EM, Fang Y, Hofman A, van Duijn CM, van Leeuwen JP, Pols HA, Uitterlinden AG. Association of 5' estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. *Hum Mol Genet* 2003;12(14):1745-1754.
261. Georgiou I, Syrrou M, Bouba I, Dalkalitsis N, Paschopoulos M, Navrozoglou I, Lolis D. Association of estrogen receptor gene polymorphisms with endometriosis. *Fertil Steril* 1999;72(1):164-166.
262. Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, Lin CC, Tsai CH. Estrogen receptor alpha dinucleotide repeat and cytochrome P450c17alpha gene polymorphisms are associated with susceptibility to endometriosis. *Fertil Steril* 2005;83(3):567-572.
263. Westberg L, Baghaei F, Rosmond R, Hellstrand M, Landen M, Jansson M, Holm G, Bjorntorp P, Eriksson E. Polymorphisms of the androgen receptor gene and the estrogen receptor beta gene are associated with androgen levels in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(6):2562-2568.
264. Ogawa S, Hosoi T, Shiraki M, Orimo H, Emi M, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S. Association of estrogen receptor beta gene polymorphism with bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269(2):537-541.
265. Scariano JK, Simplicio SG, Montoya GD, Garry PJ, Baumgartner RN. Estrogen receptor beta dinucleotide (CA) repeat polymorphism is significantly associated with bone mineral density in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2004;74(6):501-508.
266. Ogawa S, Emi M, Shiraki M, Hosoi T, Ouchi Y, Inoue S. Association of estrogen receptor beta (ESR2) gene polymorphism with blood pressure. *J Hum Genet* 2000;45(6):327-330.
267. Takeo C, Negishi E, Nakajima A, Ueno K, Tatsuno I, Saito Y, Amano K, Hirai A. Association of cytosine-adenine repeat polymorphism of the estrogen receptor-beta gene with menopausal symptoms. *Gend Med* 2005;2(2):96-105.

268. Setiawan VW, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ, De Vivo I. Estrogen receptor beta (ESR2 ) polymorphisms and endometrial cancer (United States). *Cancer Causes Control* 2004;15(6):627-633.
269. Fodstad P, Bjoro T, Torlakovic G, Fossa SD. No association of serum gonadal or pituitary hormones with prognostic parameters in stages T1 to T3 PN0M0 prostate cancer. *J Urol* 2002;168(3):1188-1192.
270. Vallee M, Albert C, Beaudry G, Hum DW, Belanger A. Isolation and characterization of the monkey UDP-glucuronosyltransferase cDNA clone monUGT1A01 active on bilirubin and estrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;77(4-5):239-249.
271. Albert C, Barbier O, Vallee M, Beaudry G, Belanger A, Hum DW. Distribution of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase (UGT) expression and activity in cynomolgus monkey tissues: evidence for differential expression of steroid-conjugating UGT enzymes in steroid target tissues. *Endocrinology* 2000;141(7):2472-2480.
272. Fisher MB, Vandenbranden M, Findlay K, Burchell B, Thummel KE, Hall SD, Wrighton SA. Tissue distribution and interindividual variation in human UDP-glucuronosyltransferase activity: relationship between UGT1A1 promoter genotype and variability in a liver bank. *Pharmacogenetics* 2000;10(8):727-739.
273. Biondi ML, Turri O, Dilillo D, Stival G, Guagnellini E. Contribution of the TATA-box genotype (Gilbert syndrome) to serum bilirubin concentrations in the Italian population. *Clin Chem* 1999;45(6 Pt 1):897-898.
274. Kohle C, Mohrle B, Munzel PA, Schwab M, Wernet D, Badary OA, Bock KW. Frequent co-occurrence of the TATA box mutation associated with Gilbert's syndrome (UGT1A1\*28) with other polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase-1 locus (UGT1A6\*2 and UGT1A7\*3) in Caucasians and Egyptians. *Biochem Pharmacol* 2003;65(9):1521-1527.
275. Tukey RH, Strassburg CP, Mackenzie PI. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferases and irinotecan toxicity. *Mol Pharmacol* 2002;62(3):446-450.

