



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Καψωριτάκης Ανδρέας

*Διδακτορική Διατριβή*

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΤΗΣ ΟΔΟΥ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ  
ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ  
ΠΡΟΣΤΑΤΗ»**

υπό

**ΧΡΥΣΟΥΛΑΣ Γ. ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ**

Βιολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2020

© 2020 Χρυσούλα Βασιλείου

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (7η/19.02.2020):**

- 1<sup>ος</sup> Εξεταστής  
(Επιβλέπων)**      **Δρ. Ιωάννης Στεφανίδης**  
Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας
- 2<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Δρ. Χρήστος Παπανδρέου**  
Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
- 3<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Δρ. Παναγιώτης Λιάκος**  
Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Δρ. Βασίλειος Τζώρτζης**  
Καθηγητής Ουρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Δρ. Σταύρος Γκράβας**  
Καθηγητής Ουρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Δρ. Αλεξάνδρα Μπαργιώτα**  
Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Δρ. Κωνσταντίνος Δήμας**  
Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Στην οικογένειά μου

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με το εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το διάστημα 2012-2020. Η διατριβή το διάστημα 2012-2015 εκπονήθηκε με επιβλέποντα τον Καθηγητή κ.Χρήστο Παπανδρέου. Το 2015 λόγω της μετάβασης του Καθηγητή κ. Χρήστου Παπανδρέου στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, η διατριβή συνεχίστηκε υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ.Ιωάννη Στεφανίδη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω από βάθους καρδιάς όλους όσους συνέβαλλαν στην πραγματοποίηση της διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ.Χρήστο Παπανδρέου για όλη τη συμβολή του στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης, τη σύλληψη του θέματος και την ανάθεση της διατριβής καθώς και την πολύτιμη βοήθεια και την καθοδήγησή του κατά τη διεξαγωγή της διατριβής. Πάνω από όλα όμως τον ευχαριστώ για το συνεχές ενδιαφέρον του και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ.Παναγιώτη Λιάκο για τη στήριξή του, τις συμβουλές και επισημάνσεις του καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής οι οποίες υπήρξαν υπερπολύτιμες. Χωρίς την βοήθεια του δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ.Ιωάννη Στεφανίδη για την συνεργασία του κατά τα τελευταία στάδια ολοκλήρωσης της διατριβής. Ευχαριστώ επίσης τον Αναπλ.Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Δήμα για τη συνεργασία και τις προτάσεις του κατά η διεξαγωγή της διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τους Καθηγητές κ. Β. Τζώρτζη και κ. Σ. Γκράβα και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Α. Μπαργιώτα για το χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση και κρίση της διατριβής μου.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας και ιδιαίτεως τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Χριστίνα Μπεφάνη για την άριστη συνεργασία, τη βοήθειά της σε θεωρητικό αλλά και πρακτικό επίπεδο, τις συμβουλές της αλλά και την πολύτιμη παρέα της καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον φίλο μου Στάθη Καπούλα για τη συμπαράστασή του καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής αλλά και για τις άκρως ενδιαφέρουσες επιστημονικές συζητήσεις μας.

Πάνω από όλα όμως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, που έχει αποτελέσει το πιο σημαντικό ψυχικό και υλικό στήριγμά μου καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μου και των σπουδών μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το σύζυγό μου Τάσο για την υπομονή, κατανόηση και την ενθάρρυνσή του σε δύσκολες στιγμές.

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα: Χρυσούλα  
Επώνυμο: Βασιλείου  
Ημερομηνία γέννησης: 10-11-1985  
Όνομα πατρός: Γεώργιος  
e-mail: [chvasil@hotmail.gr](mailto:chvasil@hotmail.gr)

### ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

**2012-2020**

#### Διδακτορική Διατριβή

«Μελέτη της σχέσης της οδού των νευροπεπτιδίων και της ενδοκυττάριας στεροειδογένεσης στον καρκίνο του προστάτη».

Επιβλέποντες: Καθηγητής Χρήστος Παπανδρέου και Καθηγητής Ιωάννης Στεφανίδης, τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**2008-2009**

#### Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, ΠΜΣ με εξειδίκευση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή

Τομέας Μαιευτικής και Γυναικολογίας, τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Βαθμός πτυχίου: 8.95/10

**2003-2008**

#### Πτυχίο Βιολογίας με εξειδίκευση στη Μοριακή Βιολογία, Γενετική και Βιοτεχνολογία

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Βαθμός πτυχίου: 7.25/10

## ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

14/01/19 – σήμερα

### Clinical Project Manager

CATO-SMS, περιοχή Schiphol, Ολλανδία

30/11/15 – 31/1/2018

### Επιτηρητής Κλινικών Μελετών (Clinical Research Associate)

Zeincro Hellas SA, συνεργάτης της φαρμακευτικής εταιρείας Amgen

8/10/12 – 27/11/15

### Συντονιστής κλινικών μελετών (Study Coordinator)

Τμήμα κλινικής Ογκολογίας, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας / Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Ογκολογίας (Hecog)

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Vlachostergios PJ, Gioulbasanis I., Ghosh S., Tsatsanis G., Papatsibas G., Xyrafas A., Hatzidaki E, **Vassiliou C**, Kamposioras K., Aggelaki S, Margioris AN, Nasi D., Georgoulas V, Papandreou CN.  
“Predictive and prognostic value of LPS-stimulated cytokine secretion in metastatic non-small cell lung cancer”, Clin Transl Oncol (2013) 15: 903. doi:10.1007/s12094-013-1021-5
2. **Vasileiou C.**, Befani C, Dimas K, Liakos P, Papandreou C.  
“FGF-2 and HGF reverse abiraterone’s effect on intracellular levels of DHT in androgen dependent and androgen independent prostate cancer cell lines”

Η εργασία υποβλήθηκε στο επιστημονικό περιοδικό JBUON (IF 2018-9: 1,379), έγινε δεκτή (27-08-2019) και βρίσκεται υπό εκτύπωση (Anticipated publication: vol 25, no. 2,2020, 2018 issue)



## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. **Vasileiou C.**, Hatzidaki E., Karkabounas A., Maragouli E., Vaiou M., Dimas K., Liakos P., Lekka M., Papandreou CN.  
ET-1, FGF-2 and HGF induce intracellular steroidogenesis in prostate cancer cells.  
American Society of Clinical Oncology Annual Meeting, Chicago USA, June 2013
2. Gioulbasanis I., Kakalou D., **Vassiliou Ch.**, Tzanis St., Perdikouri EI., Makridou M., Nasi D., Kamposioras K., Bacavou Ch., P.J. Vlachostergios, Vlychou M., Papandreou CN.  
“Which nutritional assessment tool is related with musculature and functional status in patients with cachexia-related tumors?” Cancer Cachexia Conference, Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches, Boston, Massachusetts USA, September 2012
3. Gioulbasanis I., **Vassiliou Ch.**, Kakalou D., Perdikouri EI., Tzanis St., Vlychou M., Papatsibas G., Makridou M., Katsioulis Va., Chatzidaki E., Zafeiriou A., Papandreou CN.  
“Systemic inflammation is related with lipid infiltration of muscles in patients with cachexia-related tumors” J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012 3:281-301
4. Βασιλείου Χ., Αραμπατζή Η., Κοσμίδης Ε., Παπαευθυμίου Χ., Θεοφιλίδης Γ.  
“In vivo αξιολόγηση της δράσης του νικοτινικού εντομοκτόνου imidacloprid στον αναπνευστικό ρυθμό του επίμυος”; 21st Annual Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience; 30 Νοεμβρίου -1 Δεκεμβρίου 2007, Θεσσαλονίκη
5. **Βασιλείου Χ.**, Αραμπατζή Η., Παπαευθυμίου Χ., Θεοφιλίδης Γ.  
“Αξιολόγηση της δράσης του νικοτινικού εντομοκτόνου imidacloprid στο καρδιοαναπνευστικό σύστημα του επίμυος”;  
29th Annual Scientific Meeting of EEBE; Μάιος 17-19 2007, Καβάλα

## ΕΙΔΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

### Ξένες γλώσσες

Αγγλικά: Άριστη Γνώση (Proficiency in English)

Γαλλικά: Πολύ Καλή Γνώση ( Επίπεδο B2)

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΤΗΣ ΟΔΟΥ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ  
ΤΗΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ  
ΠΡΟΣΤΑΤΗ»**

**ΧΡΥΣΟΥΛΑ ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2020

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. Δρ. Ιωάννης Στεφανίδης** Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπων**)
- 2. Δρ. Χρήστος Παπανδρέου** Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
- 3. Δρ. Παναγιώτης Λιάκος** Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αμπιρατερόνη είναι ένας αναστολέας βιοσύνθεσης ανδρογόνων ο οποίος αναστέλλει μη αντιστρεπτά τη λειτουργία του ενζύμου CYP17 (17α- υδροξυλάση και C17,20 -λυάση). Το ένζυμο CYP17 απαιτείται για τη σύνθεση της τεστοστερόνης στον οργανισμό. Τα νευροπεπτίδια όπως η ενδοθηλίνη-1 (ET-1) και οι αυξητικοί παράγοντες όπως ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών τύπου 2 (FGF-2) και ο αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων (HGF) υπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις στα καρκινικά προστατικά κύτταρα και το καθένα ξεχωριστά έχει δείξει να συμμετέχει στην ανάπτυξη και πρόοδο του καρκίνου του προστάτη. Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η μελέτη της επαγόμενης από ET-1, FGF-2 and HGF ενδοκυττάριας στεροειδογένεσης και του ρόλου της ως μηχανισμός αντίστασης στη δράση της αμπιρατερόνης στον καρκίνο του προστάτη.

Στη παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν καθιερωμένες κυτταρικές σειρές LNCaP και PC3 ως *in vitro* μοντέλα του ανδρογόνου-εξαρτώμενου και ανδρογόνου-ανεξάρτητου τύπου καρκίνου του προστάτη αντίστοιχα. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με ET-1, FGF-2, HGF ή/και αμπιρατερόνη για 24 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης, προσδιορίστηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης και διυδροτεστοστερόνης με τη μέθοδο ανοσοπροσρόφησης, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός με τη μέθοδο MTT και η έκφραση των πρωτεϊνών akt/p-akt and p-S6RP, p70S6 με ανοσοαποτύπωση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η ET-1 έχει ρυθμιστικό ρόλο στη στεροειδογένεση κυρίως αυξάνοντας τα ενδοκυττάρια επίπεδα της DHT στα PC3 κύτταρα ενώ παρατηρήθηκε ότι δεν έχει σημαντική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των δύο καθιερωμένων κυτταρικών σειρών που μελετήσαμε. Η παρουσία αμπιρατερόνης με διάφορες συγκεντρώσεις έδειξε μία μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων DHT στα κύτταρα PC3 και LNCaP. Όσον αφορά το ρυθμό πολλαπλασιασμού, τα κύτταρα LNCaP έδειξαν στατιστικά σημαντικές μειώσεις στο πολλαπλασιασμό σ' όλες τις συγκεντρώσεις αμπιρατερόνης που καλλιεργήθηκαν και μάλιστα με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Επίσης παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα PC3 έδειξαν μειωμένο πολλαπλασιασμό μόνο όταν σε αυτά χορηγήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση αμπιρατερόνης.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν για πρώτη φορά ότι η αμπιρατερόνη κατέχει κυρίαρχο ρόλο στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και όχι μόνο στην αναστολή της στεροειδογένεσης. Επιπλέον, μέσω πειραμάτων συγχορήγησης αμπιρατερόνης και ET-1 παρατηρήθηκε ότι η ET-1 δρα σα μηχανισμός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης μέσω

αύξησης των επιπέδων DHT. Συνεχίζοντας, η αμπιρατερόνη στοχεύει το μονοπάτι PI3K/akt για την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρουσία ET-1.

Στη συνέχεια της έρευνας μας παρατηρήθηκε ότι οι παράγοντες FGF-2 και HGF μειώνουν τα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης και στις δύο κυτταρικές σειρές, ενώ ο HGF μόνο βρέθηκε να αυξάνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα DHT στα PC3 κύτταρα. Ενδιαφέρον προκαλεί ότι η συγχορήγηση αμπιρατερόνης με FGF-2 ή HGF βρέθηκε να προάγει την ενδοκυττάρια σύνθεση DHT χωρίς να επηρεάζει τη σύνθεση 17-OH προγεστερόνης.

Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν για πρώτη φορά ότι η ET-1 και οι αυξητικοί παράγοντες FGF-2 και HGF δρουν ως μηχανισμοί διαφυγής συνεισφέροντας στην ανάπτυξη αντίστασης στην αμπιρατερόνη. Η δράση τους μέσω της αποκατάστασης της σύνθεσης ανδρογόνων στο περιβάλλον του όγκου μπορεί να συνεισφέρει στην πρόοδο της ασθένειας.

## ABSTRACT

Abiraterone is an androgen biosynthesis inhibitor that selectively inhibits the enzyme CYP17 (17 $\alpha$ - Hydroxylase and C17,20 -lyase) irreversibly. These CYP17 enzymes are required for the synthesis of testosterone in the body. Neuropeptides, like endothelin-1 (ET-1) and growth factors like Fibroblast Growth Factor -2 (FGF-2) and Hepatocyte Growth Factor (HGF) exist in high levels in prostate cancer cells and each factor individually has shown to contribute in the development and progression of prostate cancer. The aim of this study is to investigate whether the intracellular steroidogenesis triggered by ET-1, FGF-2 or HGF acts as a resistant mechanism in abiraterone's action in prostate cancer.

In this research, LNCaP and PC3 cells were used as *in vitro* models of androgen dependent (AD) (LNCaP) and androgen independent (AI) (PC3) prostate cancer. Cells were incubated with ET-1, FGF-2, HGF and/or abiraterone for 24 hours. After the period of 24 hours, the intracellular levels of 17-OH progesterone and dihydrotestosterone (DHT) were determined by ELISA method, proliferation rate was determined with MTT method and the expression of akt/p-akt, p-S6RP and p70S6 proteins was determined with Western Blot.

According to our results, ET-1 has a regulatory role in steroidogenesis by mainly increasing the intracellular levels of DHT in PC3 cells but has no significant effect in the proliferation rate of both PC3 and LNCaP cells. The presence of different concentrations of abiraterone showed a decrease in intracellular levels of DHT in PC3 and LNCaP cells. Regarding the proliferation rate, LNCaP cells showed statistically significant decreases in proliferation in a dose-dependent way with all abiraterone concentrations that were used. Furthermore, PC3 cells showed a reduction in proliferation rate only when the highest concentration of abiraterone was used.

Our findings highlight for the first time that abiraterone seems to have a pre-dominant role in the inhibition of cell proliferation and not only in the inhibition of steroidogenesis. Furthermore, with the experiments of co-administration of ET-1 and abiraterone, it was shown that ET-1 acts as an escape mechanism in abiraterone's action via the increase of DHT levels. Additionally, abiraterone uses PI3K/akt pathway to inhibit cell proliferation in the presence of ET-1.

Moreover, in the next steps of our research FGF-2 and HGF were found to decrease the intracellular levels of 17-OH progesterone in both cell lines, whereas HGF alone found to increase the intracellular levels of DHT only in PC3 cells. Interestingly however, the simultaneous exposure

of cells to abiraterone and FGF-2 or HGF while it does not result to changes in the intracellular levels of 17-OH progesterone, found to result to increased intracellular levels of DHT.

These findings suggest for the first time that ET-1, FGF-2 and HGF may act as escape mechanisms aiding the development of resistance to abiraterone. Their action by restoring intratumoral androgen synthesis in tumor environment may contribute to disease progression.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AA,ABI	Abiraterone Acetate, αμπιρατερόνη
ACTH	Φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη
ADT	Θεραπεία στέρησης ανδρογόνων
AED	Ανδροστενδιόνη
AR	Ανδρογονικός υποδοχέας
ARE	Androgen Response Elements
BPH	Καλοήθης υπερπλασία στον προστάτη
BSA	Αλβουμίνη ορού βοδιού
CRPC	Ευνουχο-άντοχος τύπος καρκίνου του προστάτη
DAG	Διακυλογλυκερόλη
DAPI	4', 6-διαμιδινο-2-φενυλινδόλιο
DBD	DNA binding domain
DHEA	Δωδροεπιανδροστερόνη
DHEA-S	Θειϊκή διωδροεπιανδροστερόνη
DHT	Δωδροτεστοστερόνη
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
ECE-1	Endothelin converting enzyme-1
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EGF	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EGFR	Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
ET-1	Ενδοθηλίνη-1
ET-2	Ενδοθηλίνη-2
ET-3	Ενδοθηλίνη-3
ETAR	Υποδοχέας A ενδοθηλίνης

ETBR	Υποδοχέας Β ενδοθηλίνης
FBS	Ορός εμβρύου βοός
FGF	Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών
FGFR	Υποδοχέας αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών
GPCRs	G protein –coupled receptors
HGF	Αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων
HRE	Hormone Response Elements
HSD	Υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση
IGF	Αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης
IL-6	Ιντερλευκίνη-6
LBD	Ligand binding domain
LH	Ωχρινοτρόπος ορμόνη
LHRH	Ορμόνη απελευθέρωσης της ωχρινοτρόπου ορμόνης
MAPK	Πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα
NTD	N-terminal transaction domain
NEP	Ουδέτερη ενδοπεπτιδάση
PBS	Διάλυμα φυσιολογικής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων
PCa	Καρκίνος του προστάτη
PDGF	Αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων
PI3K	Κινάση της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης
PKB	Πρωτεΐνη της κινάσης Β
PKC	Πρωτεΐνη της κινάσης C
PLC	Φωσφολιπάσης C
PMSF	Φαινυλομεθυλο φθοριούχος εστέρας του σουλφονικού οξέος



PSA	Ειδικό προστατικό αντιγόνο
P450	Pigment 450
RNA	Ριβονουκλεϊνικό οξύ
T	Τεστοστερόνη
Tris	Τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο
UGM	Μεσέγγυμα του ουρογεννητικού κόλπου

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	21
1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ.....	21
1.1.1 Επιδημιολογία.....	21
1.1.2 Παράγοντες κινδύνου.....	22
1.1.3 Διάγνωση και σταδιοποίηση .....	24
1.1.4 Θεραπευτική αντιμετώπιση της ασθένειας .....	26
1.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ.....	29
1.2.1 Η διαδικασία της στεροειδογένεσης .....	29
1.2.2 Μονοπάτια στεροειδογένεσης στον προστάτη .....	34
1.2.3 Στεροειδογένεση και καρκίνος του προστάτη .....	35
1.3 Ο ΑΝΔΡΟΓΟΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ.....	42
1.3.1 Δομή του AR.....	42
1.3.2 Ο ρόλος του AR στον προστάτη .....	43
1.3.3 Ο ρόλος του AR στον καρκίνο του προστάτη – Ανάπτυξη μηχανισμών αντίστασης που οδηγούν σε CRPC.....	45
1.4 Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΤΑ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΑ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	47
1.4.1 Νευροπεπτίδια.....	47
1.4.2 Η ουδέτερη ενδοπεπτιδάση NEP .....	52
1.4.3 Αυξητικοί παράγοντες.....	54
1.5 ΕΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ ΣΤΟΧΕΥΟΝΤΑΣ ΤΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ .....	64
1.5.1 Αμπιρατερόνη .....	64
2. ΣΚΟΠΟΣ .....	69
2.1 ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	69
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ .....	72
3.1 ΥΛΙΚΑ.....	72
3.1.1 Κυτταρικές σειρές .....	72
3.1.2 Χημικές ενώσεις – Αντιδραστήρια .....	73

3.1.3 Αντισώματα .....	73
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ .....	74
3.2.1 Κυτταρικές σειρές – Καλλιέργεια κυττάρων.....	74
3.2.2 Ψύξη κυττάρων και επανέναρξη καλλιιεργειών .....	74
3.2.3 Συνθήκες επώασης κυττάρων κατά τις πειραματικές διαδικασίες.....	75
3.2.4 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα .....	76
3.2.5 Προσδιορισμός ενζυματικής δραστικότητας NEP.....	76
3.2.6 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης .....	77
3.2.7 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση .....	78
3.2.8 Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης 17-OH προγεστερόνης και διωδροτεστοστερόνης σε κυτταρικά λύματα κυτταροκαλλιιεργειών (ELISA) .....	80
3.2.9 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός.....	83
3.2.10 Στατιστική ανάλυση .....	84
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	85
4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ-1 ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΜΠΙΡΑΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ PC3 ΚΑΙ LNCaP .....	85
4.1.1 Η επίδραση της ενδοθηλίνης-1 στη στεροειδογένεση και τον πολλαπλασιασμό σε κύτταρα PC3 και LNCaP .....	85
4.1.2 Η επίδραση της αμπιρατερόνης στη στεροειδογένεση και τον πολλαπλασιασμό σε κύτταρα PC3 και LNCaP .....	87
4.1.3 Μελέτη της ET-1 ως μηχανισμός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης σε PC3 και LNCaP κύτταρα.....	91
4.1.4 Διερεύνηση του μηχανισμού της κατασταλτικής δράσης της αμπιρατερόνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.....	94
4.1.5 Έλεγχος της επίδρασης της ET-1 και της αμπιρατερόνης στην μετακίνηση του ανδρογονικού υποδοχέα (AR) στο εσωτερικό των κυττάρων PC3 και LNCaP.....	100
4.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ FGF-2 ΚΑΙ HGF ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΜΠΙΡΑΤΕΡΟΝΗ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ PC3 ΚΑΙ LNCaP .....	103
4.2.1 Η επίδραση του FGF-2 και του HGF στη στεροειδογένεση σε κύτταρα PC3 και LNCaP.....	103
4.2.2 Μελέτη του FGF-2 ως μηχανισμός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης σε κύτταρα PC3 και LNCaP .....	105

4.2.3 Μελέτη του HGF ως μηχανισμός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης σε κύτταρα PC3 και LNCaP .....	109
4.2.4 Έλεγχος της επίδρασης των αυξητικών παραγόντων FGF-2 και HGF στην μετακίνηση του ανδρογονικού υποδοχέα (AR) στο εσωτερικό των κυττάρων PC3 και LNCaP. ....	114
4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ET-1, ΤΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ FGF-2 ΚΑΙ HGF ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΜΠΙΡΑΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ VCaP..	116
4.3.1 Η επίδραση της ενδοθηλίνης-1 στη στεροειδογένεση και τον πολλαπλασιασμό σε κύτταρα VCaP .....	116
4.3.2 Η επίδραση της αμπιρατερόνης στη στεροειδογένεση και τον πολλαπλασιασμό σε κύτταρα VCaP .....	119
4.3.3 Μελέτη της ET-1 ως μηχανισμός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης σε κύτταρα VCaP. ....	121
4.3.4 Διερεύνηση του μηχανισμού της κατασταλτικής δράσης της αμπιρατερόνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. ....	125
4.3.5 Η επίδραση του FGF-2 και του HGF στη στεροειδογένεση σε κύτταρα VCaP.....	127
4.3.6 Μελέτη του FGF-2 και του HGF ως μηχανισμός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης σε VCaP κύτταρα .....	128
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	131
5.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ-1 ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΜΠΙΡΑΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ PC3 ΚΑΙ LNCaP .....	131
5.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ FGF-2 ΚΑΙ HGF ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΜΠΙΡΑΤΕΡΟΝΗ ΣΕ PC3 ΚΑΙ LNCaP ΚΥΤΤΑΡΑ .....	136
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	140

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

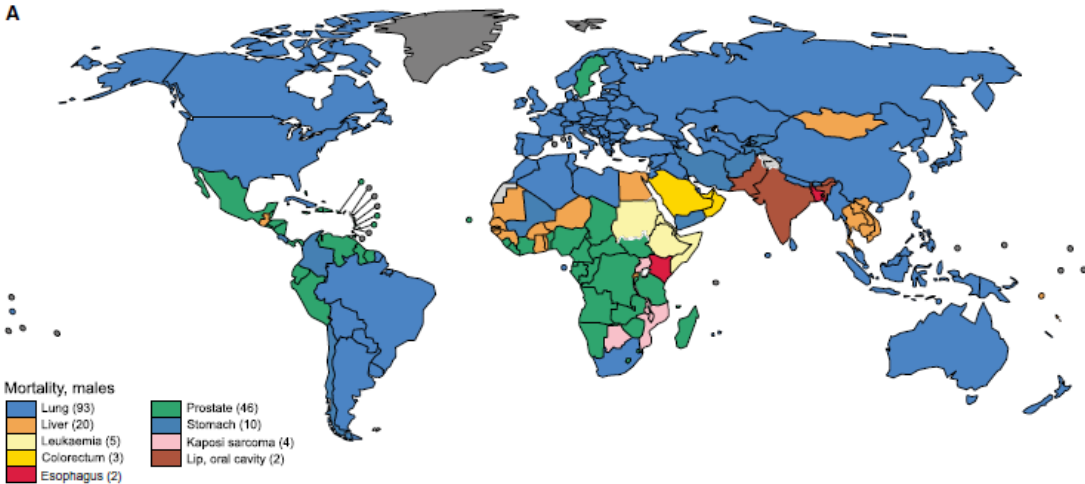
### 1.1.1 Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του προστάτη (PCa) είναι η πιο αιγιματική από τις συχνότερες κακοήθειες των συμπαγών οργάνων. Παγκοσμίως είναι ο πέμπτος πιο συχνός τύπος καρκίνου και ο δεύτερος πιο συχνός τύπος στους άντρες, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Στις ανεπτυγμένες χώρες ο καρκίνος του προστάτη αντιστοιχεί στο 15% όλων των ανδρικών κακοηθειών σε σχέση με το 4% στις αναπτυσσόμενες χώρες. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, μέχρι το τέλος του 2018, 1,3 εκατομύρια ασθενείς διαγνώστηκαν με καρκίνο του προστάτη ενώ συνέβησαν 359.000 θάνατοι που σχετίζονται με τη νόσο.

Για μία ασθένεια τόσο συχνή όσο ο καρκίνος του προστάτη, πολύ λίγα είναι γνωστά για την αιτιολογία της. Τα μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης σε άνδρες Αφρικανικής καταγωγής στην Αμερική και την Καραϊβική αντανακλούν μία εθνική και γενετική προδιάθεση αλλά υπάρχουν και άλλοι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με τη νόσο.

Παγκοσμίως, υπήρξε μια απότομη αύξηση της συχνότητας του καρκίνου προστάτη στις δυτικές κοινωνίες κυρίως στα τέλη της δεκαετίας του '80, που αντιστοιχούσε στη διάδοση της χρήσης του ελέγχου του ειδικού προστατικού αντιγόνου (Prostate Specific Antigen, PSA) για την διάγνωση της νόσου. Από την δεκαετία του 1990 και μετά υπάρχει μια σταθερή μικρή πτώση στην επίπτωσή της. Σχεδόν 6 στις 10 περιπτώσεις κακοηθείας του προστάτη διαγιγνώσκονται στις ηλικίες των 65 ετών και άνω. Είναι σπάνιο να παρουσιαστεί πριν την ηλικία των 40 ετών, αλλά η πιθανότητα ανάπτυξης PCa αυξάνεται ραγδαία μετά την ηλικία των 50. Η μέση ηλικία κατά το χρόνο της διάγνωσης είναι σχεδόν τα 66 χρόνια [1].

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ένας από τους πιο συχνά διαγνωσθέντες τύπους καρκίνου στους άνδρες σε πάνω από τις μισές χώρες του κόσμου (105 από 185) και κυρίως στην Αμερική, στη Βόρεια και Δυτική Ευρώπη, στην Αυστραλία/Νέα Ζηλανδία και σε αρκετές χώρες της Αφρικής (Εικόνα 1) [2].



**Εικόνα 1: Παγκόσμιος χάρτης που παρουσιάζει τη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες ανά χώρα για το 2018.** Ο αριθμός των χωρών που αντιστοιχεί σε κάθε κατηγορία αναγράφεται στην παρενθεση ενώ κάθε κατηγορία καρκίνου απεικονίζεται με διαφορετικό χρώμα.

Επειδή ο καρκίνος του προστάτη είναι νόσος ηλικιών άνω των 50 ετών, η παγκόσμια τάση για αύξηση του μέσου όρου ηλικίας του πληθυσμού σημαίνει ότι ο αριθμός των ανδρών με διάγνωση καρκίνου προστάτη αναμένεται να αυξηθεί το 2030 φτάνοντας τους 1,7 εκατομμύρια ασθενείς, με εκτιμώμενο αριθμό θανάτων έως τότε τους 499.000 [3].

### 1.1.2 Παράγοντες κινδύνου

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν καταδείξει έναν αριθμό αναγνωρισμένων και πιθανών παραγόντων κινδύνου για τον PCa. Η αύξηση της ηλικίας, η εθνικότητα και η γενετική προδιάθεση αποτελούν του τρεις βασικότερους παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση PCa. Ωστόσο, κλινικά δεδομένα δείχνουν ότι εξωγενείς παράγοντες κινδύνου όπως η διατροφή, η παχυσαρκία, το μοτίβο της σεξουαλικής συμπεριφοράς, η υπερϊώδης ακτινοβολία και η εργασιακή έκθεση είναι δυνατόν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη [4].

Πιο αναλυτικά:

1. **Ηλικία:** Ο καρκίνος του προστάτη έχει μία από τις πιο ισχυρές συσχετίσεις μεταξύ ηλικίας και κακοήθειας στον άνθρωπο, και είναι ο σημαντικότερος παράγοντας επίδρασης στην

- ανάπτυξη της νόσου. Η κλινική εμφάνιση της νόσου είναι σπάνια πριν την ηλικία των 40 ετών, ενώ η επίπτωσή της αυξάνει σημαντικά μετά την ηλικία των 60 ετών.
2. Φυλή: Υπάρχουν έντονες γεωγραφικές και φυλετικές διαφορές στην επίπτωση του κλινικού καρκίνου προστάτη. Ο κίνδυνος είναι υψηλότερος στην Βόρεια Αμερική και στην Δυτική Ευρώπη, και χαμηλότερος στην Άπω Ανατολή. Στις Η.Π.Α., ο κίνδυνος είναι υψηλότερος για τους μαύρους συγκριτικά με τους λευκούς, με εμφάνιση της νόσου σε νεαρότερες ηλικίες στους πρώτους. Οι Κινέζικες και Ιαπωνικές φυλές έχουν τη χαμηλότερη επίπτωση της νόσου [5].
  3. Κληρονομικότητα: Ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου αυξάνει κατά 3 φορές εάν υπάρχει πρώτου βαθμού συγγενής με καρκίνο προστάτη. Μεγαλύτερος αριθμός συγγενών με νόσο αυξάνει περαιτέρω τον κίνδυνο. Δύο ή τρεις συγγενείς πρώτου βαθμού αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης κατά 5 και 10 φορές αντίστοιχα. Περίπου το 9% όλων των περιστατικών καρκίνου προστάτη έχουν κληρονομική βάση [6].
  4. Ορμόνες: Η τεστοστερόνη (Testosterone, T) και ο πιο δραστικός μεταβολίτης της η διυδροτεστοστερόνη (dihydrotestosterone, DHT) είναι απαραίτητοι για την φυσιολογική ανάπτυξη του προστάτη, και επομένως μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεση του PCa. Ο καρκίνος του προστάτη δεν αναπτύσσεται ποτέ σε άτομα που έχουν ευνουχιστεί πριν την εφηβεία, ή σε άτομα με έλλειψη 5α-αναγωγάσης (το ένζυμο που μετατρέπει την τεστοστερόνη σε DHT) [7].
  5. Διατροφή και παχυσαρκία: Ο δυτικός τρόπος ζωής και ιδιαίτερα η κατανάλωση περισσότερων κορεσμένων λιπαρών, κόκκινου κρέατος και γαλακτοκομικών προϊόντων αυξάνουν την πιθανότητα κίνδυνου ανάπτυξης του καρκίνου του προστάτη [8]. Ο κίνδυνος εμφάνισης PCa σε υπέρβαρους άντρες είναι διπλάσιος του κανονικού [9], και μπορεί να έχει σχέση με την ενεργοποίηση της προκαρκινικής δράσης της οδού του αυξητικού παράγοντα της ινσουλίνης (insulin growth factor, IGF) [5].
  6. Σεξουαλικό ιστορικό: Πολυάριθμες μελέτες υπογραμμίζουν τη θετική συσχέτιση μεταξύ του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του προστάτη και του ιστορικού εμφάνισης σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων (όπως, γονόρροια και σύφιλη) [10]. Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες που καταδεικνύουν ότι δεν υπάρχει καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ της γονόρροιας ή της σύφιλης και του καρκίνου του προστάτη [11].

7. Υπεριώδης ακτινοβολία: Η θνησιμότητα από τον καρκίνο του προστάτη είναι αυξημένη σε γεωγραφικές περιοχές με αυξημένη έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα της βιταμίνης D, η σύνθεση της οποίας έχει σχέση με έκθεση στον ήλιο, είναι χαμηλότερα σε ασθενείς με καρκίνο προστάτη από ότι στο γενικό πληθυσμό. Όμως πρόσφατες μελέτες δεν κατέδειξαν μείωση του κινδύνου ανάπτυξης του καρκίνου προστάτη μετά από χημειοπροφύλαξη με χορήγηση βιταμίνης D [12].
8. Επάγγελμα: Σε πολλές μελέτες το είδος του επαγγέλματος σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Ο Ragin και οι συνεργάτες του [13], διερεύνησαν την επίδραση της χρήσης φυτοπροστατευτικών φαρμάκων από αγρότες με την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Η μελέτη βασίστηκε σε 3.978 επιβεβαιωμένα κρούσματα καρκίνου του προστάτη και σε 7.393 μάρτυρες. Διαπιστώθηκε ότι οι αγρότες είχαν περίπου τέσσερις φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη σε σύγκριση με τους μάρτυρες [13].

### 1.1.3 Διάγνωση και σταδιοποίηση

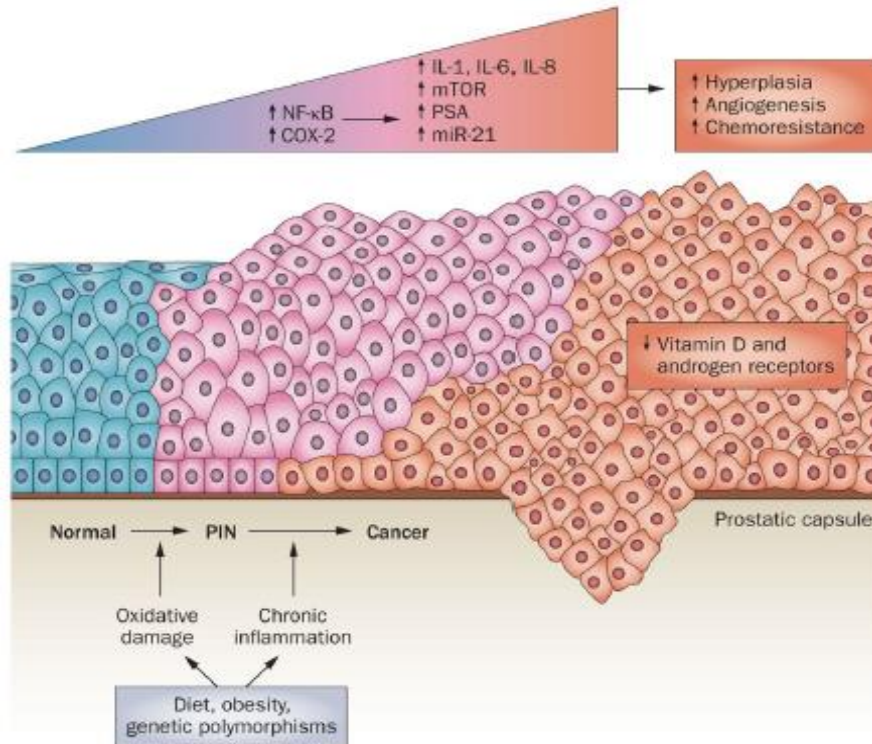
Η κλινικά εντοπισμένη νόσος είναι συνήθως ασυμπτωματική ή εκδηλώνεται με συμπτωματολογία καλοήθους προστατικής υπερτροφίας, όπως συχνουρία, αίσθημα έπειξης και δυσκολία στην έναρξη της ούρησης. Η κλινική παρουσίαση της τοπικά προχωρημένης νόσου εκδηλώνεται με συμπτώματα αιματουρίας, δυσουρίας, υπερηβικό άλγος, στυτική δυσλειτουργία, αιμοσπερμία, ακράτεια, ουρητηρική απόφραξη, συμπτώματα νεφρικής ανεπάρκειας και συμπτώματα από τον ορθό [5]. Τα αυξημένα επίπεδα του PSA και η παθολογική δακτυλική εξέταση ίσως να υποδηλώνουν την παρουσία καρκίνου του προστάτη. Τα ακριβή όρια τα οποία θεωρούνται φυσιολογικά για το PSA δεν έχουν ακόμα καθοριστεί αλλά τιμές >2,5-3 mg/ml χρησιμοποιούνται συχνά ως ένδειξη κακοηθείας στους νεότερους άντρες. Επίσης συνιστώνται και οι εξετάσεις των σχετικών δεικτών με το PSA, όπως η ταχύτητα PSA, η πυκνότητα PSA, ο δείκτης ελεύθερου προς συνδεδεμένου PSA, καθώς και τα ειδικά νορμογράμματα ηλικίας [14].

Η διάγνωση και η σταδιοποίηση του PCa βασίζεται στην παθολοανατομική (ή κυτταρολογική) επιβεβαίωση. Το διορθικό υπερηχογράφημα και οι κατευθυνόμενες βιοψίες συνιστώνται σαν μέθοδοι εξέτασης στις περισσότερες περιπτώσεις με υποψία καρκίνου του προστάτη. Συνιστάται να λαμβάνονται το λιγότερο 6-10 πλάγια κατευθυνόμενες βιοψίες με



βελόνη και περισσότερες βιοψίες σε μεγάλους αδένες. Η βιοψία της μεταβατικής ζώνης δεν συνιστάται την πρώτη φορά λόγω της μικρής πιθανότητας παρουσίας καρκίνου του προστάτη. Επανάληψη της βιοψίας συνιστάται σε περιπτώσεις εμμένουσας ένδειξης καρκίνου του προστάτη (παθολογική δακτυλική εξέταση, αυξημένα επίπεδα PSA ή ιστολογικά ευρήματα ύποπτα για κακοήθεια στην πρώτη βιοψία). Γενικά δεν έχει καθοριστεί σύσταση για επιπλέον βιοψίες (τρεις ή περισσότερες) και η απόφαση πρέπει να λαμβάνεται εξατομικευμένα για κάθε ασθενή. Στους ασθενείς που υποβάλλονται σε βιοψία προστάτη πρέπει να γίνεται διορθική περιπροστατική έγχυση με ένα τοπικό αναισθητικό [4].

Η κλινική παρουσίαση της μεταστατικής νόσου συνοδεύεται συχνά με συμπτώματα οστικού άλγους, λεμφαδενικής διόγκωσης και πυελικού άλγους ή ανουρίας λόγω απόφραξης ουρητήρων από λεμφαδενικά μπλοκ. Σε προχωρημένες καταστάσεις μπορεί να εμφανιστεί έντονη απώλεια βάρους και καχεξία, παραπληγία λόγω συμπίεσης νωτιαίου μυελού ή λήθαργος (λόγω αναιμίας και ουραιμίας). Για την σταδιοποίηση της μεταστατικής νόσου, εκτός από αυτά που αναφέρθηκαν, χρησιμοποιείται και το σπινθηρογράφημα οστών, η αξονική τομογραφία άνω και κάτω κοιλίας/οπισθοπεριτοναίου (ή μαγνητική τομογραφία) και η αξονική τομογραφία θώρακος (ή απλή ακτινογραφία θώρακος, ανάλογα με τις κλινικές ενδείξεις) [5].



**Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της καρκινογένεση στον προστάτη.** Γεγονότα όπως βλάβες στο γενετικό υλικό DNA και στους μηχανισμούς οξειδωσης, γενετικοί πολυμορφισμοί και χρόνια φλεγμονή μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη αλλά ταυτόχρονα να αποτελέσουν και στόχους των χημειοθεραπευτικών παραγόντων. COX-2, cyclooxygenase 2; IL, interleukin; miR, microRNA; mTOR, mammalian target of rapamycin; PIN, prostatic intraepithelial neoplasia; PSA, prostatespecific antigen [15].

#### 1.1.4 Θεραπευτική αντιμετώπιση της ασθένειας

Η αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη, με βάση τις συστάσεις του National Comprehensive Cancer Network (NCCN) [16] εξαρτάται από τον κίνδυνο υποτροπής. Για τους ασθενείς με κλινικά εντοπισμένη νόσο πολύ χαμηλού κινδύνου υποτροπής και προσδόκιμο επιβίωσης <20 έτη, καθώς και για τους ασθενείς με νόσο χαμηλού κινδύνου υποτροπής και προσδόκιμο επιβίωσης <10 έτη, οι πολύ πρόσφατες κλινικές οδηγίες του NCCN συστήνουν ενεργό παρακολούθηση με τακτικό έλεγχο PSA και δακτυλική εξέταση του ορθού (Digital rectal exam, DRE). Για νόσο υψηλότερου κινδύνου υποτροπής οι θεραπευτικές επιλογές είναι κυρίως η ριζική προστατεκτομή (με ή χωρίς πυελικό λεμφαδενικό καθαρισμό) και ακτινοθεραπεία / βραχυθεραπεία. Για νόσο υψηλού κινδύνου υποτροπής ή προχωρημένη / μεταστατική νόσο ο

θεραπευτικός σχεδιασμός βασίζεται στην ορμονοθεραπεία με στέρηση ανδρογόνων (androgen deprivation therapy, ADT).

Σε ασθενείς με βιοχημική πρόοδο νόσου ή ασυμπτωματικούς μεταστατικούς ασθενείς με αργή εξέλιξη νόσου (συνήθως με οστικές μεταστάσεις μόνο) έχει νόημα η χρησιμοποίηση δεύτερης γραμμής ορμονικών χειρισμών (π.χ. αντι-ανδρογόνα, εστραμουστίνη, οιστρογόνα, προγεστερόνες, γλυκοκορτικοειδή, κετοκοναζόλη), ή άλλων φαρμακευτικών αγωγών όπως αναστολέων στεροειδογένεσης (π.χ. ο αναστολέας του κυτοχρώματος CYP17, αμπιρατερόνη, που αναστέλλει την παραγωγή τεστοστερόνης σε όρχεις, επινεφρίδια και προστάτη). Σε ορμονοάντοχη νόσο και/ή συμπτωματικούς ασθενείς με γρήγορη εξέλιξη νόσου έχει ένδειξη η χημειοθεραπεία [16].

Οι εγκεκριμένες θεραπείες βασίζονται στην κατανόηση των μηχανισμών του ευνοχο-άντοχου καρκίνου του προστάτη (Castration Resistant Prostate Cancer, CRPC). Σύμφωνα με τα ως τώρα γνωστά δεδομένα η πλειοψηφία των μηχανισμών που έχουν ταυτοποιηθεί ρυθμίζονται από τον ανδρογονικό υποδοχέα (AR) ή εμπλέκονται στον άξονα δράσης του.

Παρακάτω θα αναλυθούν τα εγκεκριμένα μόρια για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, εστιάζοντας στον μηχανισμό δράσης τους.

Η **δοσεταξέλη** είναι ένα αρκετά μελετημένο χημειοθεραπευτικό μόριο το οποίο χρησιμοποιείται στη θεραπεία πολλών κακοηθειών και αποτελούσε μέχρι πρότινος τη μόνη εγκεκριμένη θεραπεία για ασθενείς με CRPC. Η δοσεταξέλη είναι ένα αντι-μιτωτικό χημειοθεραπευτικό που προσδένεται στις β-υπομονάδες των μικροσωληνίσκων της τουμποουλίνης εμποδίζοντας τον πολυμερισμό τους που είναι απαραίτητος για τη μίτωση [17]. Με αυτό τον τρόπο το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση. Επιπρόσθετα, τα κύτταρα CRPC στα οποία έχει χορηγηθεί δοσεταξέλη εμφανίζουν μείωση της έκφρασης του AR κυρίως λόγω της πυρηνικής μετακίνησής του και της αναστολής της σηματοδότησης [18].

Μία δεύτερη κατηγορία εγκεκριμένων θεραπειών αποτελούν οι αναστολείς ανδρογόνων με κύριο την **ενζαλουταμίδα** (MDV-3100, ENZA, Xtandi). Η ενζαλουταμίδα προκαλεί μία πολύπλευρη αναστολή, εμποδίζοντας την τεστοστερόνη να προσδεθεί στον ανδρογονικό υποδοχέα, την πυρηνική μετακίνηση του ανδρογονικού υποδοχέα, την πρόσδεσή του στο DNA καθώς και την ένταξη των συν-ενεργοποιητών [17]. Μελέτες φάσης III (AFFIRM, PREVAIL) έχουν δείξει ότι ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε ενζαλουταμίδα τόσο πριν όσο και μετά τη

χημειοθεραπεία εμφάνισαν σημαντική δραστηριότητα κατά του όγκου και αύξηση της συνολικής επιβίωσής τους [19],[20].

Τελευταία κατηγορία θεραπειών οι οποίες βρίσκονται σε ταχύτατη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια είναι οι αναστολείς στεροειδογένεσης. Ο πιο γνωστός είναι ένα οξικό άλας της **αμπιρατερόνης** (Zytiga) με χημική δομή παρόμοια της πρεγνενολόνης και δρα σαν ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας του κυτοχρώματος P450 (Pigment 450), οικογένειας 17, υποοικογένειας A, πολυπεπτιδίου 1 (CYP17A1). Το ένζυμο CYP17A1 είναι ένας καταλύτης οξείδωσης δύο διαδοχικών αντιδράσεων στο μονοπάτι της στεροειδογένεσης που συμβάλλουν στη μετατροπή της πρεγνενολόνης σε DHT. Η απώλεια της δραστηριότητας του ενζύμου CYP17A1, ένα βασικό ένζυμο που βρίσκεται στην αρχή του μονοπατιού της στεροειδογένεσης, προκαλεί σημαντική μείωση της παραγωγής ανδρογόνων στα περιφερειακά όργανα και ειδικά στα επινεφρίδια αλλά και σημαντική μείωση του επιπέδου των ανδρογόνων μέσα στον όγκο. Η αμπιρατερόνη έχει βρεθεί να είναι 10-30 φορές πιο ειδική από την κετοκοναζόλη που είναι ένας μη ειδικός αναστολέας των ενζύμων P450 που χρησιμοποιούνταν ευρύτατα ως τώρα [17].

Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι ο αριθμός των ασθενών που απαντά στην αμπιρατερόνη μετά την ενζαλουταμίδη και στην ενζαλουταμίδη μετά την αμπιρατερόνη είναι μικρός και αυτό οφείλεται κυρίως στην αλληλεπίδραση των δύο αυτών παραγόντων [21] αλλά και στη δημιουργία εναλλακτικών μεταγραμμάτων του ανδρογονικού υποδοχέα [22]. Αυτό έχει σα συνέπεια στα περισσότερα θεραπευτικά σχήματα, η θεραπεία με αμπιρατερόνη ή ενζαλουταμίδη αν ο ασθενής έχει ήδη λάβει τον έναν από τους δύο παράγοντες να μην έχει εγκριθεί προς το παρόν.

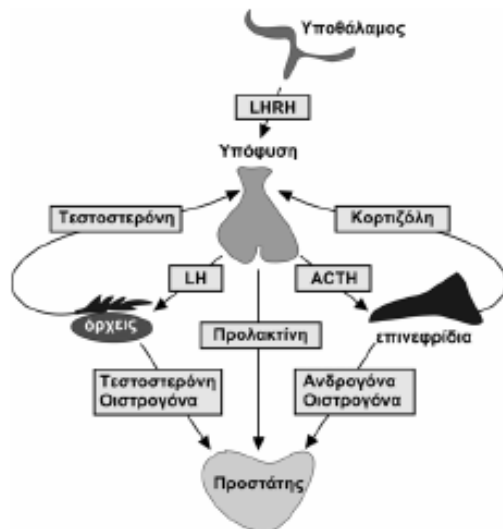
Συμπερασματικά η πρόγνωση της νόσου έχει βελτιωθεί τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω της ευρείας εφαρμογής του ελέγχου PSA που βοήθησε στην διάγνωση της νόσου σε πρωιμότερα στάδια. Έτσι, σήμερα η πενταετής επιβίωση της εντοπισμένης και τοπικά προχωρημένης νόσου στις δυτικές κοινωνίες είναι έως και 100%. Ωστόσο, παρά την πρόοδο της συστηματικής θεραπείας, η καλή πρόγνωση της προχωρημένης και μεταστατικής νόσου εξακολουθεί να είναι δυσμενής.

## 1.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

### 1.2.1 Η διαδικασία της στεροειδογένεσης

Ως στεροειδογένεση ορίζεται η δημιουργία στεροειδών ορμονών δηλαδή ανδρογόνων, προγεστερόνης, οιστρογόνων, κορτιζόνης και αλδοστερόνης. Η κύρια πρόδρομη ουσία για τη στεροειδογένεση είναι η χοληστερόλη που προέρχεται από το οξικό οξύ. Οι αδένες στους οποίους επιτελείται η στεροειδογένεση είναι οι ωοθήκες (ωοθυλάκιο, ωχρό σωματίο), οι όρχεις, τα επινεφρίδια και ο πλακούντας.

Τα ανδρογόνα είναι στεροειδείς ορμόνες που προάγουν τόσο τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των αρσενικών ανθρώπινων αναπαραγωγικών οργάνων, όσο και των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου και η πλειοψηφία τους συντίθεται στους όρχεις και τα επινεφρίδια. Η τεστοστερόνη (T) είναι η ορμόνη που είναι κυρίως υπεύθυνη για την αύξηση του προστάτη αδένος και συντίθεται από τα κύτταρα Leydig των όρχεων, υπό την επίδραση κυρίως της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) που εκκρίνεται από την υπόφυση. Η έκκριση του συγκεκριμένου δεκαπεπτιδίου ρυθμίζεται από την ορμόνη απελευθέρωσης της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LHRH), η οποία με τη σειρά της εκκρίνεται από τον υποθάλαμο (Εικόνα 3).



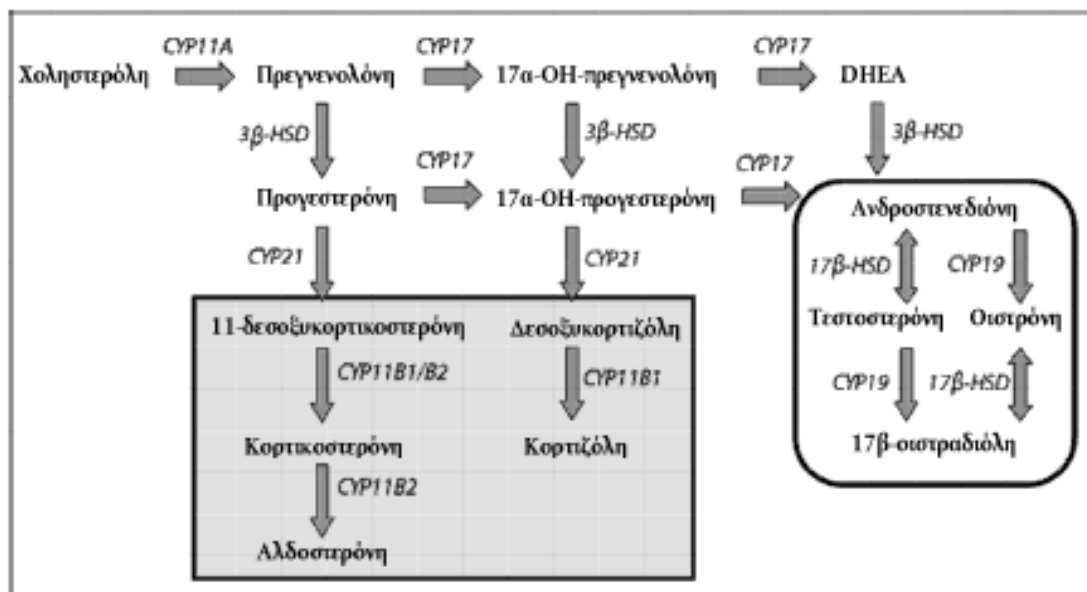
**Εικόνα 2: Άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-όρχεις.** Σχηματική αναπαράσταση του ορμονικού ελέγχου της αύξησης του προστάτη, που περιλαμβάνει τον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-όρχεις. (LH: Lutenizing Hormone, LHRH: Lutenizing Hormone Releasing Hormone, ACTH: Adrenocorticotropic Hormone)

Αυτό είναι και το σημείο όπου η τεστοστερόνη ασκεί ανάδρομη δράση, χάρη στην οποία τα επίπεδα της τεστοστερόνης στο αίμα διατηρούνται εντός φυσιολογικών ορίων (10-35 µg/l). Το 95% της τεστοστερόνης που κυκλοφορεί στο αίμα δεσμεύεται σε πρωτεΐνες του πλάσματος, η πρόδρομη μορφή των οποίων είναι η προσδεσμένη πρωτεΐνη στη φυλετική ορμόνη (SHBH). Το γεγονός αυτό επιτρέπει σε ένα πολύ μικρό ποσοστό ανδρογόνων να εισέρχεται στα κύτταρα [23]. Μια άλλη πηγή ανδρογόνων είναι ο φλοιός των επινεφριδίων, όπου υπό την επίδραση της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH), η ανδροστερόνη και η ανδροστενδιόνη (AED) εκκρίνονται από τα επινεφρίδια στην κυκλοφορία, με μικρή επικουρική δράση όμως σε αυτή της λειτουργίας των όρχεων (Εικόνα 4). Παρόλα αυτά σε περιπτώσεις φυσικού ή χημικού ευνουχισμού, η ανδρογονική αυτή επίδραση των ανδρογόνων των επινεφριδίων δύναται να οδηγήσει σε επιβίωση ανδρογονο-εξαρτώμενων καρκινικών κλώνων [24].

Στη βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών του φύλου συμμετέχουν πέντε διαφορετικά ένζυμα που καταλύουν έξι διαφορετικές αντιδράσεις. Η ενζυμική μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη, η οποία καταλύεται από το ένζυμο διάσπασης της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης CYP11A, που ανήκει στην οικογένεια ενζύμων κυτόχρωμα P450(CYP), είναι το πρώτο βήμα σε μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων που κορυφώνονται με τη σύνθεση τελικών στεροειδών. Ανάλογα με τη σειρά των επόμενων δύο αντιδράσεων, η πορεία στεροειδογένεσης

χωρίζεται σε δύο κλάδους, τη  $\Delta^5$ -υδροξυστεροειδική και τη  $\Delta^4$ -κετοστεροειδική πορεία, οι οποίες συγκλίνουν στην παραγωγή ανδροστενδίωνης (AED) (Εικόνα 5).

Η ανδροστενδίωνη (AED) μετατρέπεται σε τεστοστερόνη (T) από τη  $17\beta$ -υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση ( $17\beta$ -HSD). Η τεστοστερόνη είναι ταυτόχρονα ενδιάμεση και τελική ορμόνη. Στους άντρες μπορεί να μετατραπεί σε διυδροτεστοστερόνη (DHT) από το ένζυμο  $5\alpha$ -αναγωγάση, η οποία βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες, στον πυρηνικό φάκελο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ιστών-στόχων ανδρογονικής δράσης, όπως ο προστάτης και οι σπερματοδόχοι κύστεις. Η DHT είναι σημαντικά ισχυρότερο ανδρογόνο από την τεστοστερόνη και θεωρείται επίσης τελική ορμόνη.



**Εικόνα 3: Πορεία της στεροειδογένεσης.** Τα ένζυμα απεικονίζονται με πλάγιους χαρακτήρες και οι ορμόνες με έντονους χαρακτήρες, ενώ τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της σύνθεσης. Το γκρι φόντο δηλώνει πορείες/προϊόντα κορτικοστεροειδών. Οι πορείες/τα προϊόντα στεροειδών του φύλου απεικονίζονται εντός του κύκλου. CYP = κυτόχρωμα P450, HSD = υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση, DHEA = διυδροεπιανδροστερόνη.

Το ένζυμο της πορείας στεροειδογένεσης που μετατρέπει ανδρογόνες χημικές ενώσεις σε οιστρογόνες είναι η αρωματάση (CYP19). Η CYP19 μετατρέπει την τεστοστερόνη σε  $17\beta$ -οιστραδιόλη (E2) και την ανδροστενδίωνη σε οιστρόνη. Η  $17\beta$ -οιστραδιόλη και η τεστοστερόνη θεωρούνται τελικές ορμόνες της πορείας στεροειδογένεσης. Η ειδικότητα της δράσης λύασης του CYP17 διαφέρει μεταξύ των ειδών ως προς τα ενδιάμεσα υποστρώματα. Στον άνθρωπο, το ένζυμο ευνοεί υποστρώματα της  $\Delta^5$ -υδροξυστεροειδικής πορείας (πρεγνενολόνη), ενώ τα υποστρώματα

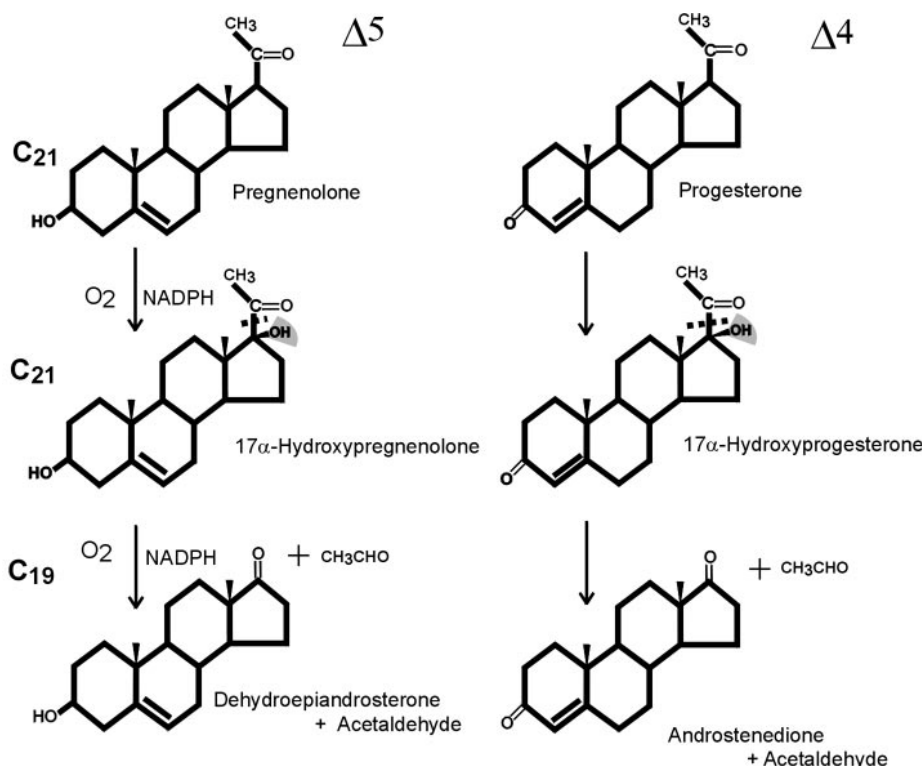
της  $\Delta^4$ -κετοστεροειδικής πορείας (προγεστερόνη) ευνοούνται στον επίμυ [25]. Αυτές οι διαφορές στη δράση λύασης του CYP17 ενδέχεται να εξηγούν ορισμένες ειδοεξαρτώμενες διαφορές στην απόκριση σε χημικές ουσίες που μεταβάλλουν τη στεροειδογένεση *in vivo* [26]. Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην πορεία της στεροειδογένεσης εμπίπτουν σε δύο κύριες κατηγορίες πρωτεϊνών:

1. Κυτόχρωμα P450: Πρόκειται για ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια των οξειδασών του κυτοχρώματος P450. Ο όρος P450 αναφέρεται σε μια μεγάλη κατηγορία οξειδωτικών ενζύμων που αποτελούνται από 500 περίπου αμινοξέα και περιέχουν μια ομάδα αίμης. Ονομάζονται P450 (Pigment 450) επειδή παρουσιάζουν όλα χαρακτηριστική απόκλιση στην αιχμή απορρόφησης Soret από 420 σε 450 nm κατά την αναγωγή με μονοξείδιο του άνθρακα.
2. Υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση (HSD): Οι 17 $\beta$ -HSD και 3 $\beta$ -HSD είναι δύο ένζυμα κλειδιά για τη βιοσύνθεση των στεροειδών του φύλου και για τη μετατροπή των επινεφριδιακών προδρόμων των ανδρογόνων και της διυδροεπιανδροστερόνης (DHEA) σε ανδρογόνα ή και δραστικά οιστρογόνα στους περιφερικούς ιστούς. Τα δύο αυτά ένζυμα έχουν απομονωθεί από ανθρώπινο πλακούντα και ανιχνεύονται στους όρχεις, στα επινεφρίδια, στις ωοθήκες και σε περιφερικούς ιστούς όπως του προστάτη και του ήπατος.

Το ένζυμο CYP17, το οποίο αναστέλεται από την αμπιρατερόνη, είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση των ανδρογόνων στους όρχεις, τα επινεφρίδια και τον καρκινικό ιστό του προστάτη. Το CYP17 καταλύει τη μετατροπή της πρεγνενολόνης σε διυδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και της προγεστερόνης σε ανδροστενδιόνη (AED) μέσω της 17 $\alpha$ -υδροξυλίωσης και της διάσπασης του δεσμού C17,20. Η αναστολή του CYP17 οδηγεί, επίσης, σε αυξημένη παραγωγή αλατοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια. Πιο αναλυτικά, το ένζυμο CYP17 καταλύει δύο διαφορετικές οξειδωτικές αντιδράσεις χρησιμοποιώντας μια οξειδοαναγωγή του κυτοχρώματος P450 και το μικροσωματικό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων, όπου τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από ένα μόριο NADPH σε ένα φλαβινο-δινουκλεοτίδιο (FAD), ακολουθούμενο διαδοχικά από τη μεταφορά σε ένα φλαβινο-μονονουκλεοτίδιο (FMN), στη συνέχεια στο P450 και στο υπόστρωμα. Οι δύο αντιδράσεις καταλύονται από το CYP17, η 17 $\alpha$ -υδροξυλίωση των C21 στεροειδών, πρεγνενολόνη ( $\Delta^5$  στεροειδές) ή προγεστερόνη ( $\Delta^4$  στεροειδές) και ακολουθείται από τη διάσπαση του δεσμού C17-C20 για να παραχθούν τα C19 στεροειδή, δηλαδή η διυδροεπιανδροστερόνη (DHEA) ή ανδροστενδιόνη (AED) αντίστοιχα (Εικόνα 5). Κάθε αντίδραση απαιτεί ένα μόριο NADPH και ένα μόριο O<sub>2</sub>. Σε αυτή την αντίδραση δύο σταδίων, η 17-OH πρεγνενολόνη ή η 17-



OH προγεστερόνη σχηματίζεται ως ένα ενδιάμεσο προϊόν. Αρχικά, υπήρχε η πεποίθηση ότι κάθε αντίδραση διεξάγεται από διαφορετικά ένζυμα. Ωστόσο, μελέτες έδειξαν ότι ένα μόνο ένζυμο καταλύει τόσο την 17 $\alpha$ -υδροξυλίωση, όσο και την διάσπαση του C17-C20 δεσμού (δράση λυάσης) [26].



**Εικόνα 4:** Ενζυμική αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο CYP17. Το CYP17 καταλύει δύο οξειδωτικές αντιδράσεις μικτής λειτουργίας, την 17-υδροξυλίωση και την C17-C20 διάσπαση. Κάθε αντίδραση απαιτεί ένα μόριο οξυγόνου και ένα μόριο NADPH. Η χρήση του  $\Delta^5$  ή του  $\Delta^4$  στεροειδούς ως υπόστρωμα εξαρτάται από το είδος του οργανισμού.

Στον άνθρωπο το ένζυμο CYP17 χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα την 17-OH πρεγνενολόνη για να παράγει την DHEA. Η προτίμηση της χρήσης του συγκεκριμένου στεροειδούς οφείλεται στο είδος του οργανισμού. Αυτή η προτίμηση στο υπόστρωμα δε συνδέεται με τη αλληλουχία των αμινοξέων του ενζύμου, αλλά σχετίζεται με την πρόσθετη δράση του κυτοχρώματος b5 που προάγει την δράση του ενζύμου CYP17 ως λυάση της 17-OH πρεγνενολόνης αλλά όχι της 17-OH προγεστερόνης [25],[27]. Το κυτόχρωμα b5 είναι μια πρωτεΐνη που δρα ως αλλοστερικός παράγοντας του συμπλόκου CYP17-οξειδοαναγωγάση, αυξάνοντας έτσι τη μέγιστη ταχύτητα

(Vmax) της αντίδρασης διάσπασης του C17-C20 δεσμού [27]. Το γονίδιο CYP17 που είναι υπεύθυνο για την πρωτεΐνη CYP17 είναι περίπου 6 kb σε μήκος, αποτελείται από οκτώ εξόνια και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10q24.3. Η πρωτεΐνη CYP17 περιέχει 508 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος περίπου 57 kDa [28].

### 1.2.2 Μονοπάτια στεροειδογένεσης στον προστάτη

Τα ανδρογόνα στον άνδρα παράγονται από τα κύτταρα Leydig του όρχι και από τα κύτταρα της δικτυωτής ζώνης του φλοιού των επινεφριδίων. Το κύριο ανδρογόνο των όρχεων είναι η τεστοστερόνη, ενώ από το φλοιό των επινεφριδίων παράγονται πρόδρομα στεροειδή με ασθενή ανδρογονική δράση, όπως η ανδροστενδιόνη (AED), η διυδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και η θειϊκή διυδροεπιανδροστερόνη (DHEA-S). Τα κύτταρα Leydig προέρχονται από τη διαφοροποίηση των κυττάρων του μεσεγγύματος της γεννητικής ταινίας κατά την έβδομη εβδομάδα της ενδομήτριας ζωής. Τα κύτταρα αυτά φτάνουν στο μέγιστο αριθμό και βαθμό διαφοροποίησης μέχρι τη 15<sup>η</sup> εμβρυϊκή εβδομάδα και, στη συνέχεια, βαθμιαία υποστρέφουν [29].

Τα επίπεδα της τεστοστερόνης στον ορό των ανδρών, κυμαίνονται από 10 έως 30 nmol/L, παρουσιάζουν διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της ημέρας, με τις υψηλότερες τιμές το πρωί και τις χαμηλότερες το βράδυ. Σε αντίθεση, η διυδροτεστοστερόνη (DHT) κυκλοφορεί σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0,5-2,5nmol/L) και συνδέεται πιο ισχυρά με τον ανδρογονικό υποδοχέα (AR) στον προστάτη [30],[31]. Οι ιστοί στόχοι των ανδρογόνων, όπως ο προστάτης και ο εγκέφαλος, συμμετέχουν στην τοπική βιομετατροπή της τεστοστερόνης σε DHT μέσω των ενζύμων της 5 $\alpha$ -αναγωγής [32], ωστόσο η αντίδραση αυτή καταλύεται και άλλους ιστούς όπως στους πνεύμονες, στον λιπώδη ιστό, στα κύτταρα του αίματος, στο δέρμα, στους αδένες του μαστού και στο ενδομήτριο.

Η τεστοστερόνη και η DHT είναι απαραίτητες ορμόνες για τη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία του προστάτη στον άντρα. Οι δύο ορμόνες συνδέονται άμεσα με τον AR, με τη DHT να εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης απ'ότι η τεστοστερόνη. Ο προστάτης είναι αδένας του αρσενικού φύλου ο οποίος με τις εξωκρινείς εκκρίσεις του ενισχύει την λειτουργία και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγής. Η ανάπτυξη του προστάτη στη μήτρα αρχίζει με την ανδρογονική διέγερση του AR στο μεσέγγυμα του

ουρογεννητικού κόλπου (UGM), υποστηρίζοντας τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων στο UGM. Κατά τη γέννηση ο προστάτης ζυγίζει 1-2 g αλλά μετά την εφηβεία, και την επίδραση των ανδρογόνων ωριμάζει ως όργανο υπεύθυνο για την αναπαραγωγή, ζυγίζει περίπου 20 g. Βρίσκεται στη βάση του πέους και τυλίγει εσωτερικά την ουρήθρα. Οι εκκρίσεις του προστάτη είναι υπεύθυνες για τη ζελατινοποίηση, την πήξη και την υγροποίηση του σπέρματος και σε συνδυασμό με το σπέρμα από τους όρχεις διαμορφώνουν το σπέρμα εκσπερμάτωσης [33].

Η δράση της τεστοστερόνης και της DHT ενεργοποιούν τη δράση του AR και προωθούν την έκκριση διαφόρων αυξητικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα αύξησης των ινοβλαστών (FGF) στο UGM, όπου δρουν στα βλαστικά κύτταρα και επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της εφηβικής ωρίμανσης, μέσα από μια σειρά ανδρογόνο-εξαρτώμενων μεσεγχυματικών επιθηλιακών αλληλεπιδράσεων [34] σχηματίζεται η αδενική δομή του προστάτη η οποία στη συνέχεια αναπτύσσεται (κατά τη διάρκεια της εφηβείας) μέσω πολλαπλασιασμού διακριτών κυτταρικών υποσυνόλων συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών, των λείων μυών και τα ενδοθηλιακών κυττάρων [33],[35].

Στους φυσιολογικούς ενήλικες άνδρες, η τεστοστερόνη μεταφέρεται στο αίμα συνδεδεμένη κατά 44% με τη σφαιρίνη, που δεσμεύει τις ορμόνες του φύλου και κατά 54% με αλβουμίνη, ενώ μόνο το 2% της ολικής τεστοστερόνης κυκλοφορεί ως ελεύθερη [36]. Η μη δεσμευμένη τεστοστερόνη εισέρχεται στα κύτταρα του προστάτη και στη συνέχεια μετατρέπεται σε DHT, η οποία συνδέεται με τον AR και ενεργοποιεί την μεταγραφή εκατοντάδων γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την παραγωγή των πρωτεϊνών που απαιτούνται για την επιβίωση, την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την κανονική λειτουργία του προστάτη [37],[38].

### **1.2.3 Στεροειδογένεση και καρκίνος του προστάτη**

#### **1.2.3.1 Οι μεταβολές της στεροειδογένεσης στον καρκίνο του προστάτη**

Η κακοήθεια στον προστάτη εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της παράτυπης και μη φυσιολογικής ανάπτυξης των κυττάρων του. Η μη φυσιολογική ανάπτυξη προκαλεί

δυσλειτουργίες στον κυτταρικό κύκλο και απορύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης. Το αποτέλεσμα αυτών των διεργασιών είναι ένα φαινομενικά «υγιές» κύτταρο να αρχίζει να πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα και να προσβάλλει τους περιβάλλοντες ιστούς, αυξάνοντας τις πιθανότητες για την δημιουργία απομακρυσμένων μεταστάσεων [39]. Η αφθονία των αυξητικών παραγόντων που δρουν για να διαταράξουν την μεσεγχυματική-επιθηλιακή ισορροπία, μαζί με μια επίκτητη απώλεια ή αποσιώπηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, προκαλούν απορύθμιση στην ομοίωση της κυτταρικής ανάπτυξης και συμβάλλουν στην εμφάνιση του PCa [33],[38]. Η ενεργοποίηση του AR από την τεστοστερόνη και τη DHT μέσα σε ένα μη φυσιολογικό κυτταρικό μικροπεριβάλλον οδηγεί τελικά σε έναν κακοήθη φαινότυπο. Η παρουσία ενός και μόνου επιθηλιακού βλαστικού κυττάρου είναι αρκετή για να προκύψει ένας ετερογενής πληθυσμός καρκινικών κυττάρων.

Η μείωση των κυκλοφορούντων ανδρογόνων μπορεί να προκαλέσει υποχώρηση της ανάπτυξης του όγκου του προστάτη και ποικίλλει ανάμεσα στους ασθενείς σε σχέση με την διάρκεια παρατεταμένης απόκρισης [40]. Η εμφάνιση αντοχής του PCa στη στέρηση ανδρογόνων και η ανάπτυξη ευνοηχο-άντοχου καρκίνου του προστάτη (CRPC) είναι αναπόφευκτη και σχεδόν χωρίς εξαίρεση θανατηφόρα. Η χειρουργική επέμβαση ή οι ακτινοβολίες αποτελούν μεθόδους αντιμετώπισης για τον τοπικά προχωρημένο PCa, ενώ οι θεραπείες που στηρίζονται στην στέρηση ανδρογόνων εφαρμόζονται μόνο σε προχωρημένες περιπτώσεις καρκίνου του προστάτη, σε μια προσπάθεια να ελεγχθεί η ανδρογονική ευαισθησία του μεταστατικού καρκίνου. Η ανάπτυξη του CRPC είναι, εν μέρει, το αποτέλεσμα της αυξημένης σύνθεσης ανδρογόνων στο μικροπεριβάλλον του όγκου, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης μετατροπής κυκλοφορούντων ορμονών όπως DHEA-(S) προς ανδρογόνα καθώς επίσης και της *de novo* σύνθεσης των ανδρογόνων [41],[42].

Μελέτες ανταπόκρισης του PCa στον ευχουνισμό σε ανθρώπινους ιστούς και σε xenograft, επιδεικνύουν μια ξεχωριστή ποικιλία μηχανισμών σύνθεσης των στεροειδών για την αύξηση των ανδρογόνων στους ιστούς του όγκου του προστάτη [42]. Αρκετά ερευνητικά δεδομένα έχουν δείξει την αύξηση των στεροειδογονικών ενζύμων εντός του όγκου σε LNCaP xenografts [42], επανέκφραση των εξαρτώμενων από τα ανδρογόνα γονιδίων απουσία ανδρογόνων [42] καθώς και την ικανότητα του CRPC ιστού σε πειραματόζωα να μετατρέπει το οξικό οξύ σε DHT [42]. Όλα τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν στην ύπαρξη αυξημένης συγκέντρωσης DHT στο περιβάλλον του όγκου σε σχέση με τη συγκέντρωσή της στην κυκλοφορία του αίματος [42],[43].

Στους ευνουχισμένους άνδρες με CRPC, όπου η σηματοδότηση του AR είναι εξασθενημένη, η μετατόπιση της στεροειδογένεσης από τους όρχεις στο προστατικό ιστό λειτουργεί ως ένας μηχανισμός αντίστασης στον ευνουχισμό [22]. Η θεραπευτική αγωγή αυτών των ανδρών με φάρμακα που στοχεύουν στην αναστολή της στεροειδογένεσης, ο αποκλεισμός της παραγωγής ανδρογόνων στους όγκους και η μελέτη των εναλλακτικών μονοπάτιων σύνθεσης ανδρογόνων αποτελούν πεδία που βρίσκονται υπό έρευνα [44]. Η διατήρηση της ενεργοποίησης του AR στον προστάτη αποτελεί ένδειξη ότι ο καρκίνος στον προστάτη είναι σε θέση να παράγει ανδρογόνα τους ιστούς του παρακάμπτοντας τις θεραπείες στέρησης ανδρογόνων. Επιπρόσθετα, μελέτες σε καρκινικά προστατικά κύτταρα έχουν δείξει την ύπαρξη μεταλλάξεων στον ανδρογονικό υποδοχέα και σε ρυθμιστικά μόρια που ευαισθητοποιούν την ενεργοποίηση του όπως επίσης την ύπαρξη προϊόντων εναλλακτικού ματίσματος του AR που δεν απαιτούν τη δέσμευση ανδρογόνων για την ενεργοποίησή τους [22].

### **1.2.3.2 Τα μονοπάτια μεταβολισμού των ανδρογόνων: Το κλασικό και τα εναλλακτικά μονοπάτια**

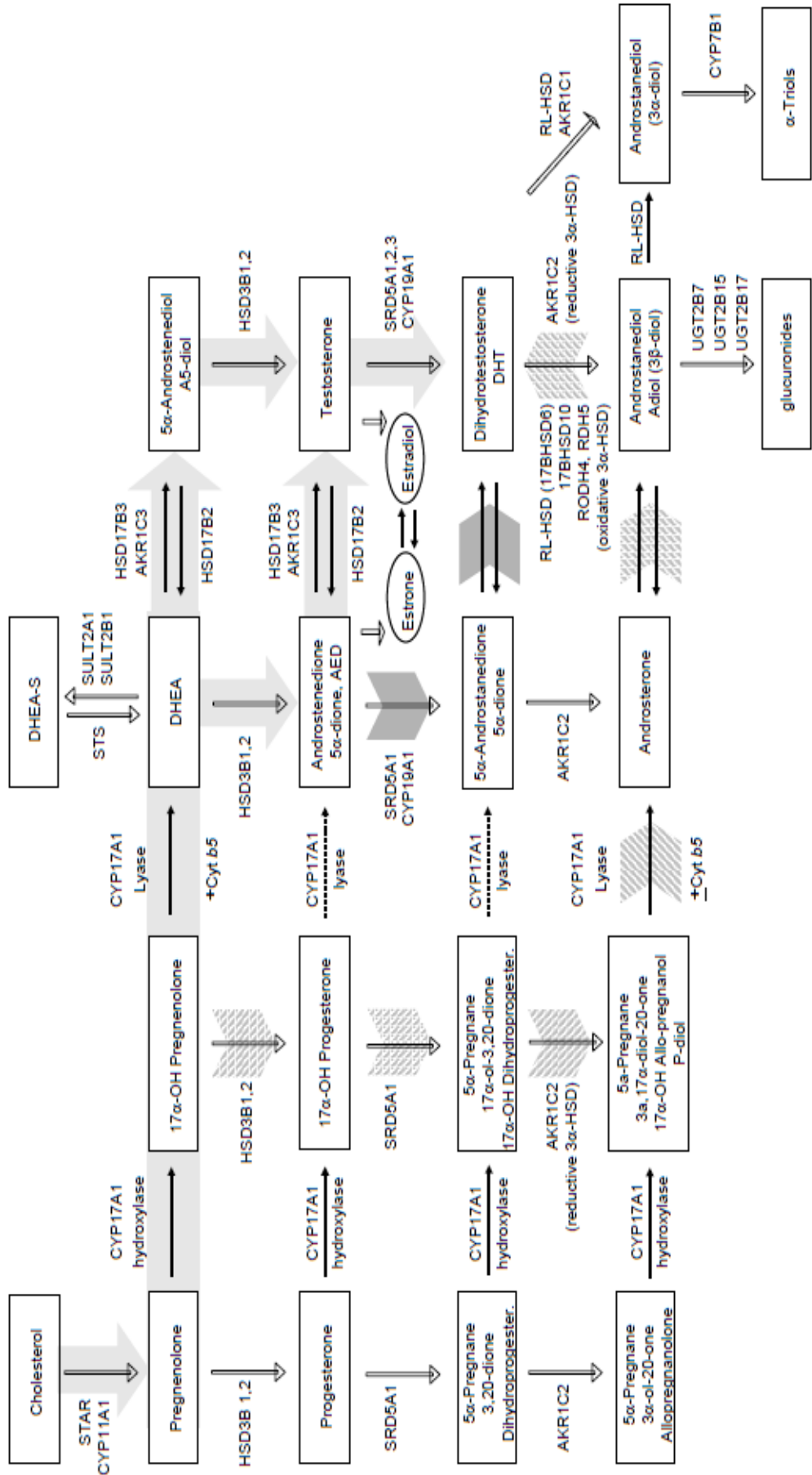
Το κλασικό μονοπάτι σύνθεσης των ανδρογόνων, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 6 με τα ανοιχτά γκρι βέλη, ξεκινά με τη μετατροπή της χοληστερόλης σε C21 στεροειδή όπως η πρεγνενολόνη και η προγεστερόνη. Αυτά τα C21 στεροειδή μετατρέπονται αρχικά σε C19 στεροειδή όπως οι ορμόνες DHEA και AED μέσω διαδοχικών δράσεων της CYP17A1 υδροξυλάσης και λύασης. Στη συνέχεια με τη βοήθεια του ενζύμου HSD17B3 παράγεται τεστοστερόνη η οποία καταλήγει με τη βοήθεια του ενζύμου SRD5A2 (Steroid 5 alpha-reductase 2) να μετατρέπεται σε DHT στους ιστούς στόχους.

Το πρώτο εναλλακτικό μονοπάτι σύνθεσης των ανδρογόνων περιγράφεται στην Εικόνα 6 με τα γραμμωτά βέλη. Στους ιστούς που συμβαίνει στεροειδογένεση και τα ένζυμα CYP17A και SRD5A2 συν-εκφράζονται υπάρχει ένα εναλλακτικός δρόμος σύνθεσης DHT όπου τα C21 στεροειδή αντιδρούν με το ένζυμο SRD5A πριν υποστούν τη δράση της CYP17A λύασης [45]. Στην πραγματικότητα η 17α-OH προγεστερόνη είναι καλύτερο υπόστρωμα για το ένζυμο SRD5A σε σχέση με την AED ή την τεστοστερόνη [46]. Εφ'όσον η 17α-OH προγεστερόνη είναι χαμηλής συγγένειας υπόστρωμα για τη δράση της CYP17A λύασης στον άνθρωπο, η σύνθεση προχωράει

με την αντίδραση του ενζύμου ARK1C2 με την 17α-OH διυδρο-προγεστερόνη που την μετατρέπει σε 17α-OH πρεγνενολόνη, ένα εξαιρετικό υπόστρωμα για τη CYP17A λυάση το οποίο έχει ελάχιστη εξάρτηση από το κυτόχρωμα b5. Η ανδροστερόνη που αναγεννάται από τη δράση της CYP17A λυάσης αντιδρά με το ένζυμο HSD17B3 ή ARK1C3 για την παραγωγή 3β-ανδροστενδιόλης. Σε αυτή την περίπτωση ένα αντίστροφο βήμα οξειδωσης καταλύεται από το ένζυμο RL-HSD (δεν απαιτείται στο κλασικό μονοπάτι) για την παραγωγή DHT [47].

Στο δεύτερο εναλλακτικό μονοπάτι, που χαρακτηρίζεται ως το μονοπάτι της ανδροστενδιόνης (σκούρα γκρι βέλη), οι ορμόνες DHEA και AED παράγονται όπως στο κλασικό μονοπάτι. Παρόλα αυτά, αντί για τη μετατροπή της AED σε τεστοστερόνη και στη συνέχεια τη μετατροπή της τεστοστερόνης σε DHT, αλλάζει η σειρά δράσης των ενζύμων με αποτέλεσμα η AED να μετατρέπεται πρώτα με το ένζυμο SRD5A σε 5α-ανδροστενδιόνη και στη συνέχεια μέσω του ενζύμου HSD17B3 (ή AKR1C3) σε DHT.

Μελέτες σχετικά με τον μεταβολισμό των ανδρογόνων στον προστάτη έχουν δείξει ότι η έκφραση του ενζύμου SRD5A1 υπερισχύει της έκφρασης του SRD5A2 καθώς εξελίσσονται οι καρκινικοί προστατικοί όγκοι. Επιπρόσθετα το ένζυμο CYP17A επιδεικνύει μία πιο ξεκάθαρη δραστηριότητα λυάσης για το ενδιάμεσο μεταβολικό προϊόν 17α-OH αλλο-πρεγνενολόνη σε σχέση με τα κλασικά υποστρώματα 17α-OH πρεγνενολόνη και 17α-OH προγεστερόνη. Συνεπώς, ο συνδυασμός της αυξημένης έκφρασης του ενζύμου SRD5A1 με το ένζυμο CYP17A στον καρκίνο του προστάτη μπορεί να ευνοεί την *de novo* σύνθεση στεροειδών μέσω αυτού του εναλλακτικού μονοπατιού της στεροειδογένεσης [48]. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ αυτά τα εναλλακτικά μονοπάτια για την παραγωγή DHT προσπερνούν την ενδιάμεση παραγωγή AED και τεστοστερόνης, ωστόσο απαιτούν τις ίδιου τύπου ενζυμικές αντιδράσεις για την παραγωγή DHT, το μόνο που αλλάζει είναι η σειρά των ενζύμων που ελέγχουν τις αντιδράσεις.



**Εικόνα 6: Το κλασικό και τα εναλλακτικά μονοπάτια της πορείας της στεροειδογένεσης.** Η χοληστερόλη μετετρέπεται σε C21 στεροειδή (πρεγνενολόνη και προγεστερόνη) με τη δράση των ενζύμων STAR και CYP11A. Στο κλασικό μονοπάτι (ανοιχτά γκρι βέλη) τα C21 στεροειδή μετατρέπονται στα C19 στεροειδή DHEA και ανδροστενδιόνη (AED) με τις διαδοχικές αντιδράσεις του ενζύμου CYP17A που έχει δραστηριότητα υδροξυλάσης και λιάσης. Η δραστηριότητα της λιάσης του CYP17 που απαιτεί για τη δράση της και το κύτταρο b5 ευνοεί την παραγωγή DHEA. Η DHEA μετατρέπεται με τη βοήθεια των ενζύμων HSD3B και HSD17B3 (ή AKR1C3) σε τεστοστερόνη (Τ) η οποία μετατρέπεται σε DHT μέσω του ενζύμου SRD5A. Στο πρώτο εναλλακτικό μονοπάτι (γραμμωτά βέλη) η προγεστερόνη και η πρεγνενολόνη υφίστανται πρώτα τη δράση των ενζύμων SRD5A και AKR1C2 πριν τη δράση της λιάσης του CYP17. Η ανδροστερόνη στη συνέχεια με τη βοήθεια των ενζύμων HSD17B3 (ή AKR1C3) μετατρέπεται σε DHT. Στο δεύτερο εναλλακτικό μονοπάτι, που χαρακτηρίζεται ως το μονοπάτι της ανδροστενδιόνης (σκούρα γκρι βέλη), οι DHEA και AED παράγονται όπως στο κλασικό μονοπάτι. Παρόλα αυτά, αντί για τη μετατροπή της AED σε τεστοστερόνη και στη συνέχεια τη μετατροπή της τεστοστερόνης σε DHT, αλλάζει η σειρά δράσης των ενζύμων με αποτέλεσμα η AED να μετατρέπεται πρώτα με το ένζυμο SRD5A σε 5α-ανδροστενδιόνη και μετά μέσω HSD17B3 (ή AKR1C3) σε DHT.

### 1.2.3.3 Η αλλαγή στην έκφραση των ενζύμων της στεροειδογένεσης στους καρκινικούς προστατικούς όγκους

Οι προστατικοί όγκοι χαρακτηρίζονται από ολική απώλεια έκφρασης του ενζύμου SRD5A2, που είναι η βασική ισομορφή που εκφράζεται στον φυσιολογικό προστατικό ιστό, και μία αύξηση της έκφρασης του ενζύμου SRD5A1 [49],[50]. Ο Sharifi και η ομάδα του μελέτησαν τη σημασία αυτής της μετάβασης και έδειξαν ότι α) η αναγωγή της 5α –ανδροστενδιόνης σε AED είναι ένα απαραίτητο βήμα για τη σύνθεση της DHT στα καρκινικά προστατικά κύτταρα (περισσότερο απ'ότι η άμεση 5α αναγωγή της τεστοστερόνης σε DHT, β) η μετατροπή αυτή ρυθμίζεται ειδικά από το ένζυμο SRD5A1 και γ) στα καρκινικά προστατικά κύτταρα η τεστοστερόνη και η AED στην πραγματικότητα δεν αποτελούν υποστρώματα του ενζύμου SRD5A2 [48]. Αυτή η μελέτη επιβεβαιώνει παλαιότερα δεδομένα που αναφέρουν ότι η δραστηριότητα του ενζύμου SRD5A στα καρκινικά προστατικά κύτταρα έχει μία προτίμηση στην AED σε σχέση με την τεστοστερόνη [51], όπως επίσης και αρχικές μελέτες για το ένζυμο SRD5A1 που δείχνουν ότι η AED αποτελεί ένα καλύτερο υπόστρωμα για την 5α αναγωγή σε σχέση με την τεστοστερόνη. Ο Sharifi και οι συνεργάτες του χαρακτήρισαν αυτή την οδό ως το μονοπάτι της 5α- ανδροστενδιόνης (Εικόνα 6, σκούρα γκρι βέλη) και προτείνουν ότι η αύξηση του ενζύμου SRD5A1 που παρατηρείται κατά την εξέλιξη στον CRPC αντικατοπτρίζει την επιλογή κυττάρων του όγκου που έχουν την ικανότητα αποτελεσματικής σύνθεσης DHT μέσω αυτού του μονοπατιού. Επιπλέον, η έκφραση ενός τρίτου ισοενζύμου του SRD5A3 παρατηρήθηκε να αλλάζει και συγκεκριμένα να αυξάνεται σε ορμονο-εξαρτώμενους και ορμονο-ανεξάρτητους προστατικούς όγκους.

Αλλαγές έχουν παρατηρηθεί επίσης στην έκφραση των ζευγαριών αναγωγικών και οξειδωτικών ενζύμων και ανενεργών μεταβολιτών σε ανδρογόνα (πχ. AED σε τεστοστερόνη ή ανδροστενδιόνη σε DHT). Πιο συγκεκριμένα σε ορμονο-εξαρτώμενους προστατικούς όγκους έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση των αναγωγικών ενζύμων HSD17B3 [52] και AKR1C3 [49] και μειωμένη έκφραση των οξειδωτικών ενζύμων που καταλύουν την αντίστροφη αντίδραση, HSD17B2 [52], γεγονός που ενισχύει το σχηματισμό τεστοστερόνης και DHT. Κατ'αναλογία των όσων έχουν προαναφερθεί, οι ορμονο-εξαρτώμενοι προστατικοί όγκοι εμφανίζουν μία επιλεκτική απώλεια των ενζύμων AKR1C1 και AKR1C2 η οποία συνοδεύεται σε μειωμένη ικανότητα μεταβολισμού της DHT αυξάνοντας τα επίπεδα DHT στον όγκο [53]. Ενίσχυση των επιπέδων



DHT προσφέρει και η αυξημένη έκφραση του ενζύμου HSD17B10 που καταλύει την οξείδωση της 3β-ανδροστενδιόλης σε DHT.

Οι ορμονο-ανεξάρτητοι προστατικοί όγκοι χαρακτηρίζονται επίσης από αλλαγή στην έκφραση των γονιδίων των ενζύμων της στεροειδογένεσης συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό της χοληστερόλης, τη *do novo* στεροειδογένεση καθώς και τη χρήση των ανδρογόνων που παράγονται στα επινεφρίδια για την παραγωγή DHT και τεστοστερόνης [49]. Μία μελέτη που συνέκρινε ορμονο-εξαρτώμενους με ορμονο-ανεξάρτητους προστατικούς όγκους έδειξε αλλαγμένη την έκφραση των ενζύμων που σχετίζεται με τη *de novo* σύνθεση ανδρογόνων και την χρήση ανδρογόνων που παράγονται στα επινεφρίδια. Πιο συγκεκριμένα η μελέτη έδειξε αύξηση της έκφρασης HSD3B2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2, AKR1C2, AKR1C1 και UGT2B15. Μία άλλη μελέτη CRPC μεταστάσεων που παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα DHT και τεστοστερόνης, έδειξε αυξημένη έκφραση STAR, CYP17A, HSDB1/2, HSD17B3, AKR1C3, SRD5A, UGT2B15/17, CYP19A και μειωμένη έκφραση SRD5A2 [54],[55]. Άλλες σχετικές μελέτες δεν έχουν δείξει ενίσχυση της έκφρασης του ενζύμου CYP17A σε CRPC αλλά επιβεβαιώνουν τα παραπάνω αποτελέσματα και ειδικότερα την αυξημένη έκφραση HSD17B3 και AKR1C3 [56],[57]. Το ένζυμο AKR1C3 έχει πρόσφατα ταυτοποιηθεί και ως ένας συνενεργοποιητής του AR με διπλό ρόλο στην ενίσχυση της σύνθεσης του συνδέτη, δηλαδή της DHT, και την ενεργοποίηση του AR [58].

## 1.3 Ο ΑΝΔΡΟΓΟΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

### 1.3.1 Δομή του AR

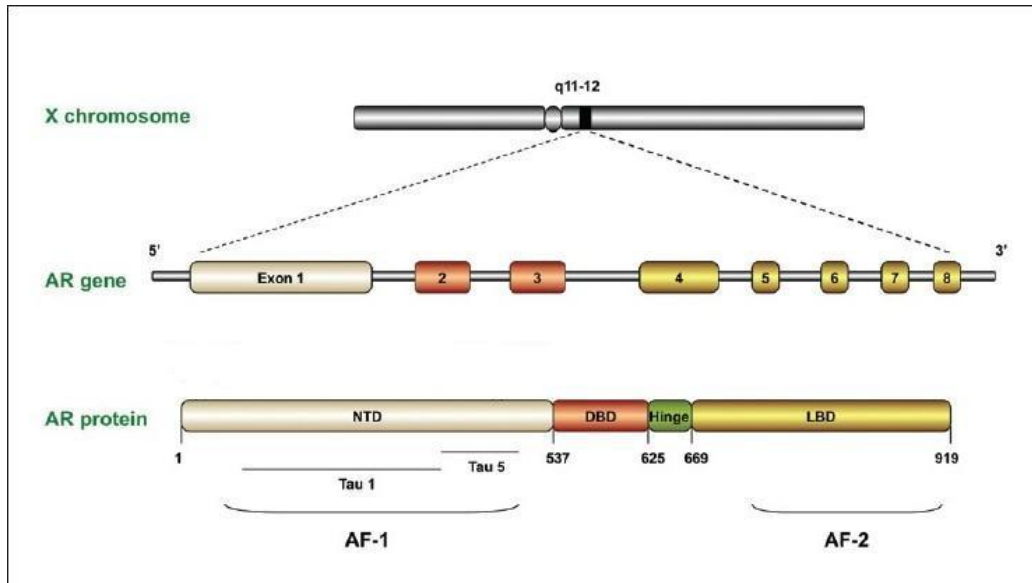
Ο ανδρογονικός υποδοχέας (AR) αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που εντοπίζεται στα κύτταρα των άρρενων αναπαραγωγικών οργάνων (πρόσθιος λοβός του προστάτη, σπερματοδόχος κύστη, όρχεις, επιδιδυμίδα), στα κύτταρα του υπογνάθιου αδένου, της υπόφυσης, του εγκεφάλου (προοπτική περιοχή υποθαλάμου), τα επινεφρίδια, τους αδένες του δέρματος και τον μυϊκό ιστό. Ο AR ανήκει στην υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων των στεροειδών και θυρεοειδικών ορμονών, οι οποίοι δεσμεύονται σε ορμονορυθμιζόμενα στοιχεία απόκρισης (Hormone Response Elements, HRE) γονιδίων-στόχων ελέγχοντας με τον τρόπο αυτό τη μεταγραφή [59]. Στον αναπτυσσόμενο προστάτη μόνο τα κύτταρα του στρώματος εκφράζουν τον υποδοχέα AR, ενώ στον προστάτη του ενήλικα ανθρώπου ο υποδοχέας AR ανιχνεύεται τόσο στο στρώμα όσο και στο επιθήλιο.

Το γονίδιο του AR έχει χαρτογραφηθεί στο μακρύ βραχίονα (Xq11-12) του X χρωμοσώματος [60], διαθέτει 8 εξόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με 919 αμινοξέα και μοριακό βάρος 98,8 kD. Τα γονίδια που ενεργοποιούνται από τον AR περιέχουν συγκεκριμένες αλληλουχίες στις ρυθμιστικές περιοχές τους (εκκινητής/ενισχυτής) που αναγνωρίζονται από τον AR και ονομάζονται AREs (Androgen Response Elements). Το πιο γνωστό γονίδιο-στόχος του AR είναι το PSA, το οποίο περιέχει AREs. Το γονίδιο του AR περιέχει μια κεντρική περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA binding domain, DBD), μια περιοχή σύνδεσης με τον συνδέτη στο καρβοξυλικό άκρο (Ligand-binding domain, LBD), και δύο δυναμικές περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (AF-1 και AF-2). Αναλυτικότερα, ο AR που παράγεται περιλαμβάνει (Εικόνα 7):

- Μια αμινοτελική περιοχή μεταγραφής (N-terminal transactivation domain, NTD), η οποία εμπλέκεται στη μεταγραφική ενεργοποίηση (AF-1 και AF-5) ανεξάρτητα από την αλληλεπίδραση της LBD με το συνδέτη και κωδικοποιείται από το 1ο εξόνιο.
- Μία περιοχή δέσμευσης του συνδέτη στο καρβοξυτελικό άκρο του (C-terminal ligand binding domain, LBD), η οποία εμπλέκεται στη μεταγραφική ενεργοποίηση AF-2 αλληλεπιδρώντας

με διάφορα ρυθμιστικά μέρη και συμπαράγοντες και κωδικοποιείται από τα εξόνια 4-8 του γονιδίου του AR.

- Μία κεντρική περιοχή δέσμευσης του DNA (DNA-binding domain, DBD) που κωδικοποιείται από τα εξόνια 2 και 3 του γονιδίου του AR και διαθέτει μια πρωτεΐνη δομής δακτύλων ψευδαργύρου τύπου II (type II zinc finger motif).
- Μία περιοχή σύνδεσης των περιοχών DBD και LBD.



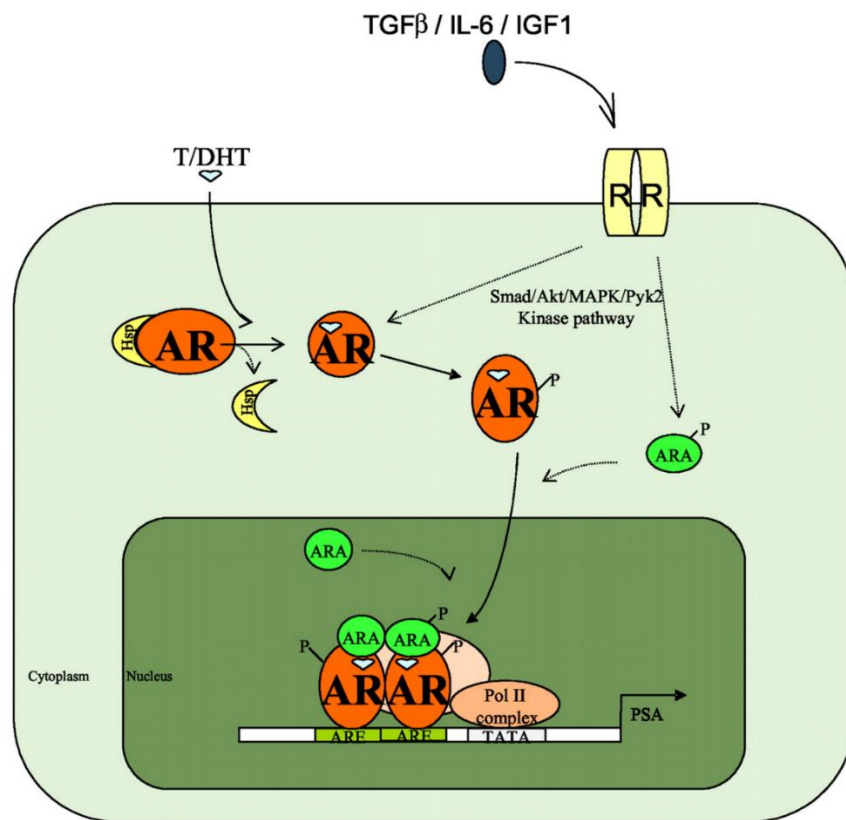
**Εικόνα 7: Η δομή του γονιδίου και της πρωτεΐνης του AR.** NTD = Αμινοτελική περιοχή μεταγραφής, DBD = Η περιοχή δέσμευσης του DNA, Hinge= περιοχή σύνδεσης των DBD και LBD και LBD = Η περιοχή σύνδεσης με τον συνδέτη στο καρβοξυλικό άκρο [61].

### 1.3.2 Ο ρόλος του AR στον προστάτη

Η προγεννητική ανάπτυξη του προστάτη εξαρτάται από την έκκριση των ανδρογόνων και ιδιαίτερα της DHT. Αν και οι εμβρυικοί όρχεις παράγουν τεστοστερόνη, η ενδοκυτταρική αναγωγή της τεστοστερόνης από το ένζυμο 5α-αναγωγάση είναι αναγκαία για την πλήρη μορφογένεση του προστάτη. Την 10<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης, προκύπτει η πρώτη δομή του προστάτη από τις επιθηλιακές αποφύσεις της ουρογεννητικής κοιλότητας και αναπτύσσεται μέσα στην μεσεγχοματογενή περιοχή κάτω από την ανάπτυξη της ουροδόχου κύστης. Η 5α-αναγωγάση είναι παρούσα στην ουρογεννητική κοιλότητα πριν και κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του

προστάτη [62]. Ο προστάτης που αναπτύσσεται σε ανθρώπους με έλλειψη της έκφρασης του γονιδίου της 5α-αναγωγάσης είναι μικρός ή μη ανιχνεύσιμος. Η αναστολή της 5α-αναγωγάσης κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου στους επίμυες έχει ως αποτελέσματα τη μερική ανάπτυξη του προστάτη [63]. Ο μερικός σχηματισμός του προστάτη που παρουσιάζεται με την έλλειψη του ενζύμου 5α-αναγωγάση υποδηλώνει ότι η έναρξη της ανάπτυξης του προστάτη μπορεί να συμβεί σε απόκριση εξαιρετικά χαμηλών επιπέδων DHT ή σε απόκριση μόνο της τεστοστερόνης, αλλά επίσης ότι είναι και απαραίτητη μια οριακή συγκέντρωση της DHT για την πλήρη μορφογένεση του προστάτη [64]. Η έναρξη της ανάπτυξης του προστάτη εξαρτάται από το λειτουργικό ανδρογονικό υποδοχέα που λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας και καθορίζει τη σεξουαλική διαφοροποίηση του άρρενος φύλου ενδομητρίως, την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών φύλου και την παραγωγή σπέρματος στην εφηβεία, την ανάπτυξη του προστάτη αδένου στον ενήλικα και την πρωτογενή κυτταρική αύξηση στον καρκίνο προστάτη [65].

Στους άρρενες, η τεστοστερόνη μεταφέρεται εντός του προστατικού κυττάρου όπου με τη βοήθεια του ενζύμου 5α-αναγωγάση μετατρέπεται στο δραστικό μεταβολίτη της 5α-διυδροτεστοστερόνη (DHT). Η DHT έχει πενταπλάσια συγγένεια για τον πυρηνικό AR συγκριτικά με την τεστοστερόνη. Τα ανδρογόνα, τεστοστερόνη και DHT, συνδέονται με τον AR στον πυρήνα του κυττάρου-στόχου και υφίσταται στερεοτακτικές αλλαγές. Το σύμπλοκο προσδένεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων του χρωμοσωμικού DNA, τα HREs επηρεάζοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα διαφόρων γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων ασκούν ανδρογόνο δράση. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας δεσμεύεται σε στοιχεία απόκρισης AREs, σε αλληλουχίες βάσεων πλησίον κάποιου γονιδίου και μεταβάλλει το ρυθμό μεταγραφής των γονιδίων στόχων. Το μεταγραφικό σύμπλοκο περιέχει επίσης συν-ενεργοποιητές (p160, CPB, p300) και RNA πολυμεράσες, ενώ η μεταγραφή σταματάει με την πρόσδεση στο σύμπλοκο σχετικών καταστολέων. Πέρα από την ενεργοποίηση του από τα ανδρογόνα, ο AR αλληλεπιδρά με άλλες σηματοδοτικές οδούς μέσω δεύτερων αγγελιοφόρων, όπως η οδός EGFR (μέσω Ras/Raf/MEK), PTEN (μέσω PI3K/Akt) κ.α, ρυθμίζοντας έτσι οδούς που έχουν σχέση με κυτταρική αύξηση, διαφοροποίηση και επιβίωση [66] (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8: Η αλληλεπίδραση ανδρογόνων-AR στον προστάτη.** Η τεστοστερόνη (T) και η DHT συνδέονται με τον AR και προάγουν τη σύνδεση του AR με τους ρυθμιστικούς παράγοντες (ARAs). Μετά από αυτή τη σύνδεση ο AR μετατοπίζεται στον πυρήνα και συνδέεται με στις AREs περιοχές των υποκινητών των γονιδίων στόχων πυροδοτώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Οι σηματοδοτικές οδοί των παραγόντων TGFβ, IL-6 και IGF-I μπορούν επίσης να ενισχύσουν δραστηριότητα του AR μέσω της φωσφορυλίωσης του AR ή/και των ARAs. (Hsp, Heat shock protein; R, membrane receptor; P, protein phosphorylation) [67]

### 1.3.3 Ο ρόλος του AR στον καρκίνο του προστάτη – Ανάπτυξη μηχανισμών αντίστασης που οδηγούν σε CRPC

Η έκφραση του AR διατηρείται και συχνά είναι αυξημένη κατά την καρκινογένεση του προστάτη και τη μετάβαση από τον ορμονο-εξαρτώμενο στον ευνουχο-άντοχο τύπο καρκίνου (CRPC), ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της μακροχρόνιας απουσίας των ανδρογόνων (ανδρογονικός αποκλεισμός). Ωστόσο, ο AR εντοπίζεται πάντοτε στους καρκινικούς όγκους, ανεξαρτήτως των κυκλοφορούντων επιπέδων των ανδρογόνων και της κατάστασης της ανδρογόνης εξάρτησης [56]. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο υποδοχέας του γονιδίου του ανδρογονικού υποδοχέα είναι συνεχώς ενεργοποιημένος κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του PCa [68]. Η έκφρασή του

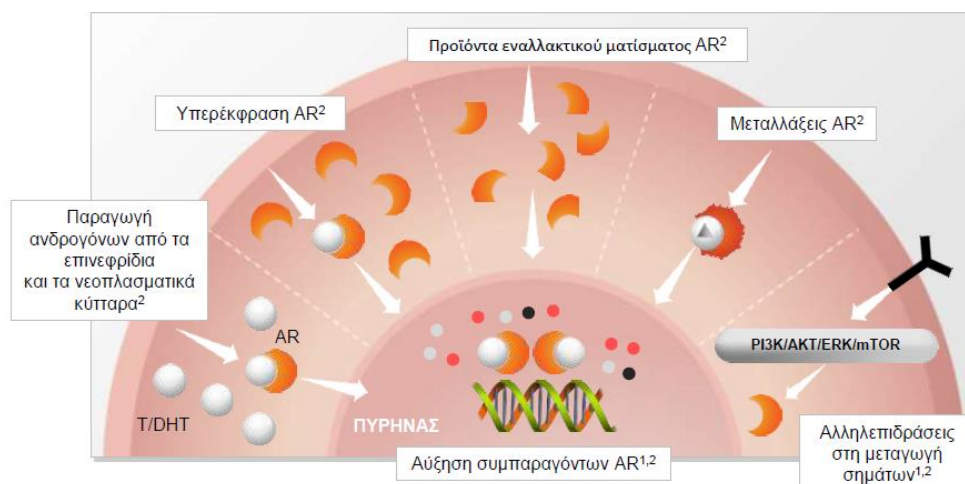
καταστέλλεται μόνο σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις του CRPC, πιθανώς μέσω της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου [69].

Συνεπώς, από τον AR υποδοχέα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό η εξέλιξη και η ανάπτυξη της ορμονο-ανεξαρτησίας του καρκίνου του προστάτη. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι ο κοινός παρονομαστής της ορμονο-αντοχής σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα είναι η υπερέκφραση του AR [70]. Αυτή η υπερέκφραση οδηγεί σε υπερευαισθησία υπό την παρουσία ακόμα και πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων ανδρογόνων. Επιπλέον, αυτή η υπερέκφραση είναι ικανή να τροποποιήσει την δράση των αντι-ανδρογόνων (π.χ. βικαλουταμίδα), να τους μετατρέψει σε αγωνιστές του AR και να επιφέρει κυτταρική αύξηση ακόμη και σε απουσία ανδρογόνων [70].

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ο ανδρογονικός υποδοχέας τροποποιεί τη δράση του και συμβάλλει στην ανάπτυξη της ορμονοαντοχής μπορούν να χωριστούν σε πέντε μεγάλες κατηγορίες και είναι οι παρακάτω:

- ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου και η υπερέκφραση του AR
- οι μεταλλάξεις του γονιδίου AR
- τα προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου
- η παραγωγή ανδρογόνων από τα επινεφρίδια
- η μεταβολή των ρυθμιστικών παραγόντων που σχετίζονται με την έκφραση του γονιδίου AR

καθώς και διάφορες αλληλεπιδράσεις κατά τη μεταγωγή σημάτων (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9: Μηχανισμοί ανάπτυξης του CRPC που εξαρτώνται από AR.** Κατηγοριοποίηση των βασικών μηχανισμών αντίστασης που εξαρτώνται από τον ανδρογονικό υποδοχέα και οδηγούν στη μετάβαση από τον ορμονο-εξαρτώμενο στον ευνουχο-άντοχο (CRPC) τύπο καρκίνου του προστάτη

## 1.4 Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΤΑ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΑ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

### 1.4.1 Νευροπεπτίδια

Τα νευροπεπτίδια έχουν συσχετισθεί με πολλές διαδικασίες στον καρκίνο του προστάτη συμπεριλαμβανομένων της μετάστασης και της εξέλιξής του σε ανδρογόνο-ανεξάρτητο. Νευροπεπτίδια όπως η βομβεσίνη, η νευροτενσίνη και οι ενδοθηλίνες είναι μιτογόνοι παράγοντες και συνδέονται με επταδιαμεμβρανικούς υποδοχείς (7TM receptors) ή GPCRs (G protein - coupled receptors) της επιφάνειας των καρκινικών κυττάρων και ενεργοποιούν πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην κυτταρική ανάπτυξη [71]–[73].

Έχει βρεθεί ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα συχνά χρησιμοποιούν τη φυσιολογική λειτουργία των υποδοχέων GPCRs, όπως οι υποδοχείς της ενδοθηλίνης, για να πολλαπλασιάζονται αυτόνομα, να αποφεύγουν την ανοσολογική άμυνα, να αυξάνουν την παροχή θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου, να διηθούν τους παρακείμενους ιστούς και να μεταναστεύουν σε άλλα όργανα. Η μη φυσιολογική έκφραση των GPCRs και η αυτοκρινής ή παρακρινής ενεργοποίηση τους από τους αγωνιστές τους, που εκλύονται από τον όγκο ή από τα στρωματικά κύτταρα, είναι μια από τις πιο συχνές τακτικές που χρησιμοποιούνται από τα καρκινικά κύτταρα για την διέγερση των GPCRs και κατ'επέκταση των σηματοδοτικών τους οδών, όπως η οδός Akt, MAPK, PKC και EGFR [74].

Η σύνδεση των νευροπεπτιδίων με τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας ρυθμίζεται αρνητικά από εξοκυττάρια ένζυμα όπως η ουδέτερη ενδοπεπτιδάση (NEP) τα οποία καταβολίζουν τα νευροπεπτίδια με υδρόλυση των πεπτιδικών τους δεσμών [75]. Η μείωση της έκφρασης της NEP που συμβαίνει στον προχωρημένο καρκίνο προστάτη, όπως περιγράφηκε παραπάνω, αφήνει ανεμπόδιστη την αυτοκρινή και παρακρινή μιτογόνο δράση των νευροπεπτιδίων, που λειτουργεί ως εναλλακτική οδός ανάπτυξης των PCa κυττάρων σε περιβάλλον χαμηλής συγκέντρωσης ανδρογόνων [76],[77].

Πολλές μελέτες έχουν συσχετίσει την ενδοθηλίνη-1 (ET-1) με την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη, τη μετανάστευση νεοπλασματικών κυττάρων καθώς και με τη συνδυαστική δράση της με άλλους αυξητικούς παράγοντες που εμπλέκονται στα προχωρημένα στάδια καρκίνου του προστάτη [71],[72],[76],[78]. Παρόλα αυτά η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μορίων για τον

καρκίνου του προστάτη με στόχο τη στεροειδογένεση, δημιουργεί την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της ET-1 και άλλων αυξητικών παραγόντων στην ενδοκυττάρια στεροειδογένεση όπως επίσης και της συμμετοχής τους στην ανάπτυξη αντίστασης στις νέες θεραπείες με αναστολείς στεροειδογένεσης.

#### 1.4.1.1 Ενδοθηλίνη-1 (ET-1)

Οι ενδοθηλίνες (ETs) είναι μια οικογένεια τριών πολυλειτουργικών πεπτιδίων, της ενδοθηλίνης-1 (ET-1), της ενδοθηλίνης-2 (ET-2) και της ενδοθηλίνης-3 (ET-3), οι οποίες είναι ισχυρά αγγειοσυσπαστικά αλλά και μιτογόνα πεπτιδία που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία πολλών ανθρώπινων νεοπλασιών (π.χ. καρκίνου προστάτη, ωθηκών, νεφροκυτταρικού, πνεύμονα, ορθού, μαστού, τραχήλου, ενδομητρίου, εγκεφάλου, σαρκώματος Kaposi, και μελανώματος). Η σημαντικότερη από αυτές, με ισχυρή δράση στα επιθηλιακά κύτταρα, είναι η ET-1 (Gene ID: 1906, Chr6p24.1). Η ET-1 παράγεται από ένα προπεπτίδιο (prepro-ET-1). Αυτό το προπεπτίδιο διασπάται στο μεγάλο πεπτίδιο της ET-1 που στη συνέχεια καταλύεται από το μετατρεπτικό ένζυμο της ενδοθηλίνης (ECE-1, endothelin-converting enzyme 1) και μετατρέπεται στην τελική μορφή της ET-1 [72],[74]. Σύμφωνα με μελέτες αυτό το ένζυμο για τη μετατροπή στην τελική μορφή της ET-1 είναι υπερεκφρασμένο στα καρκινικά προστατικά κύτταρα [79].

Η βιολογική δράση των ενδοθηλινών διενεργείται μέσω της ενεργοποίησης δύο μεμβρανικών υποδοχέων τύπου GPCR, του υποδοχέα ET<sub>A</sub>R (endothelin-A receptor) (Εικόνα 10) και του υποδοχέα ET<sub>B</sub>R (endothelin-B receptor). Ο προχωρημένος και ο μεταστατικός καρκίνος του προστάτη παρουσιάζει αυξημένη έκφραση ET<sub>A</sub>R και μειωμένη έκφραση ET<sub>B</sub>R, διατηρώντας έτσι ισχυρή τη δράση της ET-1 μέσω ET<sub>A</sub>R [72],[80] και υψηλότερα επίπεδα ET-1 στο πλάσμα των ασθενών [72].

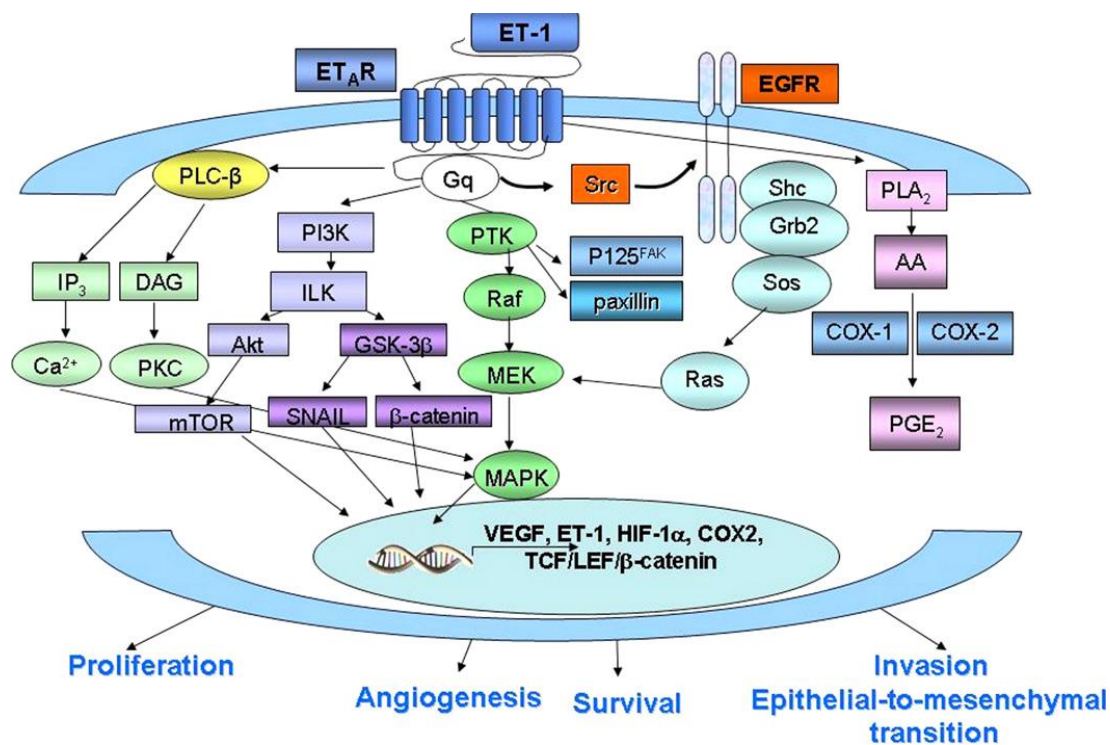
Η σύνδεση της ET-1 στον υποδοχέα ET<sub>A</sub>R πυροδοτεί την ενεργοποίηση ενός δικτύου πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως [74],[81]:

- Τη δραστηριότητα της φωσφολιπάσης C (PLC activity)
- Την αύξηση του ενδοκυττάριου Ca<sup>2+</sup>
- Την ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C



- Την ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK

Τα μονοπάτια αυτά δρουν συνδυαστικά, ώστε να μεταδώσουν το μιτογενές σήμα στον πυρήνα και να προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) έχει αναδειχθεί ως ένας παράγοντας που συμβάλλει επίσης στο δίκτυο των μονοπατιών που ενεργοποιούνται από ET<sub>A</sub>R. Επιπλέον, η ET-1 προάγει την ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφατιδυλινωσιτόλης-3 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K), όπου μεσολαβεί η πρωτεϊνική κινάση B (PKB ή Akt), γεγονός που υποδεικνύει ότι ο άξονας της ενδοθηλίνης ενεργοποιεί ένα πολύπλοκο δίκτυο σηματοδότησης, που είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με την κυτταρική αύξηση [81] (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10: Ο άξονας της ET-1.** Η σύνδεση της ET-1 με τον υποδοχέα ET<sub>A</sub>R πυροδοτεί την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω της σύνδεσης της υπομονάδας Gq με το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα. Αυτή η σύνδεση προκαλεί ενεργοποίηση ενός δικτύου σηματοδοτικών μονοπατιών που περιλαμβάνει την PLC και παράλληλη αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca<sup>2+</sup> και την ενεργοποίηση της PKC και PTKs (FAK, paxillin) που καταλήγουν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού RAF/MEK/MAPK. Η ET-1 ενεργοποιεί την PI3K που οδηγεί στην επακόλουθη ενεργοποίηση του μονοπατιού Akt και σε αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών μέσω του μονοπατιού mTOR

και παράλληλα η ET-1 προκαλεί και τη φωσφορυλίωση της GSK-3 που εξαρτάται από το ILK με σκοπό τη μεταγραφή γονιδίων του πυρήνα. Επιπλέον, η ET-1 προκαλεί ενεργοποίηση του EGFR μέσω c-Src που οδηγεί εν μέρει στην ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK και προάγει την έκφραση των γονιδίων COX-1 και -2, PGE2 και την παραγωγή VEGF. Η ενεργοποίηση πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών και η συντονισμένη δράση τους ρυθμίζει πολλές λειτουργίες όπως η αύξηση του όγκου, η επιβίωση, η αγγειογένεση αλλά και η ικανότητα διήθησης των κυττάρων. [81].

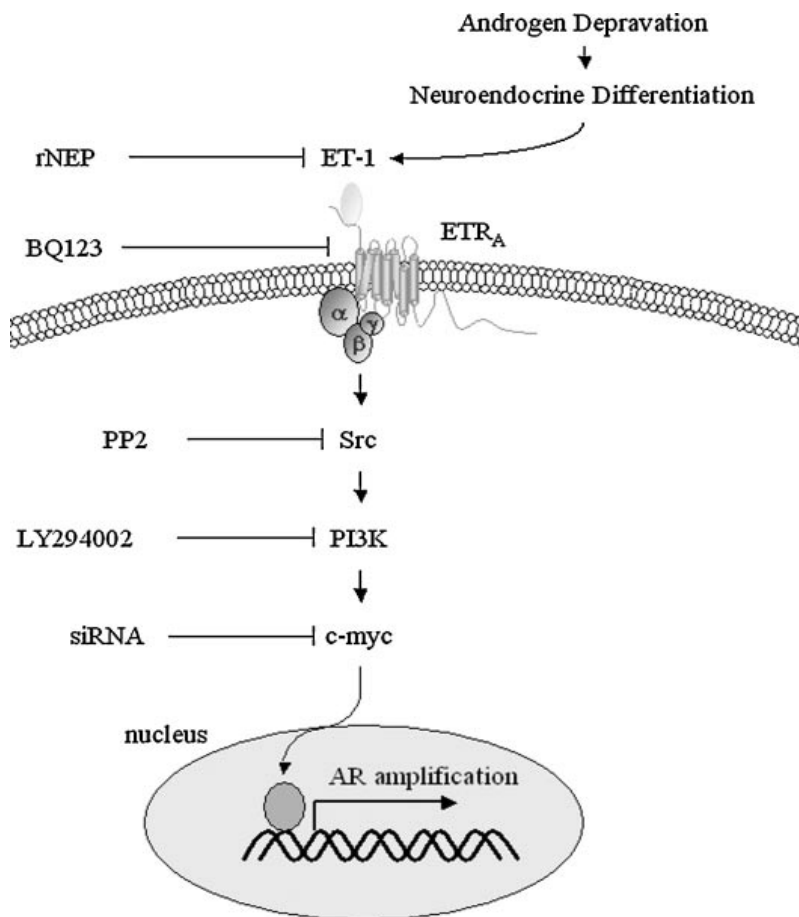
Η ET-1 διεγείρει τη σύνθεση του DNA και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε διάφορα καρκινικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων του προστάτη, του τραχήλου της μήτρας και των ωοθηκών. Σε αυτές τις καρκινικές κυτταρικές σειρές, η αυθόρμητη ανάπτυξη πυροδοτήθηκε σημαντικά υπό την παρουσία του ET<sub>A</sub>R και όχι του ανταγωνιστικού ET<sub>B</sub>R, αποδεικνύοντας ότι η ενδογενής ET-1 δρα ως αυτοκρινής ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων μόνο μέσω ET<sub>A</sub>R. Στον καρκίνο του προστάτη, όπου η έκφραση του ET<sub>B</sub>R είναι κυρίως στο επιθηλιακά κύτταρα παρουσιάζει ανταγωνιστική δράση με αυτή του ET<sub>A</sub>R [82].

Η μιτογενετική δραστηριότητα της ET-1 μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω με τις συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις άλλων παραγόντων ανάπτυξης συμπεριλαμβανομένων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF), του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (bFGF), του αυξητικού παράγοντα της ινσουλίνης (IGF), του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF) και την ιντερλευκίνη-6 (IL-6) [72].

Ο άξονας της ενδοθηλίνης έχει αναγνωριστεί ότι συμβάλει σημαντικά στην παθοφυσιολογία του καρκίνου του προστάτη. Στον φυσιολογικό αδένα του προστάτη, η ET-1 παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της βρέθηκαν στο σπερματικό υγρό. Στον καρκίνο του προστάτη, οι συγκεντρώσεις των βασικών συστατικών του μονοπατιού εκκαθάρισης της ET-1, δηλαδή ο υποδοχέας ET<sub>B</sub>R και η πρωτεΐνη NEP, είναι μειωμένες, με αποτέλεσμα την αύξηση των τοπικών συγκεντρώσεων της ET-1. Η αυξημένη έκφραση του ET<sub>A</sub>R παρατηρείται τόσο στον πρωτοπαθή όσο και στον μεταστατικό καρκίνο του προστάτη και αυξάνεται ανάλογα με το στάδιο της νόσου. Με την ενεργοποίηση του υποδοχέα ET<sub>A</sub>R, η ET-1 εμπλέκεται παθολογικά σε διάφορες πτυχές της εξέλιξης του καρκίνου του προστάτη γιατί προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη νεοαγγειογένεση, την αντι-αποπτωτική ικανότητα και το μεταστατικό δυναμικό των ογκοκυττάρων [74],[81].

Τέλος θα πρέπει να επισημανθεί ότι η παρουσία της ενδοθηλίνης ET-1 προάγει, μέσω της οδού Src/PI3K, την έκφραση της πολυλειτουργικής πυρηνικής φωσφοπρωτεΐνης του ογκογονιδίου

c-myc, το οποίο ενισχύει την έκφραση του ανδρογονικού υποδοχέα AR στο καρκίνο του προστάτη. Η ET-1 προκαλεί παροδική αύξηση των επιπέδων του mRNA του ογκογονιδίου c-myc, του οποίου η έκφραση επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, τον κυτταρικό μετασχηματισμό [83] και αυξάνει την αλληλεπίδραση μεταξύ του mRNA του c-myc και της περιοχής όπου δεσμεύεται στον ενισχυτή του γονιδίου AR συμμετέχοντας στην έκφραση του [84]. Ο υποδοχέας AR μπορεί να ρυθμίσει τη μεταγραφή του δικού του γονιδίου μέσω ενός μηχανισμού στον οποίο το ογκογονίδιο c-myc διαδραματίζει κρίσιμο μεταγραφικό ρόλο. Η παροδική επιμόλυνση των κυττάρων με τα siRNA του c-myc εξουδετερώνει την επαγόμενη από την ET-1 έκφραση του AR, υποδηλώνοντας ότι τα υψηλά επίπεδα των πρωτεϊνών και των mRNA του AR που συνδέονται με την ET-1 είναι c-myc εξαρτώμενα. Ωστόσο η έκφραση του AR καταστέλλεται από αναστολείς των πρωτεϊνών Src και PI3K ή από την αποδιάταξη της c-myc θέση πρόσδεσης του ενισχυτή του γονιδίου AR (Εικόνα 11) [84].



**Εικόνα 5:** Σχηματική απεικόνιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που απεικονίζουν την επίδραση της ET-1 στην έκφραση του AR. Μετά τη στέρηση ανδρογόνων, η ET-1 ενισχύει την έκφραση του ογκογονιδίου c-myc, μέσω της ενεργοποίησης των μονοπατιών των Src και PI3K, οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα μεταγραφής του AR.

## 1.4.2 Η ουδέτερη ενδοπεπτιδάση NEP

### 1.4.2.1 Φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες της ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης NEP

Η ουδέτερη ενδοπεπτιδάση (NEP ή νεπριλυσίνη, εγκεφαλινάση, ενδοπεπτιδάση 2, CALLA, CD10) (EC 3.4.24.11, GenBank ID: 4311, UniProt ID: P08473) είναι μια επιφανειακή μεταλλο-ενδοπεπτιδάση τύπου θερμολυσίνης της οικογένειας M13 πεπτιδασών, εντοπίζεται στο χρωματόσωμα 3 (3q21-27) και έχει μοριακό βάρος 90-110 kDa. Η πρωτεϊνική της αλληλουχία αποτελείται από 750 αμινοξέα και εκφράζεται σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του προστάτη. Η NEP αποτελείται από τρεις δομές, ένα N-άκρο κυτοπλασματικό, μια υδροφοβική

μεμβρανική δομή και μια μεγάλη εξωκυττάρια δομή που είναι υπεύθυνη για τη καταλυτική της δραστηριότητα. Η NEP εξαρτάται από τον ψευδάργυρο και διασπά πεπτιδικούς δεσμούς σε πεπτίδια μήκους έως και 30 αμινοξέων, στην αμινική πλευρά των υδρόφοβων αμινοξέων τους, ιδιαίτερος σε θέσεις φαινυλαλανίνης (Phe) ή τυροσίνης (Tyr). Η NEP έχει την ικανότητα να υδρολύει και απενεργοποιεί μια σειρά ενεργών νευροπεπτιδίων (neuropeptides, NPs) όπως την ενδοθηλίνη-1 (ET-1), τα πεπτίδια τύπου βομβεσίνης, τα οπιούχα πενταπεπτίδια Met- και Leu-εγκεφαλίνη, τη βραδυκινίνη, τη αγγειοτενσίνη 1 και 2, την νευροτενσίνη και την οξυτοκινίνη. Επομένως, η NEP μειώνει τη συγκέντρωση των νευροπεπτιδίων τοπικά και εμποδίζει τη σύνδεση τους με τους κυτταρικούς τους υποδοχείς και τη μετάδοση του μιτογόνου σήματος τους. Έτσι, λειτουργεί σε διάφορα συστήματα οργάνων για να μειώσει την ανταπόκριση σε αυτές τις πεπτιδικές ορμόνες [75],[85],[86].

#### **1.4.2.2 NEP και καρκίνος προστάτη**

Η NEP έχει εμπλακεί στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού υδρολύοντας νευροπεπτίδια, όπως η ενδοθηλίνη και πεπτίδια τύπου βομβεσίνης, που έχουν αποδειχθεί ισχυρά μιτογόνα τόσο για τα καλοήθη, όσο και για τα κακοήθη κύτταρα [76]. Η απώλεια και η μειωμένη έκφραση της NEP έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση υψηλότερων συγκεντρώσεων πεπτιδίων (ET-1, βομβεσίνη, νευροτενσίνη, βραδυκινίνη κ.α.) στην επιφάνεια των κυττάρων, τα οποία διαταράσσουν την κυτταρική ομοιόσταση και διευκολύνουν την ανάπτυξη και εξέλιξη νεοπλασμάτων [75],[87]. Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι τα νευροπεπτίδια ενεργούν ως μιτογόνα για πολλούς τύπους καρκίνου, όπως ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα και ο καρκίνος του προστάτη [71],[88].

Η NEP που φυσιολογικά εκφράζεται στα προστατικά επιθηλιακά κύτταρα έχει σαν υποστρώματα τη βομβεσίνη, την ενδοθηλίνη και τη νευροτενσίνη που έχουν συσχετισθεί σε ποικίλα στάδια του καρκίνου του προστάτη, συμπεριλαμβανομένου της καρκινικής ανάπτυξης, της μετάστασης και της εξέλιξης σε ανδρογόνο - ανεξάρτητο καρκίνο [89]. Γενικά η απώλεια της έκφρασης της NEP παρατηρείται πολύ συχνά στον καρκίνο του προστάτη και τα προστατικά καρκινικά. Αυτή η μείωση της έκφρασης της NEP μπορεί να συμβάλει στην εξέλιξη του καρκίνου επιτρέποντας τα νευροπεπτίδια να συνδέονται με τους υποδοχείς τους και να προάγουν μονοπάτια κυτταρικής ανάπτυξης [90]. Πιο αναλυτικά η NEP [76],[78],[90]:

1. Αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και την ογκογένεση
2. Αναστέλλει την κυτταρική διήθηση και τη μετάσταση
3. Επιφέρει απόπτωση και διακοπή του κυτταρικού κύκλου
4. Παρεμβάλλεται με άλλες πρωτεΐνες που καταστέλλουν τον όγκο
5. Έχει αντί-αγγειογενετική δράση

Κατά τη μετάβαση στην ανδρογόνου-ανεξαρτησία, η NEP βρέθηκε να έχει μειωμένη ή κατασταλμένη έκφραση [90], συχνά μέσω της υπερμεθυλίωσης του προωθητή της [91]. Επιπλέον, φαίνεται ότι η θεραπεία στέρησης ανδρογόνων οδηγεί σε εμφάνιση κλώνων με μειωμένη την έκφραση της NEP, καθώς η τελευταία είναι μεταγραφικό γονίδιο-στόχος του υποδοχέα ανδρογόνων και ως εκ τούτου η έλλειψη ανδρογόνων μειώνει την μεταγραφή της [90],[92]. Φαίνεται ότι τα προστατικά καρκινικά κύτταρα που επιβιώνουν της θεραπείας στέρησης ανδρογόνων έχουν μειωμένα επίπεδα NEP. Πράγματι, έλλειψη έκφρασης της NEP παρατηρήθηκε σχεδόν στο 50% τόσο του πρωτοπαθούς, όσο και του μεταστατικού καρκίνου του προστάτη [90],[93], και συσχετίζεται με βιοχημική πρόοδο νόσου μετά από προστατεκτομή [80].

### **1.4.3 Αυξητικοί παράγοντες**

Αν και ο ρόλος των ανδρογόνων είναι πολύ σημαντικός, από μόνα τους δεν μπορούν να διατηρήσουν την ομοιόσταση του προστάτη. Καθοριστική συμμετοχή σε αυτή τη διαδικασία έχουν οι αυξητικοί παράγοντες. Κατά την ανάπτυξη του προστάτη παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και των κυττάρων του στρώματος. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές γίνονται μέσω παραγωγής και έκκρισης διαφόρων αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι μέσω της παρακρινούς και της αυτοκρινούς έκκρισης συμμετέχουν στη διατήρηση της ομοιόστασης του αδένου. Αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης και ρύθμισης των αυξητικών παραγόντων και των αντίστοιχων υποδοχέων τους οδηγούν σε ανάπτυξη καρκίνου. Στους όγκους που είναι ανεξάρτητοι από ανδρογόνα, επάγονται τόσο αυτοκρινή όσο και παρακρινή μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν διάφοροι αυξητικοί παράγοντες και οι υποδοχείς

τους, αντικαθιστώντας τον ρόλο των ανδρογόνων [94]. Οι αυξητικοί παράγοντες όπως ο αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων (Hepatocyte Growth Factor, HGF) και ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor, FGF) ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την αγγεογένεση, τη σύνθεση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών για την επιβίωση, τη μετανάστευση και διαφοροποίηση των κυττάρων.

#### **1.4.3.1 Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών τύπου 2 (FGF-2)**

Η οικογένεια του παράγοντα ανάπτυξης των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor – FGF) αποτελείται από είκοσι μέλη. Πρόκειται για πολυπεπίδια μικρού μεγέθους τα οποία έχουν έναν κεντρικό πυρήνα με 140 αμινοξέα, εμφανίζουν παρόμοια δομή και παρουσιάζουν διακριτές λειτουργίες [95]. Τα δύο πρώτα μέλη της οικογένειας, ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών-1 (FGF-1, aFGF, όξινος FGF) και κυρίως ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών-2 (FGF-2, bFGF, βασικός FGF) φαίνεται να εμπλέκονται στην αγγειογένεση [95]. Οι υποδοχείς του FGF που έχουν ανακαλυφθεί έως σήμερα είναι τέσσερις οι υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα -1,-2,-3,-4 (FGFR-1, -2, -3, -4) [96]. Ο FGFR-1 είναι ο κύριος υποδοχέας του FGF που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα με ρόλο τη ρύθμιση του ενδοθηλιακού πολλαπλασιασμού, τη μετανάστευση και τη δημιουργία των τριχοειδών [97].

Το ανθρώπινο γονιδίωμα διαθέτει ένα και μοναδικό γονίδιο που κωδικοποιεί τον FGF-2 και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 4q 26-27. Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει μέγεθος 40 kb και η κωδικοποιούσα αλληλουχία οργανώνεται σε τρία εξόνια, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται δύο εσόνια. Εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης, από διαφορετικά κωδικόνια, οδηγεί σε 4 ισομορφές του FGF-2 με διαφορετική μοριακή μάζα και βιολογικές δράσεις. Οι ισομορφές αυτές έχουν μοριακή μάζα 18 kDa, 22,5 kDa, 23,1 kDa και 24,2 kDa. Η κυτταρική κατανομή της ισομορφής με μοριακή μάζα 18 kDa είναι κυτταροπλασματική, δύναται να εκκριθεί και δεσμεύεται στους υποδοχείς FGFRs διεγείροντας τη μεταγωγή σήματος. Οι υπόλοιπες ισομορφές του FGF-2 (22-24 kDa) εντοπίζονται στον πυρήνα και προάγουν την αύξηση των κυττάρων [98]. Ο υποδοχέας FGFR-1 έχει ανιχνευθεί στον πυρήνα αρκετών τύπων κυττάρων, όπου πιστεύεται ότι αλληλεπιδρά άμεσα με τις υψηλής μοριακής μάζας ισομορφές του FGF-2 [99].

Ο αυξητικός παράγοντας FGF-2, αποτελεί το πλέον μελετημένο μέλος της οικογένειας των FGFs. Ο FGF-2 είναι ένας ευρέως φάσματος μιτογόνο παράγοντας, που ρυθμίζει την αύξηση και

διαφοροποίηση μιας ποικιλίας τύπων κυτταρικών σειρών της μεσοδερμικής, της ενδοδερμικής και της νευροεξωδερμικής περιοχής των κυτταρικών ιστών των οργάνων. Συγκεκριμένα, ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση επιθηλιακών, ενδοθηλιακών και λείων μυϊκών κυττάρων [100].

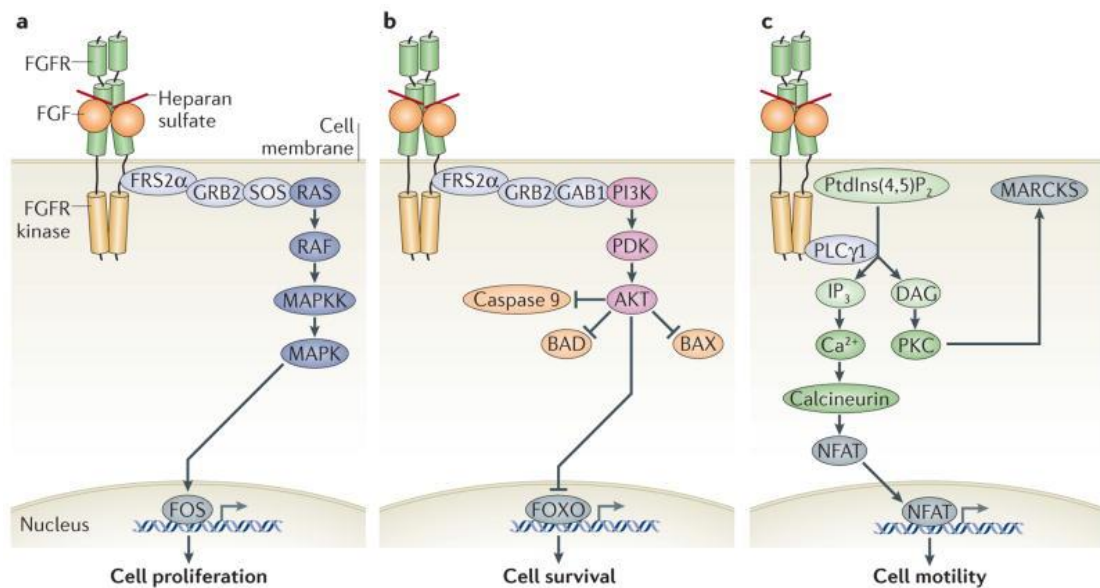
Ο FGF-2 επάγει την επούλωση πληγών, την ανάπτυξη ιστών και την αιματοποίηση και παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία καρκινογένεσης, ενώ η ικανότητά του να διεγείρει την αγγειογένεση τον καθιστά υπεύθυνο παράγοντα τόσο για την ανάπτυξη των πρωτογενών όγκων, όσο και για την μεταστατική τους ικανότητα. Όσον αφορά την εμπλοκή του στην παθολογία του προστάτη αδένου, έχει προταθεί η συμβολή του στη γένεση της καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη (Benign Prostatic Hyperplasia, BPH) μέσω των αλληλεπιδράσεων στρώματος-επιθηλίου και στην εγκαθίδρυση και ανάπτυξη καρκίνου μέσω αυτοκρινών και παρακρινών δράσεων του [101].

Ο FGF-2 διεγείρει τη μεταγωγή σήματος στο κυτταρόπλασμα, μέσω των διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων με δράση κινάσης της τυροσίνης FGFRs. Μεταξύ των διαφορετικών FGFRs, ο FGF-2 έχει υψηλή συγγένεια για τους υποδοχείς FGFR-1,-2,-3 καθώς και για τον υποδοχέα FGFR-4. Η δέσμευση του FGF-2 σε υποδοχέα FGFR έχει ως συνέπεια την ενεργοποίηση του υποδοχέα, τον επακόλουθο διμερισμό του και φωσφορυλίωση στις κυτταροπλασματικές περιοχές με δράση κινάσης της τυροσίνης, σηματοδοτώντας διακριτά μονοπάτια που παράγουν ποικίλες κυτταρικές αποκρίσεις [86]. Σημαντικά υποστρώματα της κινάσης του FGFR είναι ο FRS2α, ο οποίος συνδέεται δομικά με τον υποδοχέα FGFR, και η φωσφολιπάση PLCγ1 [102]. Ο ενεργοποιημένος FRS2α δεσμεύει την πρωτεΐνη GRB2 [103], η οποία αλληλεπιδρά είτε με τον παράγοντα ανταλλαγής του νουκλεοτίδιου της γουανίνης (son of sevenless, SOS) ή με την πρωτεΐνη τύπου 1 του προσαρμογέα του GRB2 (GAB1) για να προαχθεί η σηματοδότηση. Ο παράγοντας SOS ενεργοποιεί την GTPάση RAS, η οποία εκκινεί την ενεργοποίηση της κινάσης MAPK [103], εναλλακτικά ο GAB1 εκκινεί μέσω της PI3K την ενεργοποίηση της κινάσης Akt. Η ενεργοποιημένη MAPK μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες των γονιδίων στόχων, όπως η FOS, για να επάγει την μεταγραφή των συγκεκριμένων γονιδίων. Το αποτέλεσμα αυτής της οδού είναι πρωτίστως ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, αλλά μπορεί επίσης να οδηγήσει και σε κυτταρική διαφοροποίηση και κυτταρική μετανάστευση ή σε κάποια άλλη κυτταρική απόκριση [104]. Επίσης, το μονοπάτι της ενεργής κινάσης Akt, αδρανοποιεί προ-



αποπτωτικούς τελεστές όπως ο BCL-2 ανταγωνιστής του κυτταρικού θανάτου (BAD) και τους παράγοντες μεταγραφής FOXO (forkhead box class O), προωθώντας έτσι την επιβίωση των κυττάρων [105]. Η πρόσληψη και η φωσφορυλίωση της PLCγ1 από την κινάση FGFR εκκινεί ένα ξεχωριστό μονοπάτι σηματοδότησης που πιστεύεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική μετανάστευση, στην διαφοροποίηση των κυττάρων και μπορεί να επηρεάσει τις οδούς RAS-MAPK και PI3K- Akt (Εικόνα 12) [106].

Η ενεργοποιημένη PLCγ1 καταλύει την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (διφωσφορικής-4,5-φωσφατιδυλνισοιτόλης) σε DAG (διακυλογλυκερόλη) και IP<sub>3</sub> (τριφωσφορική-1,4,5-νισοιτόλης) [106]. Η DAG ενεργοποιεί την PKC (πρωτεΐνη της κινάσης C), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί με φωσφορυλίωση τα υποστρώματα MARCKS (myristoylated Ala-rich C kinase substrate), ένα ρυθμιστή της κυτταρικής κινητικότητας [106]. Η IP<sub>3</sub> διεγείρει την απελευθέρωση των ιόντων ασβεστίου από τα ενδοκυτταρικά αποθέματα και προάγει την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών που εξαρτώνται από το ασβέστιο, όπως την φωσφατάση της καλσινευρίνης. Η ενεργοποιημένη καλσινευρίνη επάγει πυρηνική μετατόπιση του παράγοντα μεταγραφής του πυρηνικού παράγοντα των ενεργοποιημένων T κυττάρων (NPAT), ο οποίος διεγείρει την έκφραση απαραίτητων πρωτεϊνών για κυτταρική κινητικότητα [107], όπως BAX, BCL-2, MAPKK, κινάση MAPK, PDK και τη φωσφοϊνισιτιδο-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (Εικόνα 12) [106].



Εικόνα12: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια του FGF

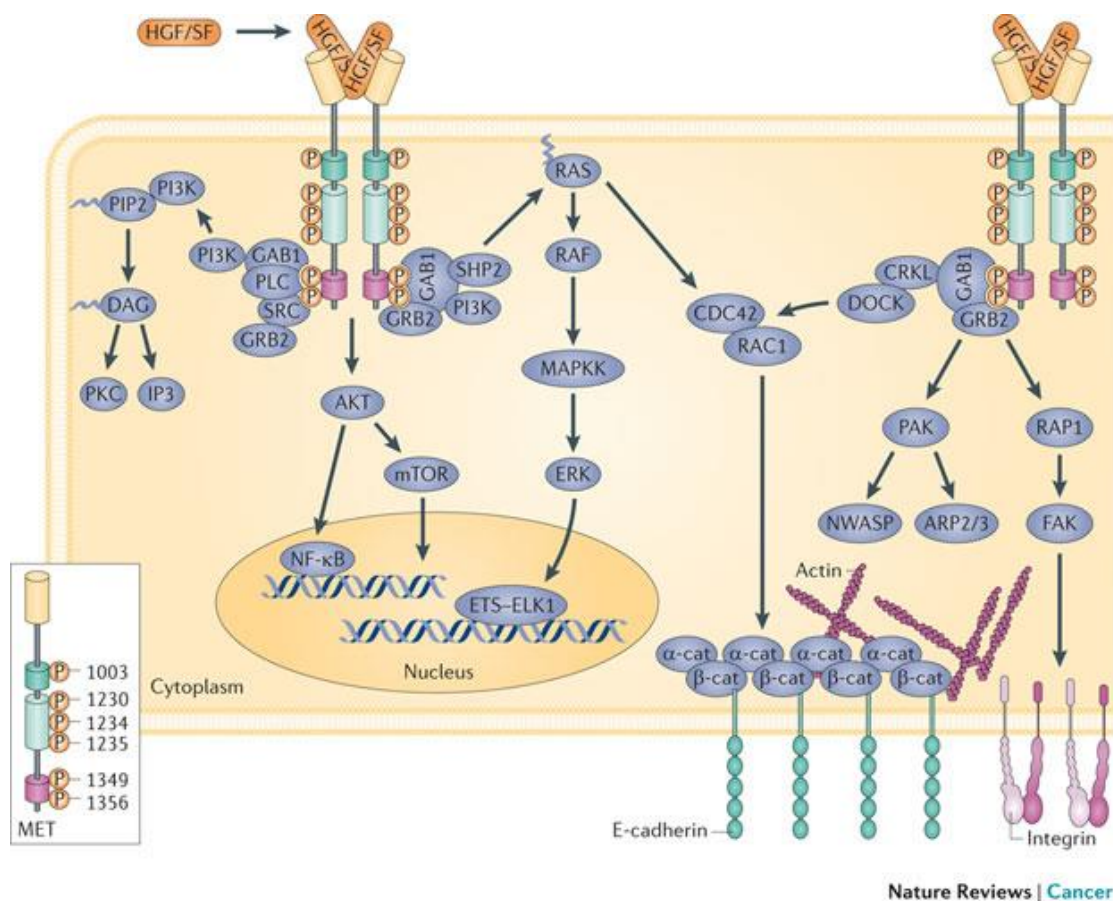
### 1.4.3.2 Αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων (HGF)

Ο αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων (HGF) παράγεται από μονοκύτταρα, αιμοπετάλια, ινοβλάστες, λεία μυϊκά κύτταρα, μαστοκύτταρα και ενδοθηλιακά. Το γονίδιο του HGF βρίσκεται στη θέση 7q21.1, αποτελείται από 20 εξόνια και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HGF που συνδέεται με τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGFR, Met, c-Met) και επηρεάζουν τη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, την κυτταρική κινητικότητα, την ογκογένεση και την μορφογένεση πολλών ειδών κυττάρων και ιστών. Η πρωτεΐνη του HGF ανήκει στην υποοικογένεια των πλασμινογόνων των S1 πεπτιδασών, αν και δεν έχει καμία δραστικότητα πρωτεάσης [108]. Η έκφραση του υποδοχέα της, c-Met, έχει διαπιστωθεί κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου, του λεπτού και του παχέος εντέρου υποδεικνύοντας έτσι ότι πιθανώς να παράγεται από τα κύτταρα του στρώματος και δρα κυρίως με παρακρινικό τρόπο στα επιθηλιακά κύτταρα. Συγκεκριμένα, ο HGF προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μορφογένεση των επιθηλιακών κυττάρων και των ηπατοκυττάρων.

Ο ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας/παράγοντας διασποράς (HGF/SF) προκαλεί διμερισμό και ενεργοποίηση του c-Met στην πλασματική μεμβράνη. Η κυτταροπλασματική φωσφορυλίωση των θέσεων της τυροσίνης του c-Met απεικονίζονται στην Εικόνα 13 και αναφέρονται ως: Tyr1003 είναι στη παραμεμβρανική θέση σύνδεσης CBL (που παρουσιάζεται με πράσινο), οι θέσεις Tyr1230, Tyr1234 και Tyr1235 είναι στην ενεργή θέση της κινάσης (φαίνεται με ανοιχτό πράσινο), και οι θέσεις Tyr1349 και Tyr1356 βρίσκονται στην δισχιδή θέση σύνδεσης (απεικονίζονται με ροζ χρώμα) του c-Met. Διάφορα κυτταροπλασματικά μόρια τελεστών όπως ο υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα 2 (GRB2), η GRB2-σχετιζόμενη πρωτεΐνη δέσμησης 1 (GAB 1), η φωσφολιπάση C (PLC) και η SRC ενεργοποιούνται στη δισχιδή τοποθεσία σύνδεσης του c-Met. Η φωσφορυλιωμένη στην τυροσίνη GAB1 που είναι συνδεδεμένη με την c-Met μπορεί να προσελκύσει επιπλέον πρωτεΐνες σύνδεσης, συμπεριλαμβανομένων της φωσφατάση 2 (SHP2), της PI3K και άλλων, οι οποίες, μαζί με τους υποδοχείς c-Met, ενεργοποιούν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Η σηματοδότηση από τις οδούς RAS-MAPK και PI3K-Akt φθάνει τον πυρήνα να επηρεάζει την γονιδιακή έκφραση και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου [109].

Τα κυτταροπλασματικά μονοπάτια σηματοδότησης που προκαλούνται από την πρωτεΐνη ελέγχου διαίρεσης των κυττάρων RAC1-42 (CDC42) και την ενεργοποιημένη κινάση p21 (PAK) προκαλούν μεταβολές του κυτταροσκελετού. Η σηματοδότηση μέσω των οδών RAP1 και RAC1-

CDC42 φθάνει στην μεμβράνη του πλάσματος και ελέγχει τα μόρια προσκόλλησης της καδερίνης και της ιντεγκρίνης και επηρεάζει την κυτταρική μετανάστευση. Αυτά τα μονοπάτια σηματοδότησης ελέγχουν την κυτταρική επιβίωση και μετανάστευση των κυττάρων [109].



Εικόνα 13: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια του HGF [109].

Υπάρχουν αυξανόμενα στοιχεία από δεδομένα ερευνών που προέρχονται από προ-κλινικά μοντέλα και πρωτοπαθείς ανθρώπινους όγκους, όπου ο παράγοντας HGF που ενεργοποιεί τον υποδοχέα c-Met αποτελεί ένα κρίσιμο ογκογονικό μονοπάτι που συμβάλλει στην εξέλιξη της ανθεκτικής στον ευνοχισμό νόσου. Για παράδειγμα, *in vitro* μελέτες απέδειξαν μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του υποδοχέα ανδρογόνων (AR) και των επιπέδων έκφρασης του c-Met σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτη [110]–[112]. Ο AR επιδρώντας σε γονίδια υπεύθυνα για την έκφραση του c-Met μπορεί να καταστείλει την παραγωγή του [111].

Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα του c-Met ήταν αυξημένα μετά από χημικό ή χειρουργικό ευνουχισμό σε ζωικά μοντέλα του καρκίνου του προστάτη, καθώς επίσης και στον άνθρωπο, παρέχοντας και *in vivo* την επιβεβαίωση των παρατηρήσεων των *in vitro* πειραμάτων [111]. Η αντικαρκινική δράση των αναστολέων του c-Met ενισχύεται σημαντικά όταν συνδυάζεται με θεραπεία στέρησης ανδρογόνων σε προ-κλινικά μοντέλα όπου η έκφραση του c-Met είναι επίσης αυξημένη από ανδρογόνο-ανεξάρτητους μηχανισμούς.

Επιπλέον, νέα στοιχεία υποδεικνύουν ότι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του υποδοχέα c-Met και των άλλων RTKs (Receptors Tyrosine Kinase) οδηγούν σε μη κανονική φωσφορυλίωση του c-Met, δηλαδή φωσφορυλίωση απουσία HGF. Για παράδειγμα, για την ενεργοποίηση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) θα χρησιμοποιηθεί μια c-Src-εξαρτώμενη κινάση που οδηγεί και σε αυξημένη φωσφορυλίωση του c-Met. Αν και ακόμη δεν έχει ερευνηθεί πλήρως, αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση του c-Met μπορεί να είναι ένας μηχανισμός αντίστασης σε ορισμένες θεραπείες που χρησιμοποιούνται στον καρκίνο του προστάτη. Έτσι, πολλοί μηχανισμοί με τους οποίους ο c-Met ενεργοποιείται στα προστατικά καρκινικά κύτταρα επισημαίνουν τον κεντρικό του ρόλο στη μεταγωγή του σήματος και τη σημασία του ως στόχο στο καρκίνο του προστάτη [113],[114].

Η μη φυσιολογική ενεργοποίηση του υποδοχέα c-Met διεγείρει την ανάπτυξη του όγκου, το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση) που εφοδιάζουν τον όγκο με θρεπτικά συστατικά, και την εξάπλωση του καρκίνου σε άλλα όργανα (μετάσταση). Ο υποδοχέας c-Met είναι απορρυθμισμένος σε πολλούς τύπους ανθρώπινων κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του νεφρού, του ήπατος, του στομάχου, του μαστού, του προστάτη και του εγκεφάλου. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι το c-Met εκφράζεται όχι μόνο στα κύτταρα όγκου και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά επίσης σε οστεοβλάστες (κύτταρα σχηματισμού οστών) και οστεοκλάστες (κύτταρα καταβολισμού οστών). Συνεπώς οι αναστολείς του c-Met παραμένουν μια πολλά υποσχόμενη τάξη ενώσεων για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου [109].

### **1.4.3.3 Αυξητικοί παράγοντες και καρκίνος του προστάτη**

Η εμπλοκή των αυξητικών παραγόντων στον καρκίνο είχε φανεί από πρώιμες έρευνες που έδειχναν μειωμένη απαίτηση ορού για την καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων [115]. Η μειωμένη

ή και καθόλου ανάγκη των καρκινικών κυττάρων για εξωγενείς αυξητικούς παράγοντες μπορεί να εξηγηθεί με αυτοκρινή ή παρακρινή έκκριση των παραγόντων. Όντως, πολλοί τύποι καρκινικών κυττάρων συνθέτουν αυξητικούς παράγοντες στους οποίους αποκρίνονται. Επιπλέον, στα καρκινικά κύτταρα οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων μπορεί να υπερεκφράζονται. Η επέκταση του όγκου μπορεί να γίνει μετά από καταστροφή της βασικής μεμβράνης των περιβαλλόντων αγγείων. Οι αυξητικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στη καταστροφή της βασικής μεμβράνης, στη διείσδυση των καρκινικών κυττάρων στο κυκλοφορικό ή το λεμφικό σύστημα και στην εγκατάστασή τους σε νέες θέσεις σε άλλα όργανα [116].

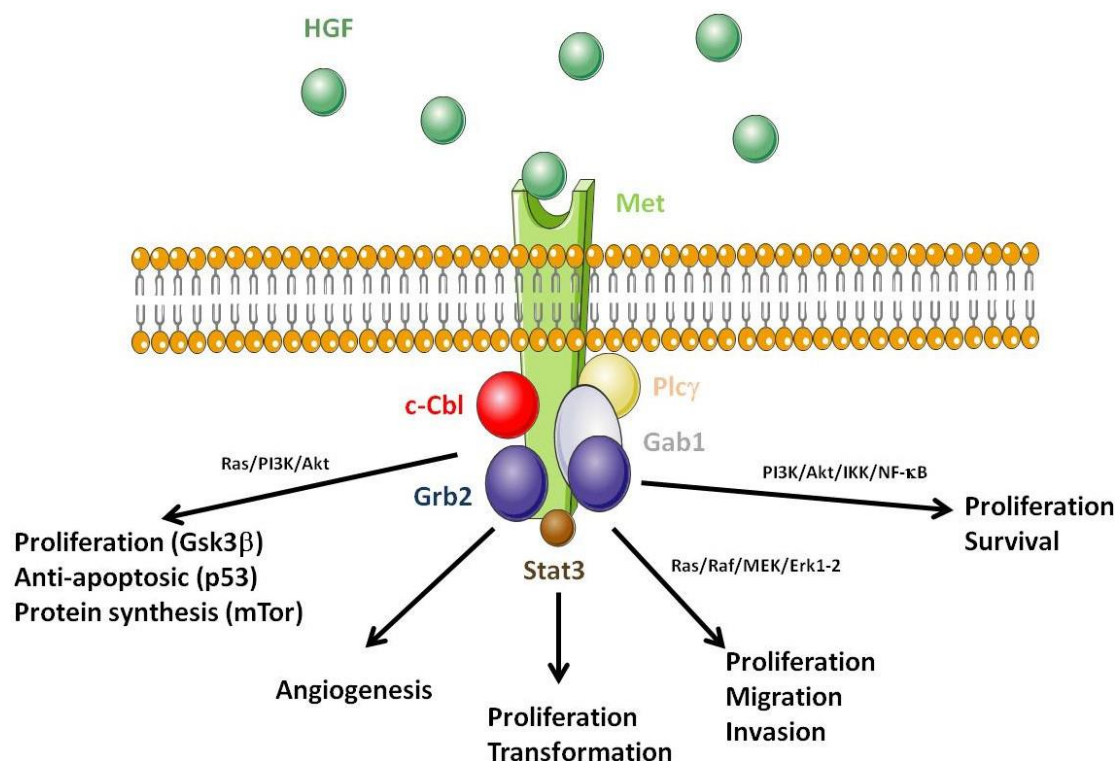
Ο αυξητικός παράγοντας FGF-2 παίζει σημαντικό ρόλο σε αρκετές ασθένειες του ανθρώπινου προστάτη, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Αυξημένη έκφραση του FGF-2 έχει συσχετιστεί με την καλοήγη υπερπλασία του προστατικού αδένου (BPH) και συγκεκριμένα με διέγερση του πολλαπλασιασμού σε κύτταρα του στρώματος [117]. Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα του FGF-2 είναι εξαιρετικά αυξημένα στον καρκινικό ιστό (~2,5 φορές), συγκριτικά με το φυσιολογικό προστάτη [118]. Επιπρόσθετα, υψηλά επίπεδα έκφρασης του FGF-2 έχουν αναφερθεί και σε κυτταρικές σειρές που έχουν προκύψει από μεταστατικό καρκίνο του προστάτη, καθώς επίσης, υψηλά επίπεδα ανιχνεύονται και στον ορό αίματος των ασθενών [119]. Στα πρώτα στάδια εγκαθίδρυσης και ανάπτυξης του καρκίνου του προστάτη, ο FGF-2 δρα με παρακρινή τρόπο καθώς παράγεται κυρίως από τα κύτταρα του στρώματος, ωστόσο η εξέλιξη του καρκίνου σε έναν επιθετικό και μεταστατικό φαινότυπο είναι συνυφασμένη με αυτοκρινή μηχανισμό δράσης του FGF-2, δεδομένου ότι υπερεκφράζεται από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα. Σε συμφωνία με την παραπάνω υπόθεση έρχεται η παρατήρηση ότι σε μύες με καρκίνο του προστάτη, η αυξημένη έκφραση του FGF-2 συσχετίζεται άμεσα με καρκινικούς όγκους χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης [120].

Αξιοσημείωτη είναι η ανίχνευση των ισομορφών του FGF-2 με υψηλή μοριακή μάζα στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων σε μύες με καρκίνο του προστάτη [120]. Παρόλα αυτά, περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να διαλευκανθεί ο μηχανισμός με τον οποίο ρυθμίζεται η έκφραση του FGF-2 στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν τα ανδρογόνα, αφού ευνουχισμός επίμυων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση έκφρασης του FGF-2, ενώ 16 ώρες μετά τη χορήγηση ανδρογόνων παρατηρείται αναστροφή του φαινομένου. Στην ανδρογόνο-εξαρτώμενη κυτταρική σειρά LNCaP, τα ανδρογόνα επάγουν την

έκφραση του FGF-2 [121], ενώ σε άλλες ανδρογόνο-ανεξάρτητες κυτταρικές σειρές του προστάτη, η σύνθεση FGF-2 είναι ανεξάρτητη από τα ανδρογόνα [122].

Όσον αφορά τον αυξητικό παράγοντα HGF, η έκφρασή του περιορίζεται κυρίως σε κύτταρα της μεσεγχυματικής ζώνης, και είναι άφθονος στο μικροπεριβάλλον του μεταστατικό καρκίνο του προστάτη στα οστά. Η δέσμευση του HGF με τον υποδοχέα c-Met οδηγεί στην ενεργοποίηση πολλών οδών σηματοδότησης, ιδιαίτερα εκείνων που σχετίζονται με την εισβολή και τις ιδιότητες της μετάβαση των επιθηλιακών κυττάρων στα μεσεγχυματικά κύτταρα [115],[123].

Η απορύθμιση του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGF) και του υποδοχέα του c-Met, επάγει την ενεργοποίηση πρωτεϊνών όπως GRB2, την υπομονάδα p85 του PI3K, PLCγ, Stat3 και GAB1 οι οποίες με τη σειρά τους εμπλέκονται στην ενεργοποίηση πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την επιθετικότητα μέσω της οδού Ras/Raf/MEK/Erk1/2, τον πολλαπλασιασμό και το μετασχηματισμό μέσω της οδού Stat3, την αγγειογένεση, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση μέσω της οδού PI3K/Akt/IKK/NF-kB και τον πολλαπλασιασμό και τη σύνθεσης αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών μέσω της οδού PI3K/Akt-Gsk3β-p53-mTor (Εικόνα 14) [124].



**Εικόνα 14: Οι συνέπειες απορύθμισης της λειτουργίας του άξονα HGF/Met.** Ο HGF(πράσινοι κύκλοι) προσδένεται στον υποδοχέα Met προκαλώντας το διμερισμό του. Στη συνέχεια ενεργοποιείται η Met κινάση η οποία πυροδοτεί τη δράση πρωτεϊνών όπως Grb2, PI3K p85, PLCγ, Stat3, και Gab1 οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μεταναστευση και την επιθετικότητα μέσω Ras/Raf/MEK/Erk1/2, τον πολλαπλασιασμό και το μετασχηματισμό μέσω Stat3, την αγγειογενεση, τον πολλαπλασιασμό και την επιθετικότητα μέσω PI3K/Akt/IKK/NF-κB, και τον πολλαπλασιασμό και τη σύνθεση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών μέσω PI3K/Akt-Gsk3β-p53-mTor. Η λιγάση c-Cbl της U3 ουβικουιτίνης ενεργοποιείται επίσης και είναι υπεύθυνη για την ουβικουιτλώση του υποδοχέα Met και την αποδόμησή του από το πρωτεάσωμα.

Η έκφραση του υποδοχέα c-Met αυξάνει σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης του καρκίνου του προστάτη, καθώς επίσης και στη μετάσταση [125]. Επιπλέον, πολύ πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του προστάτη εκφράζουν τον υποδοχέα c-Met και τα επίπεδά του συνδέονται με την εξέλιξη των οστικών μεταστάσεων. Επιπλέον, σε κυτταρικές σειρές που εκφράζουν PSA, το επίπεδο του c-Met ήταν αντιστρόφως ανάλογο με την παραγωγή PSA [111]. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να σημαίνει ότι τα επίπεδα c-Met θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως μια πρόιμη ένδειξη της υποτροπής της νόσου σε περίπτωση απουσίας της αύξησης του PSA. Σε ασθενείς με εντοπισμένο καρκίνο του προστάτη που υποβάλλονται σε ριζική προστατεκτομή, ποσοστό 40% των όγκων χαρακτηρίζονται από την

θετική έκφραση του c-Met [126]. Σε αυτή την ομάδα, η έκφραση του c-Met συσχετίστηκε άμεσα με το Gleason σκορ [127]. Με ανοσοϊστοχημική εξέταση, η υπερέκφραση του c-Met τεκμηριώθηκε στο 54% των παθήσεων των λεμφαδένων και στο 83% των οστικών μεταστάσεων. Επιπλέον, σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ριζική προστατεκτομή, τα προεγχειρητικά επίπεδα του HGF στον ορό αποτελούν ισχυρό προγνωστικό της μετάστασης του καρκίνου του προστάτη στους λεμφαδένες και την υποτροπή της νόσου [128],[129]. Σε συμφωνία με αυτό το εύρημα, τα επίπεδα του HGF στον ορό και του HGF στα ούρα είναι σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με μεταστατική νόσο σε σύγκριση με τους ασθενείς με εντοπισμένη νόσο που [112]. Έτσι, ουρική απέκκριση του c-Met θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως μια πρόωμη ένδειξη υποτροπής της νόσου απουσία αύξησης του PSA.

Ωστόσο, αν και οι αυξητικοί παράγοντες FGF-2 και HGF δείχνουν να έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του PCa, όπως και η ET-1, δεν έχει μελετηθεί η επίδρασή τους στην ενδοκυττάρια στεροειδογένεση των καρκινικών προστατικών κυττάρων όπως επίσης και η αλληλεπίδρασή τους με νέα θεραπευτικά μόρια του PCa όπως οι αναστολείς στεροειδογένεσης.

## **1.5 ΕΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ ΣΤΟΧΕΥΟΝΤΑΣ ΤΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ**

### **1.5.1 Αμπιρατερόνη**

Το οξικό άλας της αμπιρατερόνης (CB 7630; 3\_-acetoxy-17-(3-pyridyl)androsta-5,16-diene, Abiraterone Acetate, AA) σχεδιάστηκε και δημιουργήθηκε για πρώτη φορά στο Ινστιτούτο καρκινικών ερευνών του Sutton στη Μεγάλη Βρετανία [130], ως ένας αναστολέας σύνθεσης ανδρογόνων και οιστρογόνων. Το οξικό άλας της αμπιρατερόνης είναι μία πρόδρομη μορφή της αμπιρατερόνης που έχει μεγαλύτερη διαλυτότητα και μετατρέπεται γρήγορα σε αμπιρατερόνη κατά την απορρόφηση μέσα στον οργανισμό. Η αμπιρατερόνη είναι ένας εκλεκτικός μη αντιστρεπτός αναστολέας του ενζύμου CYP 17, 17<sup>α</sup>-υδροξυλάσης ή C17,20 λυάσης, ο οποίος αναστέλλει την παραγωγή ανδρογόνων τόσο στα επινεφρίδια όσο και μέσα στον όγκο. Πιο



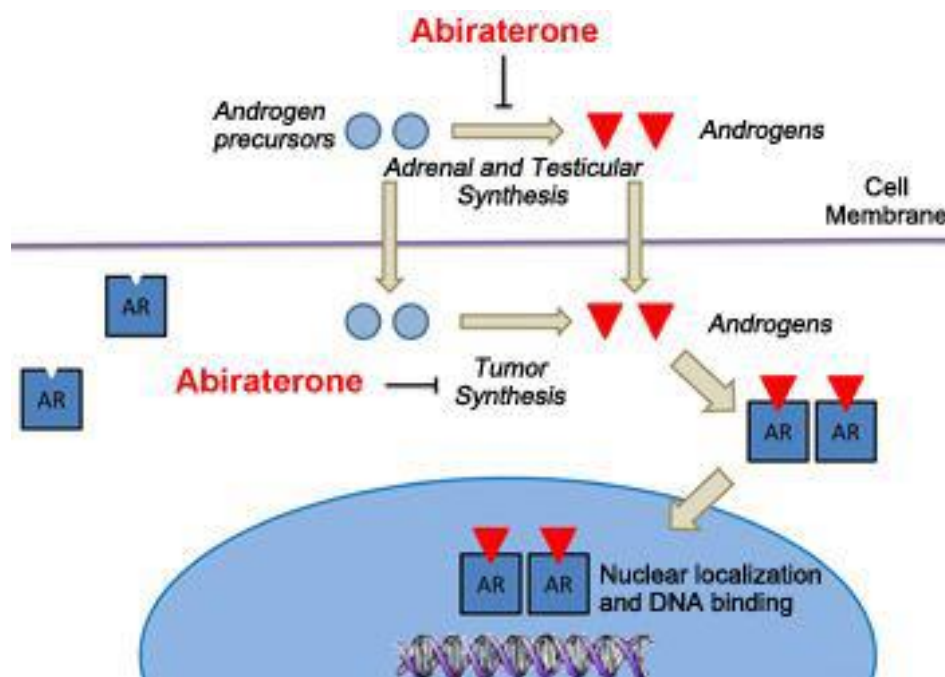
συγκεκριμένα, η αμπιρατερόνη αναστέλλει εκλεκτικά το ένζυμο 17α-υδροξυλάση/C17,20-λυάση (CYP17). Το συγκεκριμένο ένζυμο εκφράζεται και είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση των ανδρογόνων στους όρχεις, τα επινεφρίδια και τον καρκινικό ιστό του προστάτη. Το CYP17 καταλύει τη μετατροπή της πρεγνενολόνης και της προγεστερόνης στις πρόδρομες ορμόνες της τεστοστερόνης, διυδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και ανδροστενδιόνη (AED), αντίστοιχα, μέσω της 17α-υδροξυλίωσης και της διάσπασης του δεσμού C17,20. Η αναστολή του CYP17 οδηγεί, επίσης, σε αυξημένη παραγωγή αλατοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια.

Προκλινικές μελέτες σε υγιή ποντίκια έδειξαν ότι η θεραπεία με αμπιρατερόνη σε ανεκτές δόσεις μείωσε την τεστοστερόνη του ορού σε επίπεδα ευνουχισμού χωρίς να επηρεάζει τη συγκέντρωση της υδροκορτιζόνης [130]. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η αμπιρατερόνη μείωσε τον όγκο των ανδρογόνο-εξαρτώμενων οργάνων στατιστικά σημαντικά σε σχέση με την κετοκοναζόλη.

Η πρώτη φάσης I μελέτη έδειξε ότι η θεραπεία με αμπιρατερόνη οδήγησε σε αποδεκτά επίπεδα ασφάλειας και ανοχής αλλά ο παράγοντας χορηγήθηκε μόνο για 12 ημέρες [131]. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι είναι πιθανή η καταστολή των επιπέδων τεστοστερόνης σε επίπεδο ευνουχισμού με μία δόση αμπιρατερόνης 800mg. Η επίδραση του φαρμάκου στον όγκο δεν αξιολογήθηκε αλλά η μελέτη απέδειξε ότι το φάρμακο μπορεί να μπλοκάρει το ένζυμο CYP17 ανοίγοντας το δρόμο για μία επόμενη μελέτη σε ασθενείς με CRPC. Μία μελέτη φάσης I/II (COU-AA-001) σχεδιάστηκε σε ασθενείς με CRPC που ανταποκρίνονταν στη θεραπεία, για να αξιολογήσει την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της διαρκούς ημερήσιας χορήγησης αμπιρατερόνης σε μορφή χαπιού. Η δόση αυξήθηκε από 250 mg/ημέρα σε 2000 mg/ημέρα [132]. Η αμπιρατερόνη είχε ένα αποδεκτό προφίλ ασφάλειας και δραστηριότητας κατά του όγκου σε όλα τα επίπεδα δόσεων που αξιολογήθηκαν. Οι πιο συχνές παρενέργειες σχετίζονταν με αυξημένα επίπεδα αλατοκορτικοειδών, με υπέρταση, υποκαλιαιμία και οίδημα κάτω άκρων. Οι παρενέργειες αντιμετωπίζονταν με έναν ανταγωνιστή του υποδοχέα αλατοκορτικοειδών, την επλερερόνη [133]. Η θεραπεία με αμπιρατερόνη πυροδότησε αυξήσεις στην ACTH και των στεροειδών που βρίσκονται πριν το ένζυμο CYP17 στο μονοπάτι της στεροειδογένεσης ενώ μείωσε τα επίπεδα τεστοστερόνης, ανδρογόνων και οιστραδιόλης στον ορό των ασθενών. Κανένας ασθενής δεν ανέπτυξε ανεπάρκεια κορτικοστεροειδών όπως ήταν αναμενόμενο από τις συγγενείς ανωμαλίες έλλειψης του ενζύμου CYP17. Η δραστηριότητα κατά του όγκου παρατηρήθηκε σε όλες τις δόσεις που χορηγήθηκαν και εκδηλώθηκε με μειώσεις στα επίπεδα PSA, μερική απάντηση απεικονιστικά

και καλύτερευση των συμπτωμάτων. Σε αυτή τη μελέτη, το 66% των ασθενών παρουσίασαν μία μείωση 30% στο PSA και το 38% είχε μερική απάντηση στη θεραπεία σύμφωνα με τα κριτήρια RECIST ή μείωση της αναλγητικής θεραπείας. Συμπερασματικά, αυτή η πρώτη φάσης I μελέτη σε ασθενείς με CRPC ευαίσθητους στη χημειοθεραπεία επιβεβαίωσε ότι η αναστολή του CYP17 από την αμπιρατερόνη έχει ένα αποδεκτό προφίλ ασφάλειας και δραστηριότητας κατά του όγκου σε ασθενείς με CRPC. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς που έλαβαν μέρος σε αυτή τη μελέτη, συνέχισαν τη θεραπεία με αμπιρατερόνη έως και 48 μήνες μέσου ενός άλλου διαδοχικού πρωτοκόλλου.

Μία δεύτερη φάσης I/II μελέτη (COU-AA-002) εκτίμησε την ασφάλεια και την ανοχή της αμπιρατερόνης σε μορφή χαπιού σε δόσεις 250-1000 mg, και κατέληξε επίσης σε ένα αποδεκτό προφίλ ασφάλειας για παραιτέρω μελέτη. Δεδομένα από τις μελέτες εκτίμησης της βέλτιστης δόσης του φαρμάκου έδειξαν ότι η δόση των 1000mg ημερησίως έδειξε μία σταθερή δράση του φαρμάκου χωρίς σημαντικές παρενέργειες. Συνεπώς αυτή η δόση επιλέχθηκε για τις επόμενες μελέτες ασφάλειας και αποτελεσματικότητας φάσης II και III.



**Εικόνα 15: Η αναστολή σύνθεσης ανδρογόνων από την αμπιρατερόνη στα καρκινικά προστατικά κύτταρα.** Τα ανδρογόνα και οι πρόδρομες μορφές τους εισέρχονται στο καρκινικό προστατικό κύτταρο όπου εκεί και οι πρόδρομες μορφές μετατρέπονται σε ανδρογόνα. Αυτά τα νεο-συντιθέμενα ανδρογόνα αλλά και αυτά που δημιουργήθηκαν στα επινεφρίδια και τους όρχεις, προσδένονται στον ανδρογονικό υποδοχέα, μετακινούνται στον πυρήνα όπου με τη σύνδεσή τους στο DNA ενεργοποιούν την έκφραση γονιδίων όπου σχετίζονται με την ανάπτυξη των κυττάρων του καρκίνου του προστάτη. Η αμπιρατερόνη αναστέλλει τη σύνθεση των ανδρογόνων και στις τρεις φάσεις. [133]

Η μελέτη COU-AA-001 έδειξε μειώσεις στα επίπεδα PSA σε ασθενείς ευαίσθητους στη δοσεταξέλη 60-80%. Η μελέτη αυτή επεκτάθηκε εντάσσοντας και άλλους ασθενείς στο σκέλος της δόσης 1000mg για παραιτέρω εκτίμηση της δραστηριότητας του φαρμάκου κατά του όγκου [133]. Οι μειώσεις στα επίπεδα κυκλοφορούντων CTCs, η αποκατάσταση των επιπέδων γαλακτικής αφυδρογονάσης σε φυσιολογικά επίπεδα και η καλύτερη συμπτωμάτων με μείωση της χρήσης αναλγητικών ήταν από τις συχνές επιπτώσεις του φαρμάκου στους ασθενείς. Παρόμοιες απαντήσεις καταγράφηκαν στη μελέτη COU-AA-002, μία παράλληλη μελέτη φάσης I/II που μελετούσε την αποτελεσματικότητα του χαπιού σε αντιδιαστολή με την κάψουλα [134].

Δύο μελέτες φάσης II διεξήχθησαν επίσης σε ασθενείς με CRPC που είχαν δεχτεί θεραπεία με δοσεταξέλη. Στη μία μελέτη φάσης II (COU-AA-003), 47 ασθενείς πήραν αμπιρατερόνη με δόση 1000mg/ημέρα ενώ οι 18 δέχονταν παράλληλα θεραπεία με στεροειδή για να διατηρήσουν την ποιότητα ζωής τους. Σε αυτό τον πληθυσμό πάνω από τους μισούς ασθενείς είχαν μείωση του PSA και πάνω από τα δύο τρίτα εμφάνισαν σταθερότητα στη νόσο ή μερική απάντηση στη θεραπεία. Η άλλη φάσης II μελέτη (COU-AA-004) που διεξήχθη, αξιολόγησε το συνδυασμό αμπιρατερόνης (1000mg/ημέρα) και πρεδνιζόνης (5mg δις ημερησίως) σε 58 ασθενείς με μεταστατικό CRPC που δεν είχαν απαντήσει στη θεραπεία με δοσεταξέλη, 27 από τους οποίους είχαν δεχτεί και προηγούμενη θεραπεία με κετοκοναζόλη. Μειώσεις στο PSA, μερική απάντηση στον όγκο και βελτίωση της ποιότητας ζωής παρατηρήθηκαν στους ασθενείς. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιορίστηκαν σε βαθμού 1-2 με πιο συχνές την κόπωση, τη ναυτία και τον έμετο. Σε μία μόνο περίπτωση η κόπωση ήταν βαθμού 3, ενώ δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες βαθμού 4.

Σε μια κλινική μελέτη φάσης 3 σε ασθενείς με αποτυχία στην προηγούμενη χημειοθεραπεία με ταξάνες, το 38% των ασθενών που έλαβαν οξική αμπιρατερόνη, έναντι του 10% των ασθενών που έλαβαν εικονικό φάρμακο, είχαν τουλάχιστον 50% μείωση στα επίπεδα του PSA σε σχέση με την έναρξη της μελέτης. Η αποτελεσματικότητα τεκμηριώθηκε με δύο τυχαιοποιημένες, ελεγχόμενες με εικονικό φάρμακο, πολυκεντρικές μελέτες φάσης 3 (μελέτες 301 και 302) σε ασθενείς με μεταστατικό ανθεκτικό στον ευνοχισμό καρκίνο του προστάτη. Στη μελέτη 302 εντάχθηκαν ασθενείς που δεν είχαν λάβει προηγουμένως δοσεταξέλη, ενώ στη μελέτη 301 εντάχθηκαν ασθενείς που είχαν λάβει προηγουμένως δοσεταξέλη. Οι ασθενείς λάμβαναν ένα ανάλογο της LHRH ή είχαν υποβληθεί προηγουμένως σε ορχεκτομή. Στο σκέλος θεραπείας με δραστική ουσία, η οξική αμπιρατερόνη χορηγήθηκε σε δόση του 1.000 mg ημερησίως σε

συνδυασμό με χαμηλή δόση πρεδνιζόνης ή πρεδνιζολόνης 5 mg δις ημερησίως. Οι ασθενείς της ομάδας ελέγχου έλαβαν εικονικό φάρμακο και χαμηλή δόση πρεδνιζόνης ή πρεδνιζολόνης 5 mg δύο φορές την ημέρα. Η φάσης III μελέτη COU-AA-301 έδειξε ένα όφελος επιβίωσης 3,9 μηνών στους ασθενείς που βρίσκονταν στο σκέλος αμπιρατερόνης/πρεδνιζόνης σε σχέση με αυτούς που βρίσκονταν στο σκέλος placebo/πρεδνιζόνης μετά τη θεραπεία με δοσεταξέλη [135]. Η επόμενη μελέτη COU-AA-302 σε ασθενείς πριν τη θεραπεία με δοσεταξέλη έδειξε όφελος στο διάστημα επιβίωσης χωρίς απεικονιστική εξέλιξη της νόσου καθώς και επιμήκυνση στο χρόνο έναρξης χημειοθεραπείας [136].

Το αποτέλεσμα αυτών των μελετών ήταν ο Παγκόσμιος Οργανισμός Φαρμάκων να εγκρίνει το 2011 το συνδυασμό αμπιρατερόνης-πρεδνιζόνης για τη θεραπεία του CRPC σε ασθενείς που είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία με δοσεταξέλη, ενώ το 2012 πήρε ένδειξη και για τη θεραπεία του CRPC σε ασθενείς που δεν είχαν λάβει προηγούμενη χημειοθεραπεία.

Ωστόσο παρόλη την αποτελεσματικότητά της στην αναστολή του μονοπατιού της στεροειδογένεσης, η δράση της αμπιρατερόνης δεν είναι ολοκληρωμένη. Ο Attard και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι οι ασθενείς που είχαν δεχτεί θεραπεία με αμπιρατερόνη παρόλο που οι περισσότεροι μεταβολίτες των ανδρογόνων στα ούρα αλλά και τα επίπεδα ανδρογόνων στο ορό είχαν μειωθεί, η αναστολή του ενζύμου CYP17 οδήγησε σε υψηλότερα επίπεδα του μεταβολίτη 3α5α-17HP που σχετίζεται με υψηλότερη παραγωγή ανδροστερόνης άρα και DHT [132]. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η χρήση αμπιρατερόνης μπορεί να οδηγεί τη 17-OH προγεστερόνη προς το μονοπάτι της «5-α διονης». Επίσης όπως είναι αναμενόμενο η υπερέκφραση των μεταλλάξεων του γονιδίου CYP17A1 μπορεί επίσης να συνεισφέρει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην αμπιρατερόνη. Ο Chang και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η μετάλλαξη στο γονίδιο HSD3B1 (1245C), η οποία έχει ήδη συσχετιστεί με την ανάπτυξη του CRPC έχει επίσης βρεθεί σε xenograft μοντέλα ανθεκτικά στην αμπιρατερόνη [44]. Ο Mostaghel και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι οι κυτταρικές σειρές οι οποίες έχουν καλλιεργηθεί με αμπιρατερόνη εμφάνισαν αυξημένη έκφραση του CYP17A1 όπως και των άλλων ενζύμων της στεροειδογένεσης AKR1C3 και HSD17B3 [22]. Αυτή τη στιγμή βρίσκονται σε ανάπτυξη και άλλοι αναστολείς της στεροειδογένεσης όπως το TAK-700 (Orteronel) και το VT464 (Viamet), οι οποίοι παρουσιάζουν μεγαλύτερη ειδικότητα στην αναστολή της 17,20 λυάσης.

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

### 2.1 ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

Η αμπιρατερόνη με εμπορική ονομασία Zytiga, είναι ένας νέος αναστολέας του κυτοχρώματος P450 (CYP) 17A ο οποίος σε συνδυασμό με την πρεδνιζόνη πήρε έγκριση από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) το 2011 για τη θεραπεία του εννουχο-άντοχου καρκίνου του προστάτη σε ασθενείς που είχαν ήδη λάβει θεραπεία με δοσεταξέλη [128]. Το μόριο έχει ήδη μελετηθεί σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη αρχικών σταδίων και σε γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Τον Δεκέμβριο του 2012, η αμπιρατερόνη πήρε ένδειξη και για χρήση σε ασθενείς με εννουχο-άντοχο καρκίνο του προστάτη που δεν είχαν λάβει προηγούμενη χημειοθεραπεία. Παρόλη όμως την επιτυχία του συγκεκριμένου φαρμάκου, η ανθεκτικότητα στη θεραπεία παραμένει ένα κλινικά σημαντικό πρόβλημα.

Τα νευροπεπίδια και οι αυξητικοί παράγοντες ήδη θεωρείται ότι σχετίζονται με την ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνου και αποτελούν στόχοι θεραπειών. Οι ενδοθηλίνες (ενδοθηλίνη-1, ενδοθηλίνη-2, ενδοθηλίνη-3) και οι υποδοχείς τους, ρυθμίζουν μία ποικιλία παραγόντων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την πρόοδο του καρκίνου, όπως η απόπτωση, η μετάσταση, η αγγειογένεση, η διήθηση και η ανθεκτικότητα στη θεραπεία [137]. Μελέτη η οποία έχει πραγματοποιηθεί σε 79 ασθενείς με ορμονο-άντοχο μεταστατικό καρκίνο του προστάτη έδειξε ότι αυτός ο πληθυσμός των ασθενών παρουσιάζει σημαντικά αυξημένα επίπεδα ET-1 στο πλάσμα σε σύγκριση με τον υγιή πληθυσμό. Η παράλληλη ανίχνευση του ET-1 mRNA στα καρκινικά προστατικά κύτταρα επιβεβαίωσε ότι η ET-1 αποτελεί προϊόν των καρκινικών προστατικών κυττάρων [72].

Ο επιθηλιακός ιστός του όγκου και το μικροπεριβάλλον του αποτελούν τους πιο σημαντικούς στόχους των κλινικών μελετών και παρουσιάζουν θετικά αποτελέσματα στην επιμήκυνση της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του προστάτη. Ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών τύπου 2 (FGF-2) και ο αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων (HGF) είναι παράγοντες που συνδέονται στενά με την έναρξη και την πρόοδο του καρκίνου του προστάτη [122]. Μελέτες έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα FGF-2 έως και 2,5 φορές στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό του προστάτη [118]. Επιπρόσθετα μελέτες έδειξαν ότι η σηματοδότηση του αυξητικού παράγοντα HGF και του υποδοχέα του c-MET ενεργοποιείται στα

καρκινικά κύτταρα και συνδέεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική διήθηση [138],[139].

Η θεραπεία στέρησης ανδρογόνων αποτελεί την πλέον ενδεδειγμένη θεραπεία για την αρχική αντιμετώπιση του προχωρημένου ή μεταστατικού καρκίνου του προστάτη αλλά η πρόοδος στον ευνουχο-άντοχο τύπο CRPC συμβαίνει 2-3 χρόνια μετά την έναρξη θεραπείας στέρησης ανδρογόνων. Οι εγκεκριμένες θεραπείες βασίζονται στην κατανόηση των μηχανισμών του CRPC. Σύμφωνα με τα ως τώρα γνωστά δεδομένα η πλειοψηφία των μηχανισμών αντίστασης στη θεραπεία που έχουν ταυτοποιηθεί ρυθμίζονται από τον ανδρογονικό υποδοχέα (AR) ή εμπλέκονται στον άξονα δράσης του. Συνεπώς, η ενδοκυττάρια παραγωγή στεροειδών ορμονών που πυροδοτείται από τον ανδρογονικό υποδοχέα αποτελεί σημείο κλειδί για την πρόοδο του καρκίνου του προστάτη. Μελέτη έχει δείξει ότι παρουσία ET-1, τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης του ανδρογονικού υποδοχέα αυξάνονται σημαντικά καθώς και ότι αυτή η έκφραση του AR που εξαρτάται από την ET-1 μπορεί να κατασταλλεί από αναστολείς κινασών Src και PI3K. Κατ'έκταση η ET-1 μπορεί να αυξήσει την έκφραση του ανδρογονικού υποδοχέα μέσω του μονοπατιού Src/PI3K/c-myc στα καρκινικά προστατικά κύτταρα [140].

Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα που να αφορούν τη δράση της οδού της ET-1, FGF-2 και HGF και πιθανές αλληλεπιδράσεις με την ενδοκυττάρια στεροειδογένεση στον καρκίνο του προστάτη. Με δεδομένο ότι η ανθεκτικότητα στην αμπιρατερόνη, που αποτελεί ένα σύγχρονο φάρμακο για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, αποτελεί ένα κλινικά σημαντικό πρόβλημα, η μελέτη των παραγόντων και των μηχανισμών σε κυτταρικό επίπεδο που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των θεραπειών αποτελεί προϋπόθεση για τη βελτίωση της θεραπευτικής αντιμετώπισης και της ποιότητας ζωής των ασθενών με καρκίνο του προστάτη.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής πρότασης είναι να μελετηθεί για πρώτη φορά η επίδραση των ET-1, FGF-2 και HGF στην ενδοκυττάρια στεροειδογένεση και της αλληλεπίδρασης με το AR μονοπάτι ως ένα πιθανό μηχανισμό ανθεκτικότητας στην αμπιρατερόνη. Τα αποτελέσματα της μελέτης έχουν σα στόχο να αναδείξουν άγνωστα μέχρι στιγμής μονοπάτια και μια σταθερή γνώση για την καλύτερη αντιμετώπιση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη.

Για τις *in vitro* μελέτες επιλέχθηκαν 2 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη οι οποίες εκπροσωπούν τα δύο στάδια ανάπτυξης του καρκίνου του προστάτη, το αρχικό ορμονο-εξαρτώμενο στάδιο (LNCaP) και το τελικό ορμονο-ανεξάρτητο στάδιο (PC3).

Οι επιμέρους στόχοι της έρευνας ήταν:

- ✓ Η μελέτη της δράσης των νευροπεπτιδίων και των αυξητικών παραγόντων στις ορμόνες της στεροειδογένεσης 17-OH προγεστερόνη και διυδροτεστοστερόνη
- ✓ Η μελέτη της δράσης της αμπιρατερόνης στο μονοπάτι της στεροειδογένεσης και του πολλαπλασιασμού των προστατικών κυττάρων
- ✓ Η μελέτη των μηχανισμών δράσης των ενεργοποιητών και του συνδυασμού τους με την αμπιρατερόνη

### 3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 ΥΛΙΚΑ

##### 3.1.1 Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές:

- PC3, κύτταρα ανθρώπινου ορμονο-ανεξάρτητου καρκίνου του προστάτη
- LnCaP, κύτταρα ανθρώπινου ορμονο-εξαρτώμενου καρκίνου του προστάτη
- VCaP, κύτταρα ανθρώπινου ορμονο-εξαρτώμενου καρκίνου του προστάτη

Οι διαφορές των δύο ανθρώπινων κυτταροσειρών ορμονο-εξαρτώμενου καρκίνου του προστάτη συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα 1.

**Πίνακας 1:** Σύγκριση των χαρακτηριστικών των δύο κυτταροσειρών ορμονο-εξαρτώμενου καρκίνου του προστάτη που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

	<b>LNCaP</b>	<b>VCaP</b>
<b>Είδος-Ιστός</b>	Μετάσταση καρκίνου του προστάτη/Ανδρογονο-εξαρτώμενος τύπος	Μετάσταση καρκίνου του προστάτη/Ανδρογονο-εξαρτώμενος τύπος
<b>Μορφολογία-Τύπος ανάπτυξης</b>	Επιθηλιακά - Προσκολλημένα	Επιθηλιακά - Προσκολλημένα
<b>Υποδοχείς</b>	AR(T877A μετάλλαξη), ER	AR (άγριος τύπος)
<b>NEP δραστικότητα</b>	Υψηλή	Χαμηλή
<b>Προϊόντα</b>	PSA	PSA



### 3.1.2 Χημικές ενώσεις – Αντιδραστήρια

- Η αμπιρατερόνη ήταν μία προσφορά της εταιρείας Janssen-Cilag (Belgium)
- Η προμήθεια της ενδοθηλίνης-1 έγινε από την εταιρεία Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (Germany)
- Η προμήθεια του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών -2 (FGF-2) και του αυξητικού παράγοντα ηπατοκυττάρων (HGF) έγινε από την εταιρεία Biorbyt (UK).
- Η προμήθεια των αναστολέων LY294002 (PI3K Inhibitor) και U0126 (MEK 1/MEK 2 Inhibitor) έγινε από την εταιρεία Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
- Η προμήθεια των χημικών αντιδραστηρίων αναλυτικής καθαρότητας έγινε από τις εταιρίες Sigma (St. Louis, USA) και Applichem GmbH (Germany).

### 3.1.3 Αντισώματα

- Μονοκλωνικό αντί-ακτίνη αντίσωμα από ορό ποντικού της εταιρίας Cell Signaling Technology σε αραίωση 1:5000.
- Μονοκλωνικό αντί-α/β tubulin αντίσωμα από ορό ποντικού της εταιρίας Cell Signaling Technology σε αραίωση 1:10000.
- Πολυκλωνικά αντί-phospho-Akt (Ser473) και ολική Akt αντισώματα από ορό κουνελιού της εταιρίας Cell Signaling Technology σε αραίωση 1:1000.
- Πολυκλωνικά αντί-phospho-p70 S6 kinase (Thr389) και αντί-phospho-S6 ribosomal protein (Ser235/236) αντισώματα από ορό κουνελιού της εταιρίας Cell Signaling Technology σε αραίωση 1:1000.
- Πολυκλωνικά αντί-ανδρογονικού υποδοχέα (AR) αντισώματα έναντι του αμινοτελικού ή του καρβοξυτελικού άκρου από ορό κουνελιού της εταιρίας Santa-Cruz Biotechnology.
- Συζευγμένα με υπεροξειδάση (για ανοσοαποτύπωση) (Santa Cruz), με Cy3 ή με FITC (για ανοσοφθορισμό) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) αντισώματα έναντι της IgG από κουνέλι, ποντικό ή κατσίκα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερα αντισώματα

## 3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.2.1 Κυτταρικές σειρές – Καλλιέργεια κυττάρων

Οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές PC3, LNCaP και VCaP αγοράστηκαν από την Ευρωπαϊκή Συλλογή κυτταρικών καλλιιεργειών ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury UK). Όλα τα πειράματα έγιναν εντός 6 μηνών από την απόκτηση της κάθε κυτταροσειράς. Οι κυτταρικές σειρές PC3 και LNCaP καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Euroclone, UK) εμπλουτισμένο με 10% βόειο εμβρυικό ορό (FBS) (GIBCO,UK) , L-γλουταμίνη (GIBCO,UK) και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (Euroclone, UK). Η κυτταρική σειρά VCaP καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM/HAM'S F12 1:1 (GIBCO, UK) εμπλουτισμένο με 10% βόειο εμβρυικό ορό (FBS) (GIBCO,UK) και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (Euroclone, UK). Όλες οι κυτταρικές σειρές επώαστηκαν στους 37°C σε 5% CO<sub>2</sub> σε ειδικό κυτταρικό επωαστήρα (Thermo Electron, UK). Για τα πειράματα που περιγράφονται χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που βρίσκονταν σε πυκνότητα 70-80% σε φλάσκες καλλιέργειας 25ml. Κύτταρα καλλιεργούμενα χωρίς προσθήκη άλλων αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Καθ'όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας τους τα κύτταρα ελέγχονταν για μικροβιακές επιμολύνσεις με έλεγχο σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Axiovert 40CFL, Carl Zeiss, Germany) και με χρήση ειδικής διαγνωστικής μεθόδου για μυκόπλασμα.

### 3.2.2 Ψύξη κυττάρων και επανέναρξη καλλιιεργειών

Για το πάγωμα των κυττάρων από μια καλλιέργεια ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: κύτταρα τα οποία ήταν προσκολλημένα σε φλάσκα 25ml ξεπλύθηκαν με κρύο PBS. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml 0.05% τρυψίνης και η φλάσκα επώαστηκε για 5 λεπτά στους 37°C για να αποκολληθούν τα κύτταρα. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε 10 ml καλλιεργητικού θρεπτικού υλικού και ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 800xg για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκείμενου. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε 10ml PBS και ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 800xg για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκείμενου προσεκτικά ώστε να αφαιρεθούν όλα τα υπολείμματα του PBS. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε

1ml θρεπτικού υλικού ψύξης που περιείχε 10% DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο), 60% RPMI ή DMEM/HAM'S F12 1:1 και 30% FBS. και ακολούθησε μεταφορά σε ειδικούς μικροσωλήνες (cryotubes, Gibco) και σταδιακή ψύξη τους (-1 °C/min) στους -80°C.

Η επανέναρξη καλλιιεργειών από τα αποθηκευμένα κύτταρα έγινε ως εξής: Τα παγωμένα κύτταρα ξεπάγωσαν γρήγορα με θέρμανση τους στους 37°C και στη συνέχεια προστέθηκαν στα κύτταρα στάγδην (για την αποφυγή πρόκλησης ωσμωτικού σοκ) 10 ml θρεπτικού υλικού RPMI ή DMEM/HAM'S F12 1:1 που περιείχε 10% FBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 200xg για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 5 ml θρεπτικού υλικού και μεταφέρθηκε σε φλάσκα για περαιτέρω επώαση στους 37°C σε 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2.3 Συνθήκες επώασης κυττάρων κατά τις πειραματικές διαδικασίες

Όπως ήδη αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.2.1 για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που βρίσκονταν σε πυκνότητα 70-80% σε φλάσκες καλλιέργειας 25ml. Τα κύτταρα όταν έφταναν στη συγκεκριμένη πυκνότητα τοποθετούνταν σε θρεπτικό υλικό το οποίο στερούνταν ορού (serum free) για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών ακολουθούσε η προσθήκη ουσιών. Πιο συγκεκριμένα και ανάλογα με την πειραματική συνθήκη τοποθετούνταν:

- 1) ET-1 σε συγκεντρώσεις 1nM, 10nM ή 100nM για 24 ώρες
- 2) Αμπιρατερόνη σε συγκεντρώσεις 10nM, 100nM, 1μM ή 10μM για 24 ώρες
- 3) FGF-2 σε συγκέντρωση 10ng/ml για 24 ώρες
- 4) HGF σε συγκέντρωση 33,3 ng/ml για 24 ώρες

Κατά τα πειράματα συγχρορηγήσεων με αμπιρατερόνη, η αμπιρατερόνη ήταν αυτή που τοποθετούνταν αρχικά στη φλάσκα και στη συνέχεια ο κάθε ενεργοποιητής.

Κατά τα πειράματα χρήσης αναστολέων, τα κύτταρα προεπαζόνταν με τον αναστολέα μια 1 ώρα πριν την προσθήκη κάθε ενεργοποιητή. Πιο συγκεκριμένα τα κύτταρα προεπαζόνταν με:

- 1) LY294002 σε συγκέντρωση 50μM για 1 ώρα και στη συνέχεια προσθήκη ET-1 100nM για 23 ώρες

- 2) U0126 σε συγκέντρωση 10 $\mu$ M για 1 ώρα και στη συνέχεια προσθήκη ET-1 100nM για 23 ώρες
- 3) XL184 σε συγκέντρωση 500nM για 1 ώρα και στη συνέχεια προσθήκη αμπιρατερόνης 10nM και κατόπιν της ET-1 100nM για 23 ώρες

### **3.2.4 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα**

Για την παρασκευή εκχυλίσματος ολικής πρωτεΐνης έγινε συλλογή κυττάρων σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Πριν από κάθε κυτταρική λύση γινόταν μέτρηση κυττάρων με χρήση αιματοκυτταρόμετρου (Neubauer haemocytometer, Fisher, UK). Αρχικά τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με κρύο PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από τη φλάσκα με θρυψίνη και ξεπλύθηκαν σε διάλυμα PBS. Για χρήση προσδιορισμού ανοσοπροσρόφησης προγεστερόνης, 17-OH προγεστερόνης και διυδροτεστοστερόνης και Western Blot τα κυτταρικά ιζήματα διαλύθηκαν σε 200 $\mu$ l διαλύματος λύσης με 10mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 10% γλυκερίνη, 1% Triton X-100, 50mM EDTA και τους αναστολείς πρωτεασών λυουπεπτίνη, αποπροτινίνη και PMSF. Οι αναστολείς πρωτεασών προστίθενται πριν τη χρήση στο διάλυμα λύσης. Το λύμα μεταφέρθηκε σε σωληνάκι των 1,5 ml, επώαστηκε για 20 λεπτά στον πάγο και έπειτα φυγοκεντρήθηκε στα 12000xg για 10 λεπτά στους 4 $^{\circ}$ C. Για την ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση προστέθηκε διάλυμα φόρτωσης (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% glycerol, 0,05% Bromophenol Blue, 25 mM DTT) και ακολούθησε θέρμανση τους στους 95 $^{\circ}$ C για 10 λεπτά.

Για τον έλεγχο δραστηριότητας NEP ετοιμάστηκαν ολικά πρωτεϊνικά κυτταρολύματα με διάλυμα 0,5% CHAPS (3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio -1-propane sulfonate) που δεν επηρέασε την ενζυμική δραστηριότητα της NEP.

### **3.2.5 Προσδιορισμός ενζυματικής δραστηριότητας NEP**

Πραγματοποιήθηκε χρωματομετρικός προσδιορισμός δραστηριότητας NEP στα ολικά πρωτεϊνικά κυτταρολύματα, με χρήση του χρωμογόνου υποστρώματος Suc-Ala-Ala Phe-pNa.

Επιγραμματικά, για την μέτρηση της ενζυματικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκε το χρωμογόνο υπόστρωμα Suc-Ala-Ala-Phe-PNA. Ελαιωρήματα εκχυλίσματος κυτταρικών μεμβρανών 5μl, 15μl και 30μl που παράχθηκαν με λύση με διάλυμα CHAPS όπως περιγράφηκε παραπάνω προστέθηκαν σε ένα μείγμα με την παρακάτω σύνθεση: 200μl Tris-HCl 100mM, pH 7.6, 10μl 20mM υποστρώματος (διαλυμένο σε δι-μεθυλ-σουλφοξείδιο) και 8μl διαλύματος αμινοπεπτιδάσης M(N). Το μείγμα ετέθη σε επώαση στους 37°C για 30 λεπτά. Η αντίδραση διεκόπη με την προσθήκη διαλύματος 10% τριχλωροοξικού οξέος και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 25000rpm για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 250 μl 10% TCA και έγινε φυγοκέντρωση στα 35000rpm για 5 λεπτά. Ποσότητα 250 μl από το υπερκείμενο μεταφέρθηκαν σε νέους σωλήνες και προστέθηκαν 250 μl NaNO<sub>2</sub> και έγινε φυγοκέντρωση για 3 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 250 μl θειικού αμμωνίου και έγινε φυγοκέντρωση για 2 λεπτά. Τέλος, 500 μl NNEDA προστέθηκαν και μετρήθηκε 250 μl από το κάθε δείγμα. Οι μετρήσεις έγιναν σε τρυβλία 96 θέσεων. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 540nm χρησιμοποιώντας μετρητή πολλαπλών ενδείξεων Victor Wallac. Μείγμα χωρίς προσθήκη εκχυλισμάτων κυτταρικών μεμβρανών χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Οι τελικές τιμές υπολογίστηκαν μετά από αφαίρεση της τιμής του μάρτυρα. Όλα τα πειράματα και οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν 4 φορές. Η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου σε βασική κατάσταση (baseline) μετρήθηκε σε πικογραμμομόρια του μετατραπέντος υποστρώματος ανά μικρογραμμάριο πρωτεΐνης ανά λεπτό. Οι τιμές συγκρίθηκαν με πρότυπη καμπύλη απορρόφησης που δημιουργήθηκε για το συγκεκριμένο υπόστρωμα και με μια καμπύλη ενζυματικής δραστηριότητας rhNEP που δημιουργήθηκε για υπολογισμό  $K_m$  και  $V_{max}$ .

### 3.2.6 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (τροποποιημένη από τον Bearden) και βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης με τη χρωστική Coomassie Brilliant blue G250 σε όξινο περιβάλλον. Κατά τη συμπλοκοποίηση το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής μεταβάλλεται από τα 465 nm στα 595 nm.

Το αντιδραστήριο αποτελείται από τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (Biorad). Μετά την ανάμιξη του αντιδραστηρίου με H<sub>2</sub>O σε

αναλογία 1/4 έως τελικό όγκο 1 ml, προστίθεται το πρωτεϊνικό δείγμα και η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου μετριέται στα 595 nm. Με βάση την απορρόφηση αυτή και την αναγωγή της σε συγκέντρωση πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA), προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη.

### 3.2.7 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση

Η SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Τα βασικά υλικά της μεθόδου είναι μια ασυνεχής πηκτή πολυακρυλαμίδιου και το άλας νατρίου του θειικού δωδεκυλίου (SDS) που δρα ως αποδιατακτικό μέσο. Το SDS είναι ένα ανιονικό αντιδραστήριο που εφόσον δεσμευτεί στις πρωτεΐνες και τις αποδιατάξει, τους προσθέτει καθαρό αρνητικό φορτίο. Η πρόσδεση του SDS στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες προκαλεί ομοιόμορφη κατανομή του φορτίου ανά μονάδα μάζας, έχοντας ως αποτέλεσμα η ηλεκτροφορητική ικανότητα των πρωτεϊνών να είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού τους βάρους.

Η πηκτή διαχωρισμού (separating gel) αποτελείται από 10% ακρυλαμίδιο, 0,375 M Tris-Cl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,04% υπερθειικό αμμώνιο και 0,02% TEMED σε H<sub>2</sub>O. Η πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel) αποτελείται από 4,5% ακρυλαμίδιο, 0,125 M Tris-Cl pH 6,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,08% υπερθειικό αμμώνιο, 0,04% TEMED σε H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης αποτελείται από 50 mM Tris-Cl pH 8,3, 0,38 M glycine, 2 mM EDTA, 0,1% SDS και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 150V σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης της εταιρίας Biorad.

Όταν η ηλεκτροφόρηση τέλειωσε η πηκτή αφαιρέθηκε προσεκτικά από τη συσκευή και τοποθετήθηκε μαζί με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε ειδική θήκη για μεταφορά (transfer) των πρωτεϊνών από την πηκτή στη νιτροκυτταρίνη. Στη θήκη τοποθετήθηκαν η νιτροκυτταρίνη και η πηκτή πολυακρυλαμίδιου ανάμεσα σε διηθητικό χαρτί (όλα είχαν εμποτιστεί με διάλυμα μεταφοράς Tris-Borate pH 8,5 (125 mM Tris, 0,2% SDS, 0,5 mM DTT, ρύθμιση του pH με άλας βορικού οξέος). Αφού αφαιρέθηκαν οι τυχόν φυσαλίδες ανάμεσα από την πηκτή και τη νιτροκυτταρίνη η ειδική θήκη τοποθετήθηκε στη συσκευή ημι-ξηρής μεταφοράς (semi-dry

transfer, Biorad) ώστε να γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη με βάση υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Η μεταφορά έγινε στα 10V για 70 λεπτά.

Μετά το πέρας της μεταφοράς, αφαιρέθηκε η νιτροκυτταρίνη, ξεπλύθηκε με λίγο νερό και τοποθετήθηκε για 2 λεπτά περίπου σε διάλυμα Ponceau S (0,5% w/v Ponceau, 1% οξικό οξύ) μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα. Κατόπιν η νιτροκυτταρίνη ξεπλύθηκε με PBS-Tween 20 υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να αφαιρεθεί το Ponceau. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα κορεσμού (5% γάλα σε σκόνη, και PBS-0,1% Tween 20) για 1 ώρα για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος ώστε να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη. Ακολούθησε ξέπλυμα 3 φορές με PBS-0,1% Tween 20 (3x 5 min). Έπειτα έγινε ολονύχτια επώαση με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση σε PBS-0,1% Tween 20 με 5% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Ακολουθεί ξέπλυμα 3 φορές με PBS-0,1% Tween 20 (3x 5 min). Ακολουθώς έγινε επώαση με κατάλληλο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση και αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιείται σε κατάλληλη αραιώση, με 5% γάλα σε σκόνη και PBS- 0,1 % Tween 20 για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση και ξέπλυμα 3 φορές σε PBS-Tween 20 (3x 5 min). Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώάζεται για ένα λεπτό σε 10 ml διαλύματος λουμινόλης (1,25 mM σε 0,1 M Tris-Cl pH 8,5), στο οποίο προστέθηκαν 30 μl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και 100 μl κουμαρικού οξέος (6,8 mM σε DMSO). Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξείδιο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν τη λουμινόλη σε 3 αμινο- φθαλικό, αντίδραση η οποία εκπέμπει φως. Η λήψη εικόνων γίνεται στη συσκευή Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Alliance Software.

### **3.2.8 Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης 17-OH προγεστερόνης και διυδροτεστοστερόνης σε κυτταρικά λύματα κυτταροκαλλιέργειών (ELISA)**

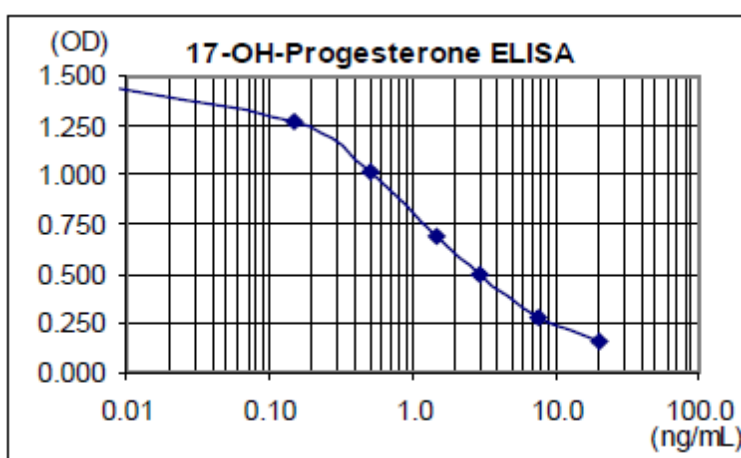
Τα κυτταρικά λύματα συγκεντρώθηκαν όταν τα κύτταρα βρίσκονταν σε 70%-80% συρροή. Χρησιμοποιήθηκε μια εμπορικά διαθέσιμη μέθοδος που βασίζεται στην τεχνική του ανταγωνισμού ειδική για την ανίχνευση των ορμονών της 17-OH προγεστερόνης και διυδροτεστοστερόνης (IBL International). Τόσο τα δείγματα που περιέχουν άγνωστη ποσότητα αντιγόνου όσο και ειδικά πρότυπα που περιέχουν συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αντιγόνου ανταγωνίζονται για τις θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων που καλύπτουν ήδη τις θέσεις των τριβλίων 96 θέσεων. Μετά την επώαση ακολουθούν πλύσεις για να σταματήσει η ανταγωνιστική αντίδραση. Το χρωμογόνο που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της αντίδρασης ήταν διάλυμα TMB (υπόστρωμα υπεροξειδάσης [HRP] για ELISA). Η ένταση του χρώματος είναι αντιστρόφως ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου στο δείγμα. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε 450nm σύμφωνα με τις προδιαγραφές του πακέτου με τη χρήση μετρητή, όπως πιο πάνω. Η συγκέντρωση των ορμονών 17-OH προγεστερόνης και διυδροτεστοστερόνης στα κυτταρικά λύματα της καλλιέργειας κυττάρων υπολογίσθηκε σε ng/ml με βάση υπολογισμένη πρότυπη καμπύλη απορρόφησης.

#### **3.2.8.1 Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης 17-OH προγεστερόνης**

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει την τοποθέτηση 25μl κάθε δείγματος / προτύπου σε ξεχωριστή θέση του ειδικού τριβλίου 96 θέσεων. Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στη συνέχεια γίνεται προσθήκη συζευμένου ενζύμου (Enzyme Conjugate) σε κάθε θέση. Ακολουθεί επώαση μιας ώρας σε θερμοκρασία δωματίου με ελαφριά ανάδευση. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται απομάκρυνση του περιεχομένου ενώ ακολουθούν τρεις πλύσεις (Washing buffer) με προσεκτική απομάκρυνση στο τέλος κάθε υπολείμματος νερού. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη TMB υποστρώματος και μετά από επώαση 15 λεπτών διακοπή της αντίδρασης με ειδικό διάλυμα TBM Stop Solution. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης γίνεται στα 450nm.



Όμοια με τη μέθοδο ανίχνευσης προγεστερόνης για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων γίνεται κατασκευή πρότυπης καμπύλης με τις τιμές της οπτικής απορρόφησης κάθε προτύπου (άξονας Y) σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές συγκέντρωσης προγεστερόνης (άξονας X, λογαριθμικός). Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων μπορούν να μετρηθούν απευθείας από την πρότυπη καμπύλη και όλες οι τιμές της οπτικής απορρόφησης βρίσκονται εντός των ορίων της πρότυπης καμπύλης. Ένα τυπικό παράδειγμα πρότυπης καμπύλης δίνεται παρακάτω (Σχήμα 1). Η ευαισθησία της μεθόδου ορίζεται στα 0,03 ng/ml και η ειδικότητά της σύμφωνα με τον κατασκευαστή φαίνεται στον Πίνακα 2.



**Σχήμα 1:** Τυπικό παράδειγμα πρότυπης καμπύλης απορρόφησης για την ενζυμική διαδικασία ανοσοπροσρόφησης 17-OH προγεστερόνης.

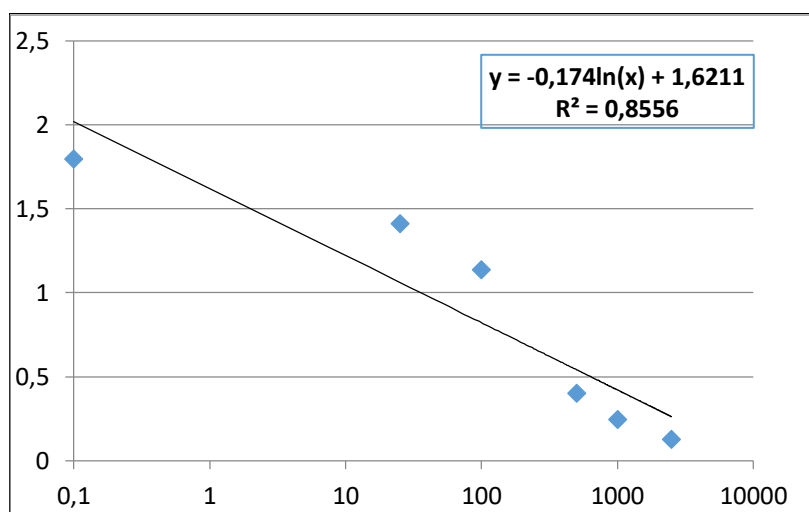
**Πίνακας 2:** Η ειδικότητα της μεθόδου ανοσοπροσρόφησης στον προσδιορισμό της 17-OH προγεστερόνης σε σχέση με άλλες συγγενείς στεροειδικές ορμόνες.

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)	Cross-reactivity of other substances tested $\leq 0.001$ %
	17 $\alpha$ -OH-Pregnenolone	1.7	
	Progesterone	1.4	
	11-Desoxy-Cortisol	1.3	
	Desoxy-Corticosterone	0.12	
	Cortisol	0.013	
	Pregnenolone	0.012	

### 3.2.8.2 Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης διυδροτεστοστερόνης

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει την τοποθέτηση 25μl κάθε δείγματος/προτύπου σε ξεχωριστή θέση του ειδικού τριβλίου 96 θέσεων. Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στη συνέχεια γίνεται προσθήκη συζευμένου ενζύμου (Enzyme Conjugate) σε κάθε θέση. Ακολουθεί επώαση μιας ώρας σε θερμοκρασία δωματίου με ελαφριά ανάδευση. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται απομάκρυνση του περιεχομένου ενώ ακολουθούν τρεις πλύσεις (Washing buffer) με προσεκτική απομάκρυνση στο τέλος κάθε υπολείμματος νερού. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη TMB υποστρώματος και μετά από επώαση 15 λεπτών διακοπή της αντίδρασης με ειδικό διάλυμα TBM Stop Solution. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης γίνεται στα 450nm.

Όμοια με τη μέθοδο ανίχνευσης προγεστερόνης για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων γίνεται κατασκευή πρότυπης καμπύλης με τις τιμές της οπτικής απορρόφησης κάθε προτύπου (άξονας Y) σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές συγκέντρωσης προγεστερόνης (άξονας X, λογαριθμικός). Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων μπορούν να μετρηθούν απευθείας από την πρότυπη καμπύλη και όλες οι τιμές της οπτικής απορρόφησης βρίσκονταν εντός των ορίων της πρότυπης καμπύλης. Ένα τυπικό παράδειγμα πρότυπης καμπύλης δίνεται παρακάτω (Σχήμα 2). Η ευαισθησία της μεθόδου ορίζεται στα 7,23 pg/ml και η ειδικότητά της σύμφωνα με τον κατασκευαστή φαίνεται στον Πίνακα 3.



**Σχήμα 2:** Τυπικό παράδειγμα πρότυπης καμπύλης απορρόφησης για την ενζυμική διαδικασία ανοσοπροσρόφησης διωδροτεστοστερόνης (DHT).

**Πίνακας 3:** Η ειδικότητα της μεθόδου ανοσοπροσρόφησης στον προσδιορισμό της διωδροτεστοστερόνης σε σχέση με άλλες συγγενείς στεροειδικές ορμόνες.

Steroid	% Cross Reactivity
Dihydrotestosterone	100
Testosterone	8.7
5β Dihydrotestosterone	2.0
Androstenedione	0.2

### 3.2.8.3 Τιμές αναφοράς των ενδοκυττάρων επιπέδων 17-OH προγεστερόνης και διωδροτεστοστερόνης στις κυτταροσειρές που μελετήθηκαν

Ο παρακάτω πίνακας απεικονίζει τις τιμές αναφοράς των ενδοκυττάρων επιπέδων 17-OH προγεστερόνης και διωδροτεστοστερόνης στις κυτταροσειρές PC3, LNCaP και VCaP (Πίνακας 4)

**Πίνακας 4:** Οι τιμές των ενδοκυττάρων επιπέδων 17-OH προγεστερόνης και διωδροτεστοστερόνης σε κύτταρα αναφοράς PC3, LNCaP και VCaP.

	PC3	LNCaP	VCaP
17-OH προγεστερόνη	0,32 ng/mg	0,46 ng/mg	0,25 ng/mg
Διωδροτεστοστερόνη	11,5 pg/mg	15,75 pg/mg	130,5 pg/mg

### 3.2.9 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός

Η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκε για την ενδοκυτταρική ανίχνευση του ανδρογονικού υποδοχέα (AR). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες διαμέτρου 12 mm (την μέρα του πειράματος τα κύτταρα κάλυπταν το 60%-80% της επιφάνειας της καλυπτρίδας). Τα κύτταρα στις καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με PBS/3% φορμαλδεύδη για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε νέα πλύση με PBS και

κατεργασία με μίγμα PBS /1% Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4°C προκειμένου να γίνει διάνοιξη των μεμβρανών των κυττάρων. Στη συνέχεια έγινε κορεσμός των μη ειδικών θέσεων με PBS-0.1% Tween 20-3% BSA για 1 ώρα στους 4°C. Το πρώτο αντίσωμα προστέθηκε για μια ώρα σε PBS-0.1% Tween/1% BSA, σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντίσωμα απομακρύνθηκε με 3 διαδοχικά πλυσίματα με PBS 0,1% Tween/1% BSA. Ακολούθησε επώαση με το 2ο αντίσωμα (έναντι της IgG ποντικού συνδεδεμένο με FITC ή Cy3 σε αραιώση 1:1000) για 30 λεπτά στους 4°C. Το αντίσωμα απομακρύνθηκε με διαδικασία όμοια με αυτή που ακολουθήθηκε για το πρώτο αντίσωμα. Ακολούθησε μια τελευταία πλύση με PBS και στιγμιαία εμβάπτιση σε H<sub>2</sub>O. Οι καλυπτρίδες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες αφού είχαν προστεθεί 2 μl υλικού σταθεροποίησης του φθορισμού (Vectashield, Vector laboratories) το οποίο περιείχε και την φθορίζουσα ουσία DAPI (4',6-διάμινο-2-φαινυλινδολη) η οποία έχει τη δυνατότητα να προσδέεται στο DNA και έτσι να διακρίνονται οι πυρήνες. Η παρατήρηση των καλυπτρίδων έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss AxioPlan, με μεγεθυντικούς φακούς 20X, 40X και 100X, με φίλτρα για DAPI, FITC, Cy3.

### 3.2.10 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Graph Pad InStat με ANOVA test. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι +/- τυπική απόκλιση (SEM). Τα στατιστικά σημαντικά όρια είναι \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  και \*  $p < 0.05$ . Η ανάλυση της διακύμανσης πραγματοποιήθηκε με One-Way-analysis of Variance και η σύγκριση επιλεγμένων ζευγών με Bonferroni test.

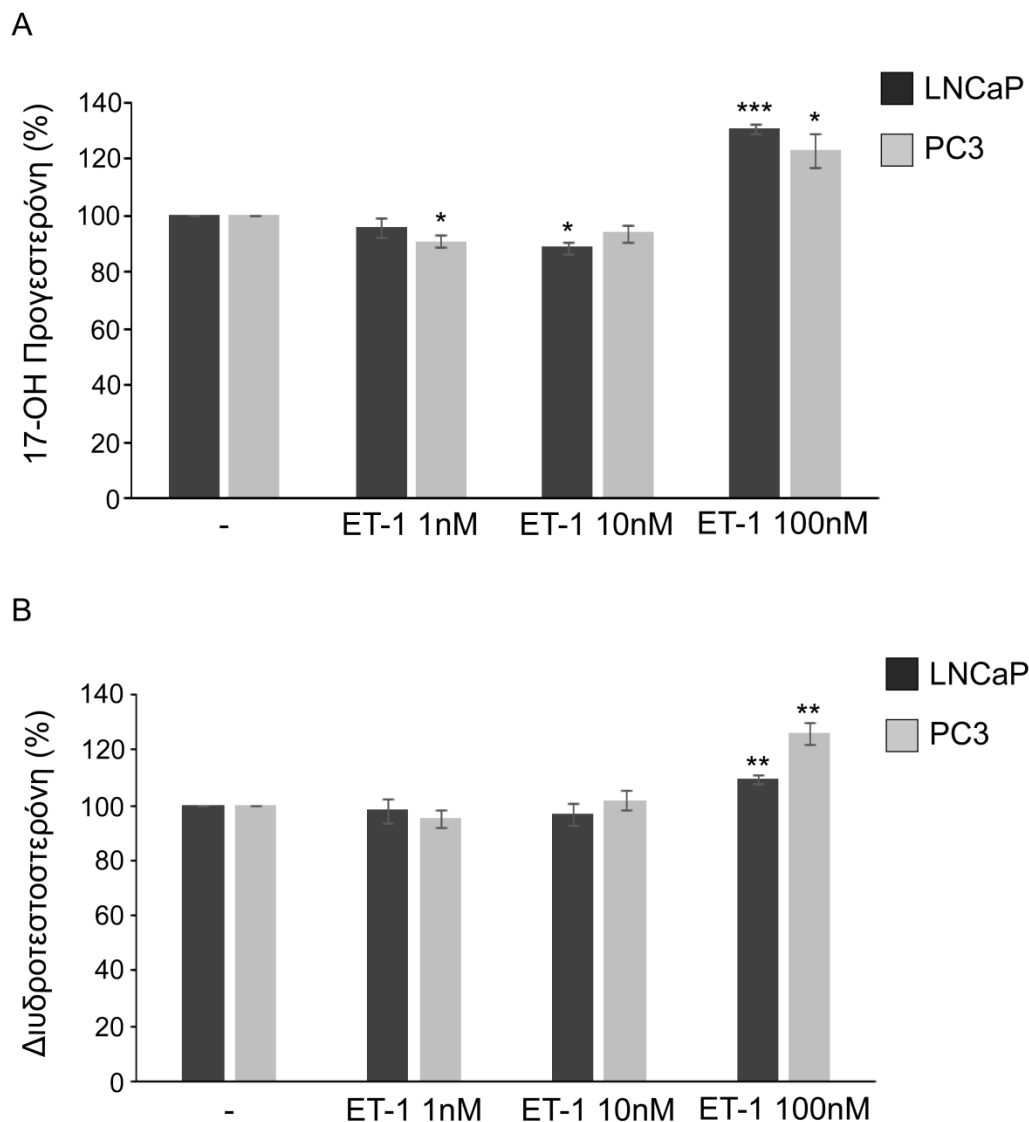
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ

### ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ-1 ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΜΠΙΡΑΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ PC3 ΚΑΙ LNCaP

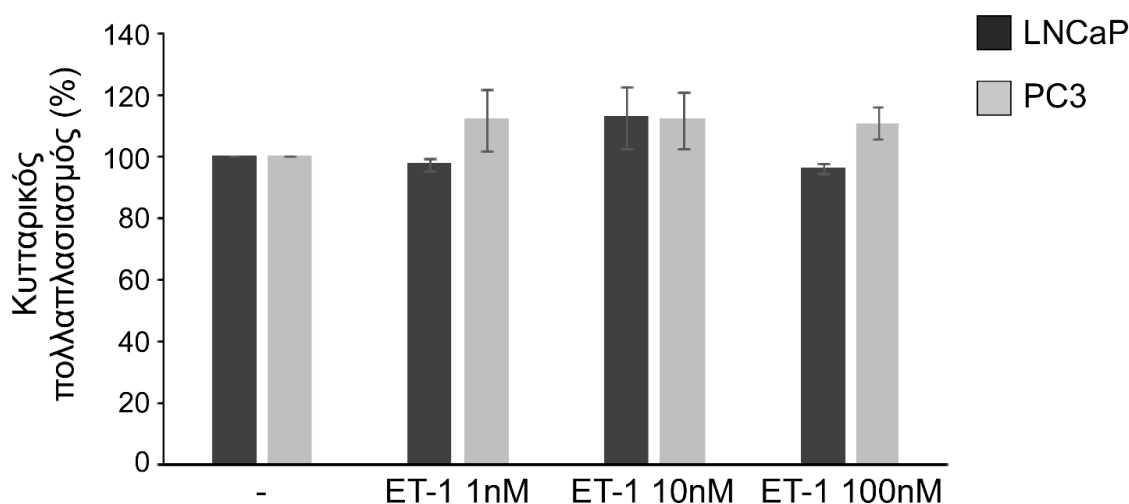
#### 4.1.1 Η επίδραση της ενδοθηλίνης-1 στη στεροειδογένεση και τον πολλαπλασιασμό σε κύτταρα PC3 και LNCaP

Είναι γνωστό ότι η ET-1 επιδρά στη στεροειδογένεση και τη δραστηριότητα του ανδρογονικού υποδοχέα σε καρκινικά προστατικά κύτταρα. Με σκοπό να ελεγχθεί η επίδραση της ET-1 στη στεροειδογένεση και τον πολλαπλασιασμό, κύτταρα PC3 και LNCaP καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ET-1 και κατόπιν έγινε μέτρηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της 17-OH προγεστερόνης, της διδροτεστοστερόνης καθώς επίσης και του πολλαπλασιασμού αυτών των κυττάρων. Τα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης μετά τη χορήγηση ET-1 συγκεντρώσεων 1 nM και 10 nM εμφάνισαν ελάχιστη μείωση στα κύτταρα LNCaP και PC3. Αντίθετα, μετά τη χορήγηση ET-1 100 nM τα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά και στις δύο κυτταροσειρές (κατά 31% στα κύτταρα LNCaP και κατά 23% στα κύτταρα PC3) (Εικόνα 16A). Αντίστοιχα, όσον αφορά τα επίπεδα διδροτεστοστερόνης, όταν στα κύτταρα χορηγήθηκε ET-1 σε συγκεντρώσεις 1 nM και 10 nM δε παρουσιάστηκε κάποια μεταβολή στα ενδοκυττάρια επίπεδα διδροτεστοστερόνης. Αντίθετα όταν στα κύτταρα χορηγήθηκε ET-1 συγκέντρωσης 100 nM, προκλήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της διδροτεστοστερόνης κατά 26,5% στα κύτταρα PC3 και κατά 10% στα κύτταρα LNCaP (Εικόνα 16B).



**Εικόνα 16: Επίδραση της ενδοθηλίνης -1 (ET-1) στα ενδοκυττάρια επιπέδα 17-OH προγεστερόνης και διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα LNCaP και PC3.** Προσδιορισμός των επιπέδων της ενδοκυττάριας (A) 17-OH προγεστερόνης και (B) διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα LNCaP και PC3 μετά από επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ενδοθηλίνης-1 (ET-1) (1, 10 και 100 nM) για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % των επιπέδων 17-OH προγεστερόνης ή διυδροτεστοστερόνης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*\*\*)  $P < 0,005$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,05$ - σε σχέση με το δείγμα ελέγχου).

Στη συνέχεια εξετάστηκε ο πολλαπλασιασμός αυτών των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε συγκεντρώσεις ενδοθηλίνης 1, 10 και 100 nM. Τόσο τα κύτταρα PC3 όσο και τα κύτταρα LNCaP δεν εμφάνισαν σημαντικές μεταβολές στον πολλαπλασιασμό τους με την επίδραση ενδοθηλίνης οποιασδήποτε εκ των τριών συγκεντρώσεων (Εικόνα 17).



**Εικόνα 17: Επίδραση της ενδοθηλίνης -1 (ET-1) στον πολλαπλασιασμό κυττάρων LNCaP και PC3.** Προσδιορισμός του πολλαπλασιασμού κυττάρων LNCaP και PC3 μετά από επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ενδοθηλίνης -1 (ET-1) (1, 10 και 100 nM) για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 3 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα.

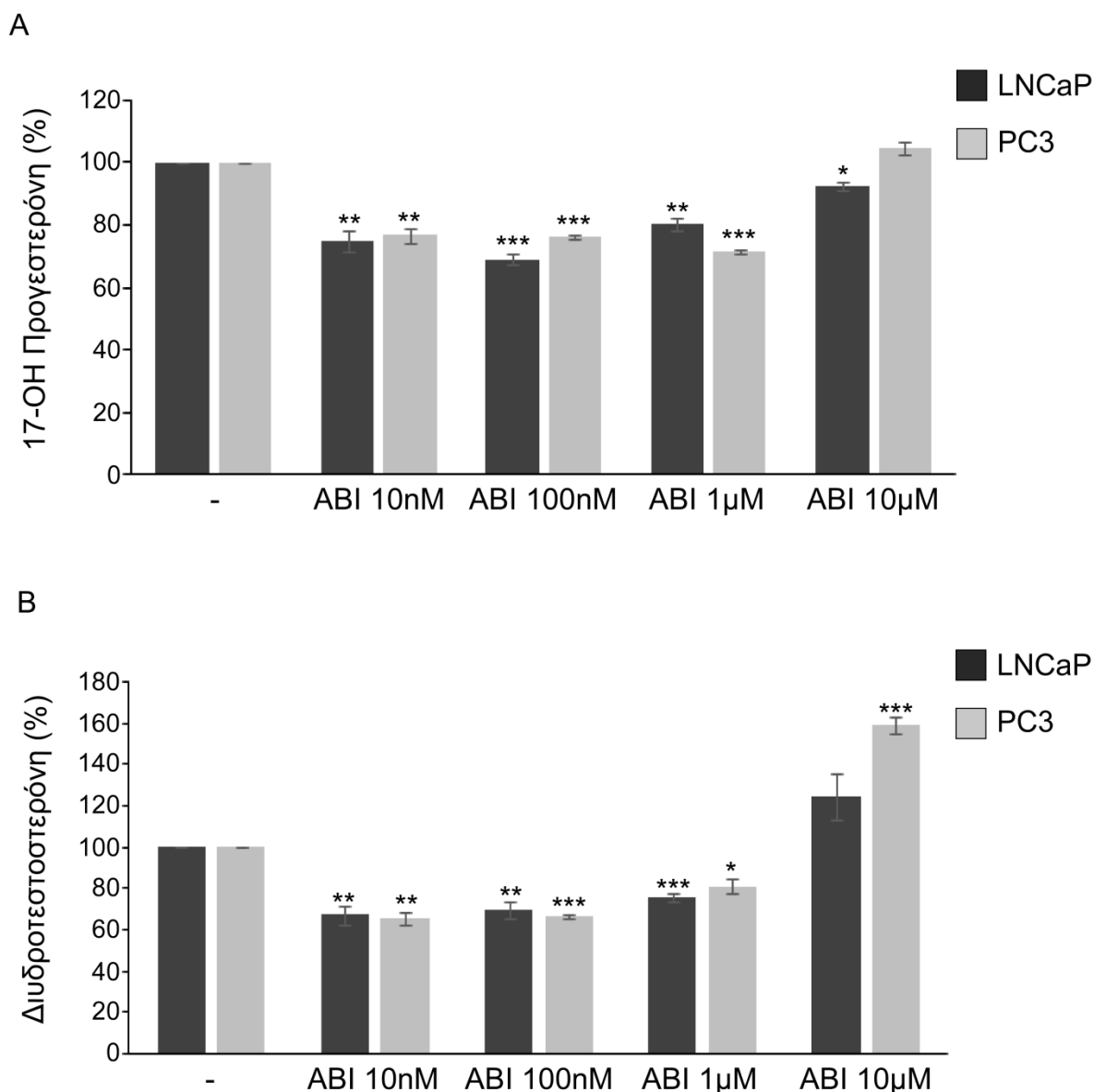
#### 4.1.2 Η επίδραση της αμπιρατερόνης στη στεροειδογένεση και τον πολλαπλασιασμό σε κύτταρα PC3 και LNCaP

Για την αναστολή της στεροειδογένεσης χρησιμοποιήθηκε η αμπιρατερόνη. Η αμπιρατερόνη αποτελεί έναν νέο αναστολέα του κυτοχρώματος P450 (CYP 17A1) ο οποίος πήρε έγκριση από τον FDA το 2011 σε συνδυασμό με την πρεδνιζόνη για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του προστάτη. Η αμπιρατερόνη προσδένεται μη αντιστρεπτά στο ένζυμο CYP 17A1 το οποίο καταλύει τη μετατροπή της πρεγνενολόνης και της προγεστερόνης στα 17 $\alpha$ -υδροξυ παράγωγά τους. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της αμπιρατερόνης στα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης, διδροτεστοστερόνης καθώς και του πολλαπλασιασμού σε κύτταρα PC3 και

LNCaP. Η καλλιέργεια των κυττάρων με αμπιρατερόνη συγκέντρωσης 10 nM οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση στα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης κατά 25% στα κύτταρα LNCaP και 23% στα κύτταρα PC3 σε σύγκριση με τα κύτταρα στα οποία δεν είχε χορηγηθεί αμπιρατερόνη. Η χορήγηση αμπιρατερόνης συγκέντρωσης 100 nM οδήγησε σε μεγαλύτερη μείωση κατά 31% στα κύτταρα LNCaP και 24% στα PC3. Στη συνέχεια η χορήγηση αμπιρατερόνης συγκέντρωσης 1 μM είχε σαν αποτέλεσμα τη στατιστικά σημαντική μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων 17-OH προγεστερόνης στα κύτταρα PC3 (19,5%) και στα κύτταρα LNCaP (28,5%). Τέλος, η χορήγηση αμπιρατερόνης συγκέντρωσης 10 μM, μείωσε τα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης κατά 7,5% στα LNCaP ενώ δεν επηρέασε τα επίπεδα στα κύτταρα PC3 σε σχέση με τα κύτταρα που δεν είχαν υποστεί την επίδραση αμπιρατερόνης (Εικόνα 18A).

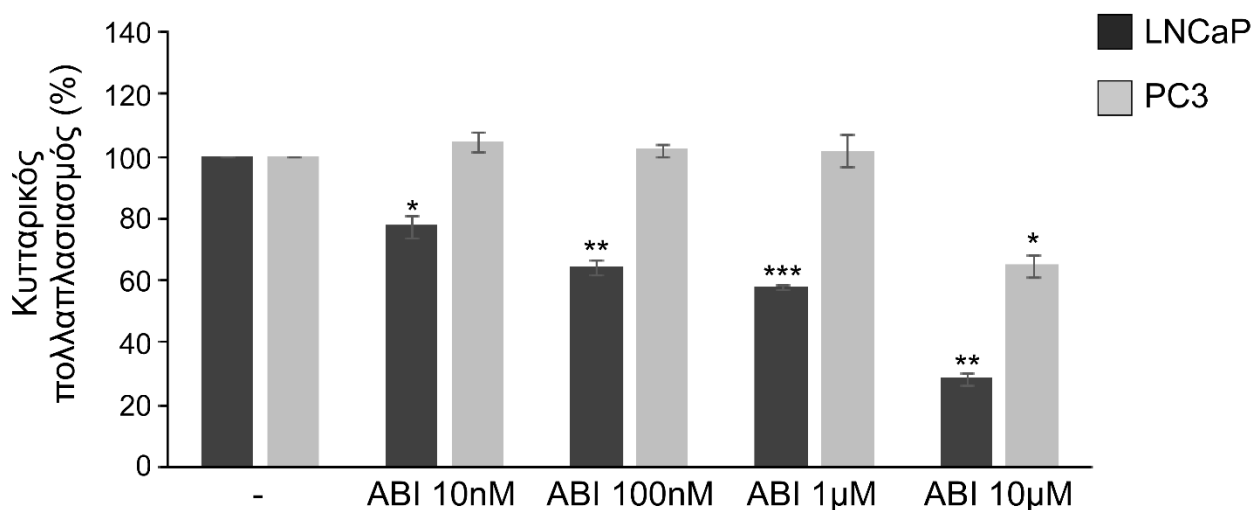
Όσον αφορά τα ενδοκυττάρια επίπεδα διδροτεστοστερόνης, η χορήγηση αμπιρατερόνης συγκέντρωσης 10 nM προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση 33% και 35% στα ενδοκυττάρια επίπεδα διδροτεστοστερόνης σε κύτταρα LNCaP και PC3 αντίστοιχα, σε σχέση με τα κύτταρα που δεν είχαν υποστεί την επίδραση αμπιρατερόνης. Όμοια και κατά τη χορήγηση αμπιρατερόνης 100nM, η διδροτεστοστερόνη μειώθηκε κατά 37% στα LNCaP και 33,5% στα κύτταρα PC3. Όταν στα κύτταρα χορηγήθηκε αμπιρατερόνη συγκέντρωσης 1μM ,η μείωση της διδροτεστοστερόνης ήταν 24% στα κύτταρα LNCaP και 19% στα PC3. Από την άλλη πλευρά, όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με υψηλότερες συγκεντρώσεις αμπιρατερόνης (10 μM) παρατηρήθηκε αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων διδροτεστοστερόνης και στις δύο κυτταρικές σειρές. Αναλυτικότερα, τα επίπεδα διδροτεστοστερόνης αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά κατά 24% στα κύτταρα LNCaP και 58% στα PC3 σε σχέση με τα κύτταρα τα οποία δεν είχαν υποστεί την επίδραση αμπιρατερόνης (Εικόνα 18B).





**Εικόνα 18: Επίδραση της αμπιρατερόνης στα ενδοκυττάρια επιπέδα 17-OH προγεστερόνης και διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα PC3 και LNCaP.** Προσδιορισμός των επιπέδων της ενδοκυττάριας (A) 17-OH προγεστερόνης και (B) διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα LNCaP και PC3 μετά από επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων αμπιρατερόνης (ABI) (10 nM , 100 nM 1 µM και 10 µM) για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % των επιπέδων 17-OH προγεστερόνης ή διυδροτεστοστερόνης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*\*\*)  $P < 0,005$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,05$ - σε σχέση με το δείγμα ελέγχου).

Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι αλλαγές στο ρυθμό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων στα οποία χορηγήθηκαν οι ίδιες συγκεντρώσεις αμπιρατερόνης. Τα κύτταρα LNCaP παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού σε όλες τις συγκεντρώσεις αμπιρατερόνης με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Αναλυτικότερα στα κύτταρα LNCaP, η χορήγηση 10 nM αμπιρατερόνης οδήγησε σε μείωση του πολλαπλασιασμού κατά 23%, όταν χορηγήθηκε αμπιρατερόνη 100 nM ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μειώθηκε κατά 36%, με 1 μM αμπιρατερόνη μειώθηκε κατά 42% και τελικά με 10 μM αμπιρατερόνης μειώθηκε κατά 37% σε σχέση με τα κύτταρα που δεν είχαν υποστεί την επίδραση αμπιρατερόνης. Από την άλλη πλευρά, η χορήγηση αμπιρατερόνης στα κύτταρα PC3 προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της τάξης του 35% μόνο στη χρήση αμπιρατερόνης συγκέντρωσης 10μM. Οι συγκεντρώσεις αμπιρατερόνης 10nM , 100nM και 1μM που χορηγήθηκαν δεν επέφεραν καμία μεταβολή στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων PC3 (Εικόνα 19).



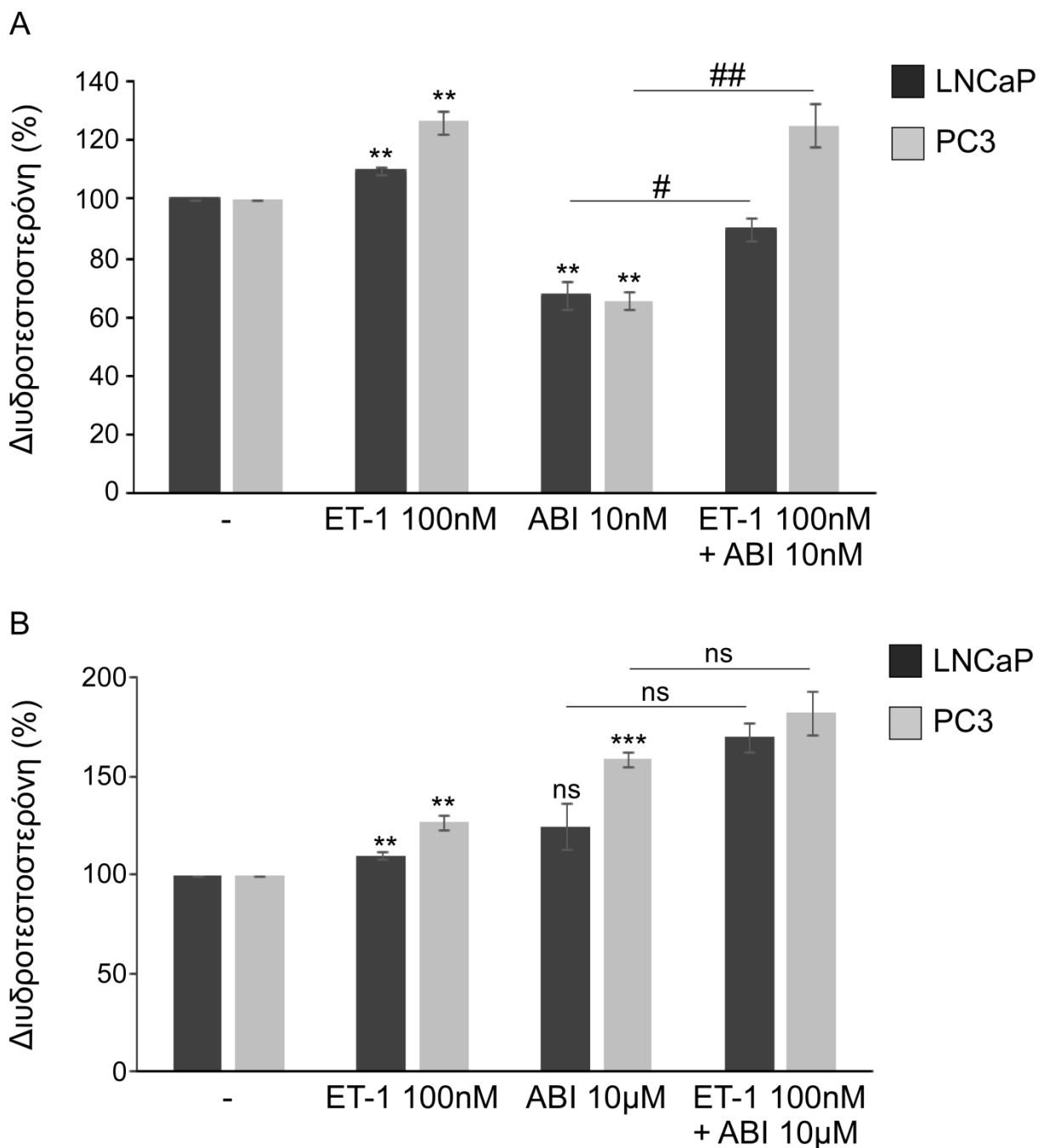
**Εικόνα 19: Επίδραση της αμπιρατερόνης (ABI) στο πολλαπλασιασμό κυττάρων LNCaP και PC3.**

Προσδιορισμός του πολλαπλασιασμού κυττάρων LNCaP και PC3 μετά από επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων αμπιρατερόνης ABI (10nM , 100nM 1μM και 10μM) για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 3 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*\*\* P<0,005, \*\* P<0,01, \*P<0,05- σε σχέση με το δείγμα ελέγχου).

### 4.1.3 Μελέτη της ET-1 ως μηχανισμός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης σε PC3 και LNCaP κύτταρα

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ET-1 ως μηχανισμός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης. Για το σκοπό αυτό, έγινε συγχρόνηση ET-1 και αμπιρατερόνης για 24 ώρες και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα διδροτεστοστερόνης καθώς και ο πολλαπλασιασμός σε LNCaP και PC3 κύτταρα. Για τις συγχρονήσεις χρησιμοποιήθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση ET-1 (100 nM) η οποία είχε τη μεγαλύτερη επίδραση στη στεροειδογένεση. Η αμπιρατερόνη χρησιμοποιήθηκε σε δύο συγκεντρώσεις, στα 10 nM όπου έδειξε τη μεγαλύτερη κατασταλτική δράση στη στεροειδογένεση και 10 μM όπου έδειξε τη μεγαλύτερη κατασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό και στις δύο κυτταρικές σειρές.

Η συγχρόνηση ET-1 100 nM και αμπιρατερόνης 10 nM στα κύτταρα LNCaP αύξησε στατιστικά σημαντικά κατά 23% τα επίπεδα διδροτεστοστερόνης ενώ στα κύτταρα PC3 η στατιστικά σημαντική αύξηση έφτασε το 60% συγκριτικά με τα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο αμπιρατερόνη (Εικόνα 20A). Όμοια η συγχρόνηση ET-1 100 nM και αμπιρατερόνης 10 μM οδήγησε επίσης σε μία αύξηση 45% στα επίπεδα διδροτεστοστερόνης στα κύτταρα LNCaP ενώ στα κύτταρα PC3 σε μια αύξηση 24% συγκριτικά με τα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο αμπιρατερόνη (Εικόνα 20B). Οι αυξήσεις αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ωστόσο η τάση της ET-1 να κυριαρχεί στην δράση της αμπιρατερόνης στη στεροειδογένεση και στις δύο συγκεντρώσεις της αμπιρατερόνης που χρησιμοποιήθηκαν είναι όμοια.

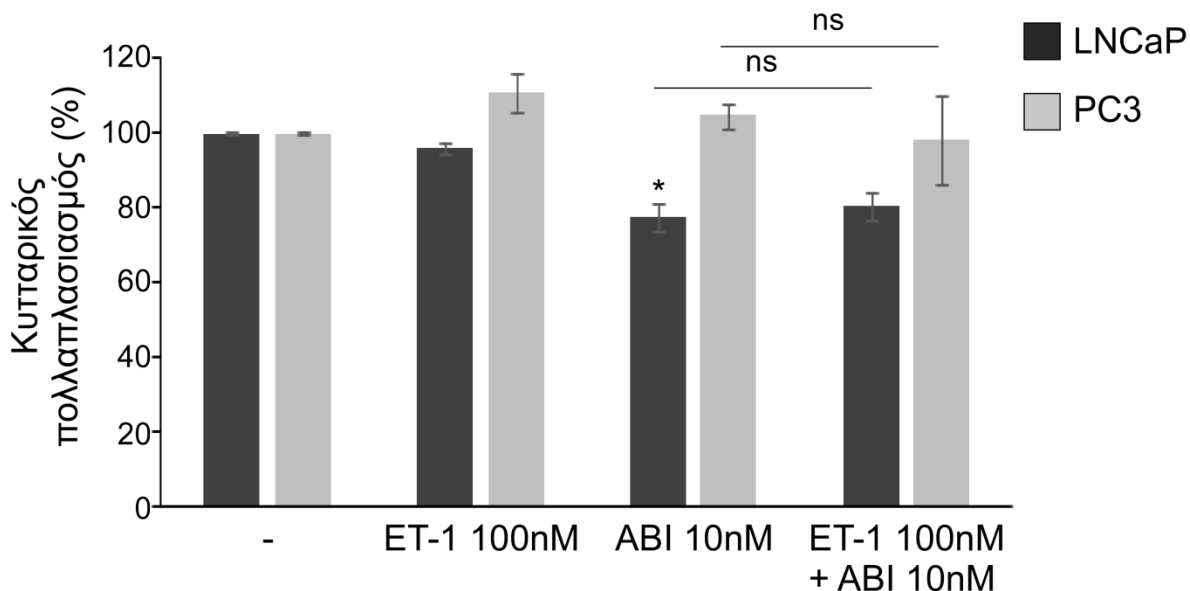


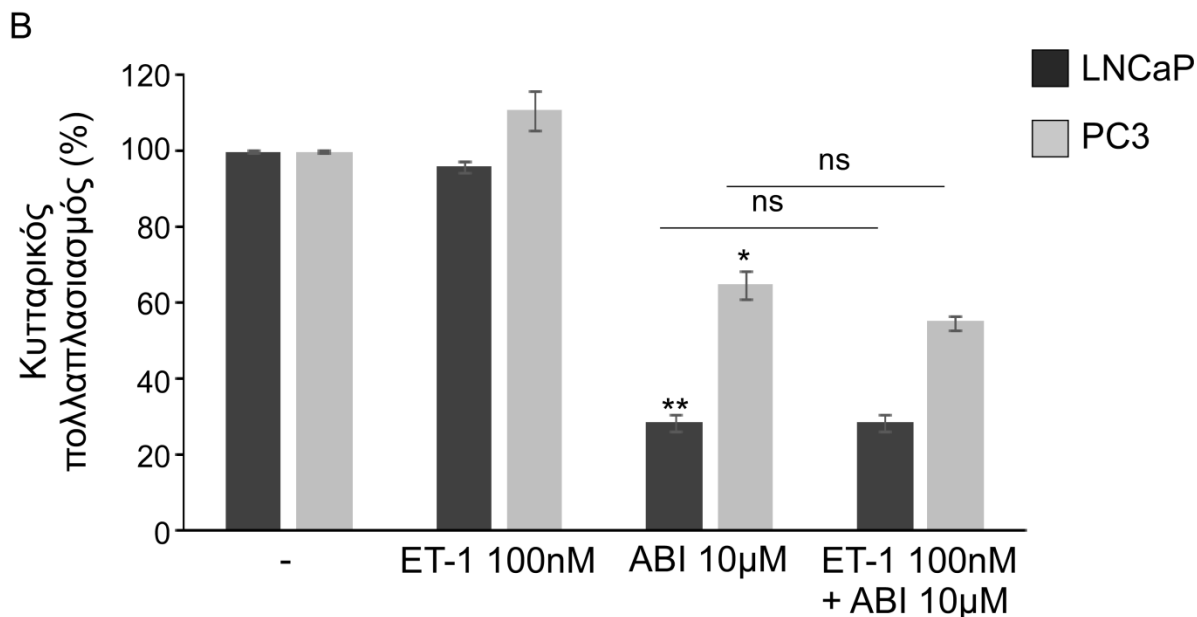
**Εικόνα 20:** Επίδραση της ενδοθηλίνης-1 (ET-1) και της αμπιρατερόνης (ABI) στα ενδοκυττάρια επίπεδα διδροτεστοστερόνης σε κύτταρα LNCaP και PC3. Προσδιορισμός των επιπέδων της ενδοκυττάριας διδροτεστοστερόνης σε κύτταρα LNCaP και PC3 μετά από επίδραση ET-1 συγκέντρωσης 100 nM ή/και αμπιρατερόνης συγκέντρωσης (A) 10nM και (B) 10 µM για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % των επιπέδων διδροτεστοστερόνης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το

τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*\* $P < 0,005$ , \*\*  $P < 0,01$  - σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, ##  $P < 0,01$ , #  $P < 0,05$ , ns: not significant).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της συγχορήγησης ET-1 και αμπιρατερόνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα στα κύτταρα LNCaP η προσθήκη ET-1 100 nM και αμπιρατερόνης 10 nM προκάλεσε μη σημαντική αύξηση του 3% στα κύτταρα PC3 και μείωση του 6% στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο αμπιρατερόνη (Εικόνα 21A). Όμοια η συγχορήγηση ET-1 100 nM και αμπιρατερόνης 10  $\mu$ M στα κύτταρα LNCaP δεν είχε καμία επίδραση και στα κύτταρα PC3 προκάλεσε μείωση κατά 10% στον πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο αμπιρατερόνη (Εικόνα 21B). Οι αλλαγές αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ωστόσο παρόλα αυτά παρατηρούμε την τάση της αμπιρατερόνης να κυριαρχεί στη δράση της ET-1 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στις δύο συγκεντρώσεις της αμπιρατερόνης που χρησιμοποιήθηκαν.

A



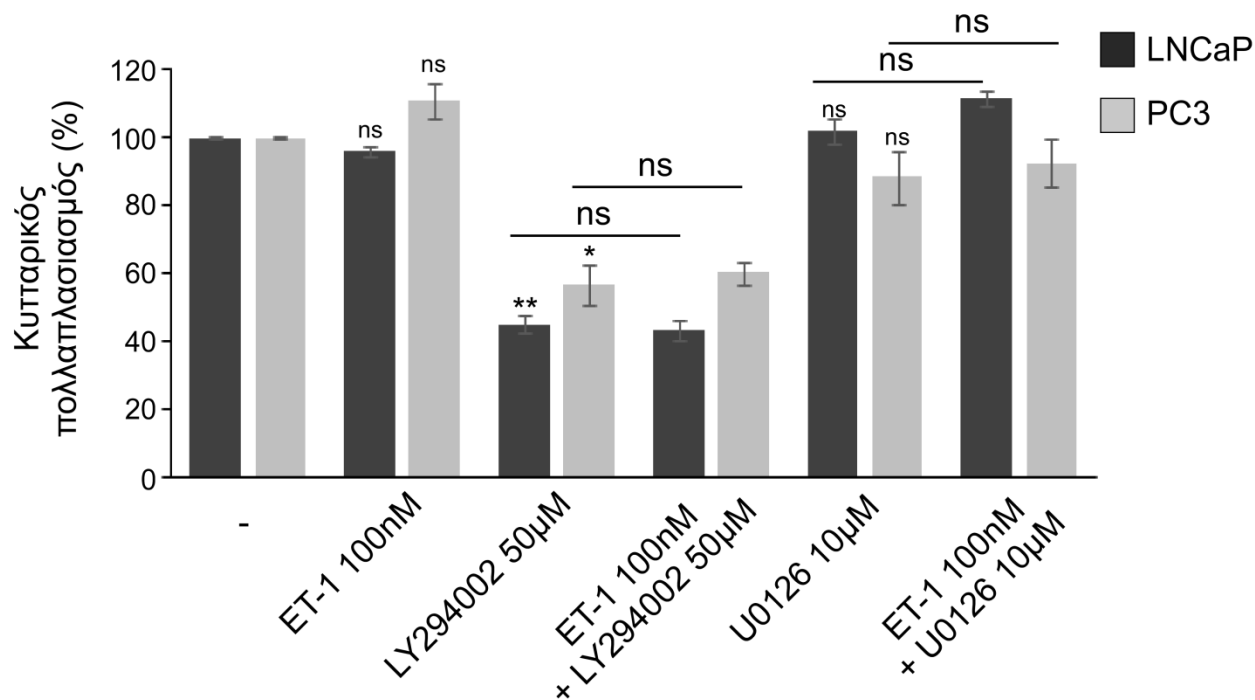


**Εικόνα 21: Επίδραση της ενδοθηλίνης-1 (ET-1) και της αμπιρατερόνης (ABI) στο πολλαπλασιασμό κυττάρων LNCaP και PC3.** Προσδιορισμός του πολλαπλασιασμού κυττάρων LNCaP και PC3 μετά από επίδραση ενδοθηλίνης-1 (ET-1) (100nM) ή/και αμπιρατερόνης (ABI) συγκένρωσης (A) 10nM και (B) 10µM για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 3 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα ( \*\*  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,05$ , ns: not significant).

#### 4.1.4 Διερεύνηση του μηχανισμού της κατασταλτικής δράσης της αμπιρατερόνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Με σκοπό να μελετηθεί ο μηχανισμός της κατασταλτικής δράσης της αμπιρατερόνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να γίνει μία προσέγγιση των σηματοδοτικών μηχανισμών που εμπλέκονται, μετρήθηκε ο πολλαπλασιασμός σε κύτταρα στα οποία είχε συγχωρηγηθεί ET-1 και οι αναστολείς LY294002 (αναστολέας PI3K) ή U0126 (αναστολέας MEK 1/2) για 24 ώρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η χορήγηση του αναστολέα LY294002 προκάλεσε σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού κατά 54% στα κύτταρα LNCaP και κατά 38% στα κύτταρα PC3 συγκριτικά με τα κύτταρα τα οποία δεν είχαν υποστεί επίδραση αναστολέα. Η προσθήκη ET-1 στα κύτταρα τα οποία είχαν ήδη επωαστεί με τον αναστολέα LY294002 δεν ανέστρεψε την αρχική

επίδραση του αναστολέα, συνεπώς ο πολλαπλασιασμός παρέμεινε στα ίδια επίπεδα μείωσης και στις δύο κυτταρικές σειρές. Επιπρόσθετα, κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο αναστολέας U0126 ή συγχωρηγούμενος με ET-1 δεν έδειξαν κάποια μεταβολή στο ρυθμό πολλαπλασιασμού συγκριτικά με τα κύτταρα τα οποία δεν είχαν υποστεί καμία επίδραση αναστολέων (Εικόνα 22).

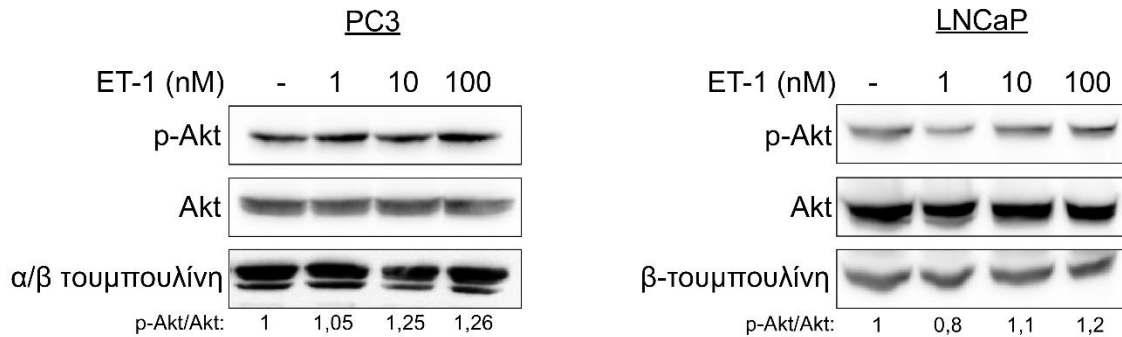


**Εικόνα 22: Επίδραση της ενδοθηλίνης-1 (ET-1) και των αναστολέων LY294002 και U0126 στο πολλαπλασιασμό κυττάρων LNCaP και PC3.** Προσδιορισμός του πολλαπλασιασμού κυττάρων LNCaP και PC3 μετά από επίδραση ενδοθηλίνης-1 (ET-1) (100nM) ή/και των αναστολέων LY294002 (50μM) και U0126 (10μM) για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 3 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*\* P<0,01, \*P<0,05).

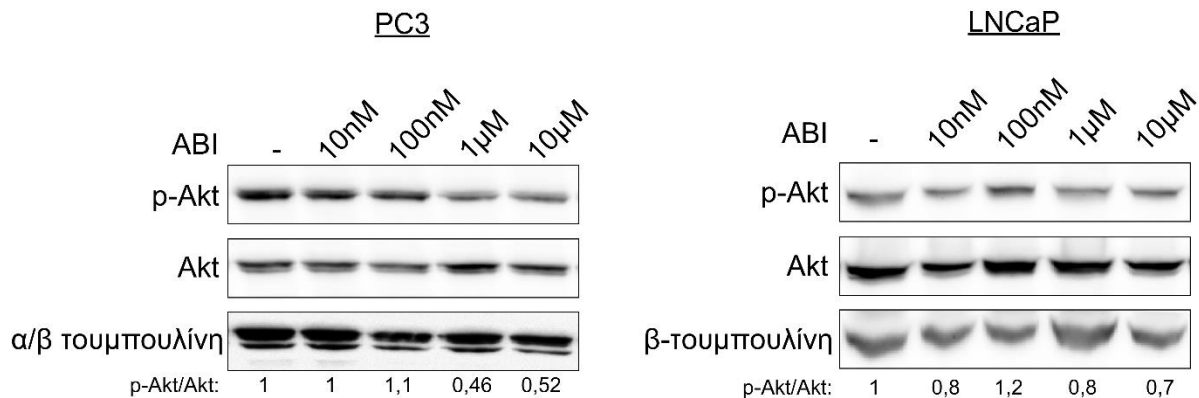
Στη συνέχεια για την περαιτέρω διερεύνηση της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που προκαλείται από την αμπιρατερόνη εξετάστηκε η επίδραση της αμπιρατερόνης στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt σε κύτταρα PC3 και LNCaP. Όπως

φαίνεται στην εικόνα 23A, η ET-1 δεν επηρέασε την φωσφορυλίωση Akt (p-Akt) και στις δύο κυτταρικές σειρές ενώ παράλληλα τα επίπεδα της συνολικής πρωτεΐνης Akt δεν μεταβλήθηκαν. Στη συνέχεια όπως φαίνεται στην εικόνα 23B, η αμπιρατερόνη μείωσε την φωσφορυλίωση της Akt ( p-Akt) σε συγκεντρώσεις 1  $\mu$ M και 10  $\mu$ M κυρίως στα PC3.

A



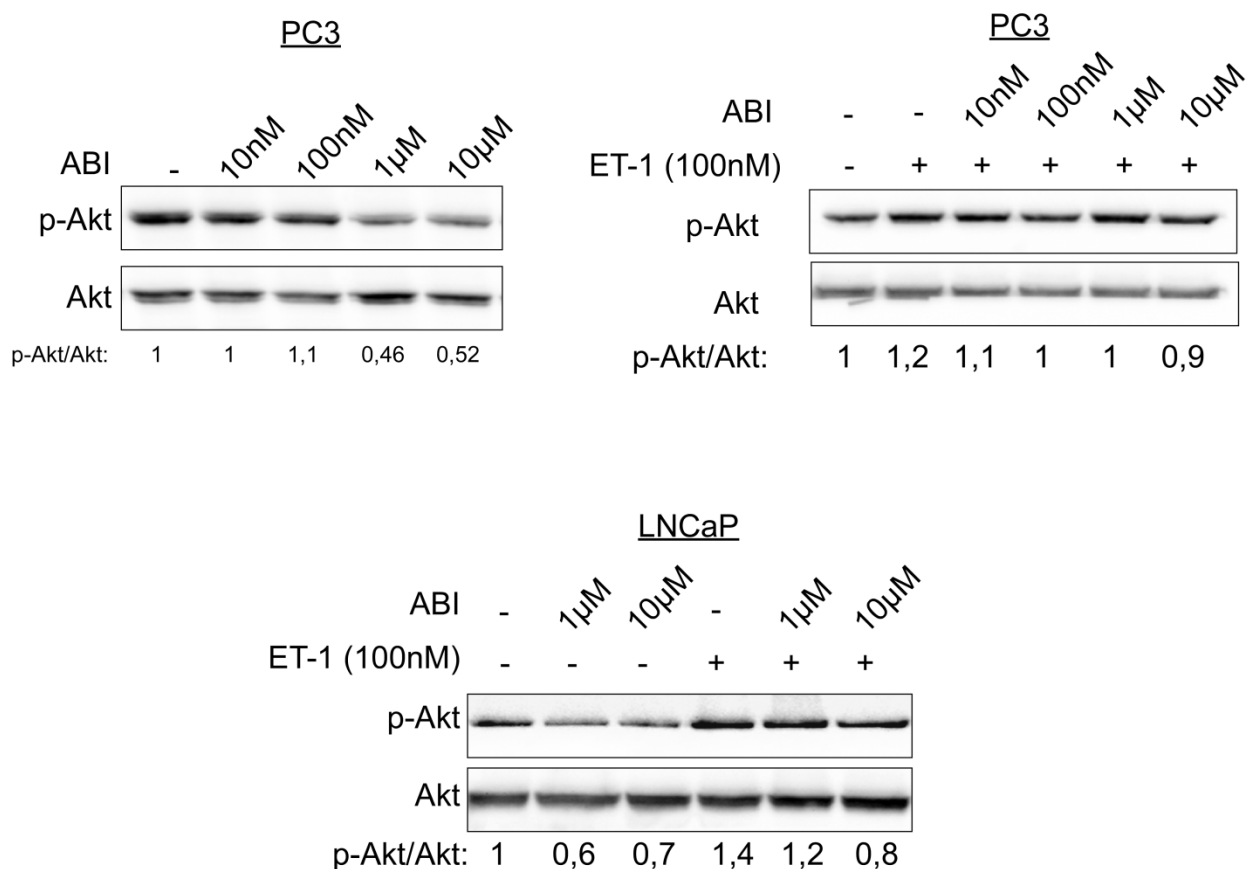
B



**Εικόνα 23: Επίδραση της ενδοθηλίνης-1 (ET-1) ή της αμπιρατερόνης (ABI) στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt.** Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι την p-Akt, την Akt και την  $\beta$ - τουμπουλίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων LncAP και PC3 που επωάστηκαν με (A) ET-1 1 nM, 10 nM και 100 nM για 24 ώρες, (B) αμπιρατερόνη 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M και 10 $\mu$ M για 24 ώρες. Οι τιμές κάτω από τις διαδρομές παρουσιάζουν το λόγο p-Akt/Akt, εκφρασμένο σε σχέση με τη συνθήκη χωρίς επίδραση. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

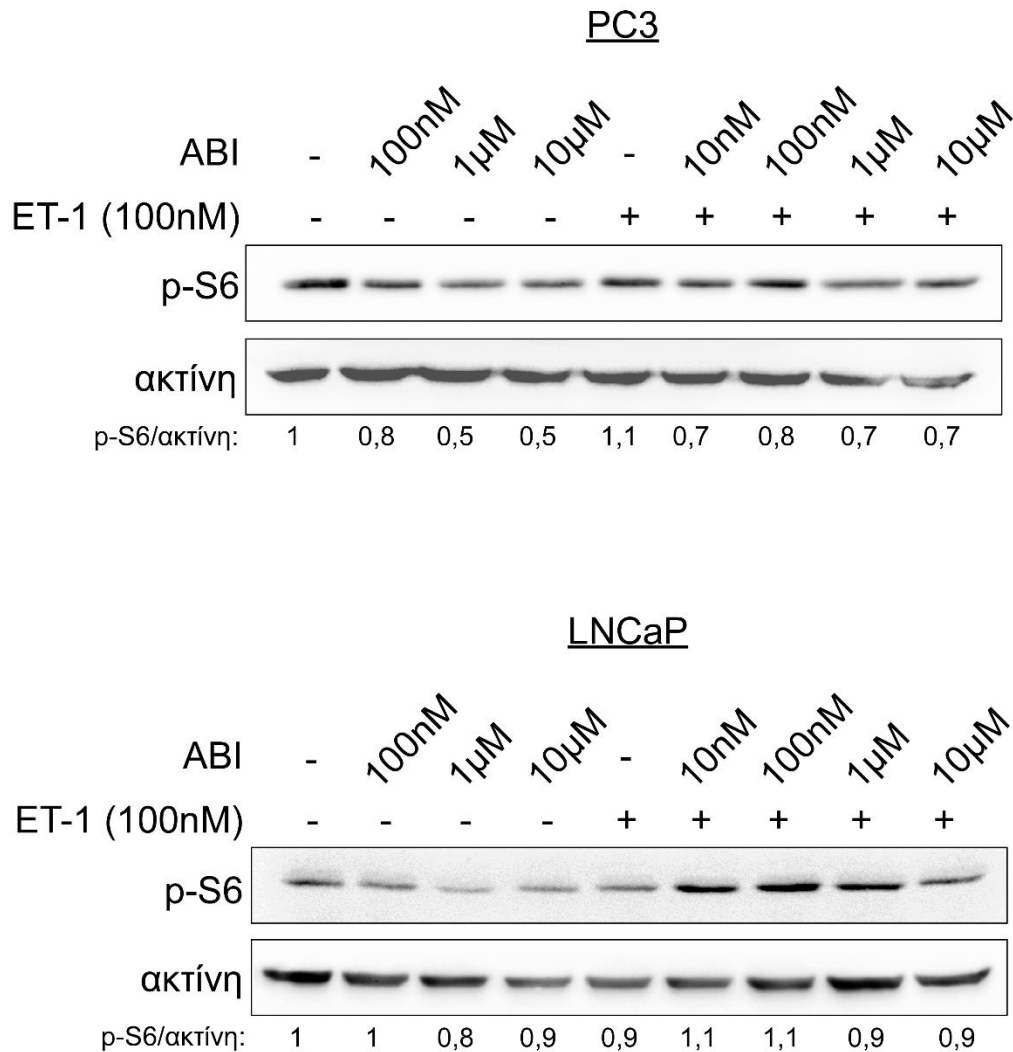


Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της συγχορήγησης της αμπερατερόνης με την Ενδοθηλίνη στο μονοπάτι των PI3K-Akt-S6RP-p70S6 και παρατηρήθηκαν οι ενεργοποιημένες-φωσφορυλιωμένες μορφές της οδού. Παρατηρήθηκε ότι η συγχορήγηση προκάλεσε αύξηση της p-Akt σε σχέση με την ανασταλτική δράση που είχε η αμπερατερόνη μόνη της (Εικόνα 24). Ωστόσο παρατηρήθηκε ότι η προκαλούμενη αναστολή της φωσφορυλίωσης των μετέπειτα στόχων του μονοπατιού της Akt, όπως η S6RP και p70S6 δεν μεταβλήθηκε με τη συγχορήγηση της ET-1 (Εικόνες 24-26). Αυτό το αποτέλεσμα βρίσκεται σε συμφωνία με τη δράση της αμπερατερόνης η οποία προκαλεί μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που ήταν ανεξάρτητη από εκείνη της ET-1. Συμπερασματικά μέρος του τρόπου δράσης της αμπερατερόνης για την αναστολή του πολλαπλασιασμού παρουσία ET-1 περιλαμβάνει την αναστολή ενεργοποίησης στόχων του μονοπατιού PI3K/Akt.

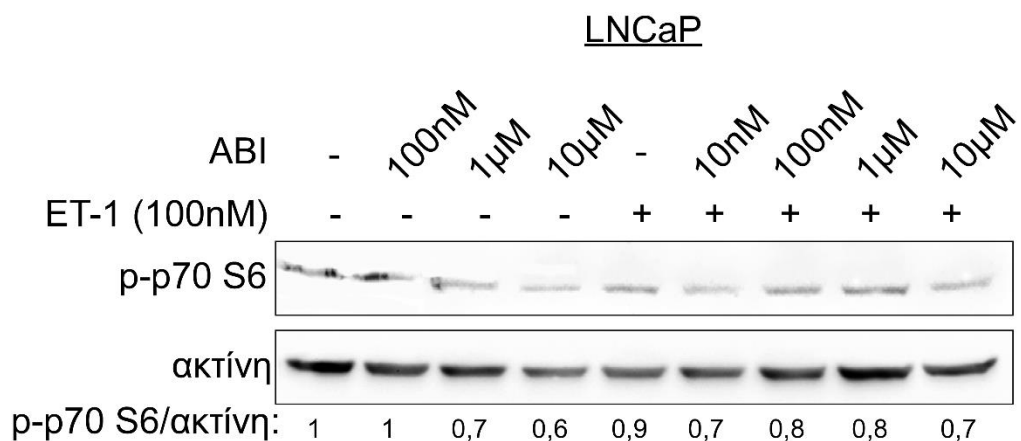
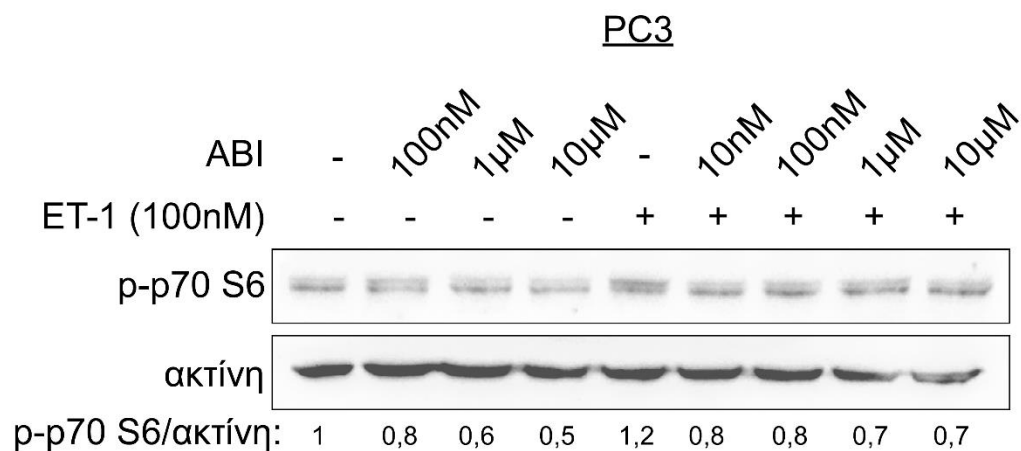


**Εικόνα 24: Επίδραση της αμπερατερόνης (ABI) παρουσία ή απουσία ενδοθηλίνης-1 (ET-1) στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt.** Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι την p-Akt και την Akt ολικού εκχυλίσματος κυττάρων LnCaP και PC3 που επώαστηκαν με αμπερατερόνη 10 nM, 100 nM, 1 μM και 10 μM παρουσία ή απουσία ET-1 100 nM για 24 ώρες. Οι τιμές κάτω από τις διαδρομές παρουσιάζουν

το λόγο p-Akt/Akt, εκφρασμένο σε σχέση με τη συνθήκη χωρίς επίδραση. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.



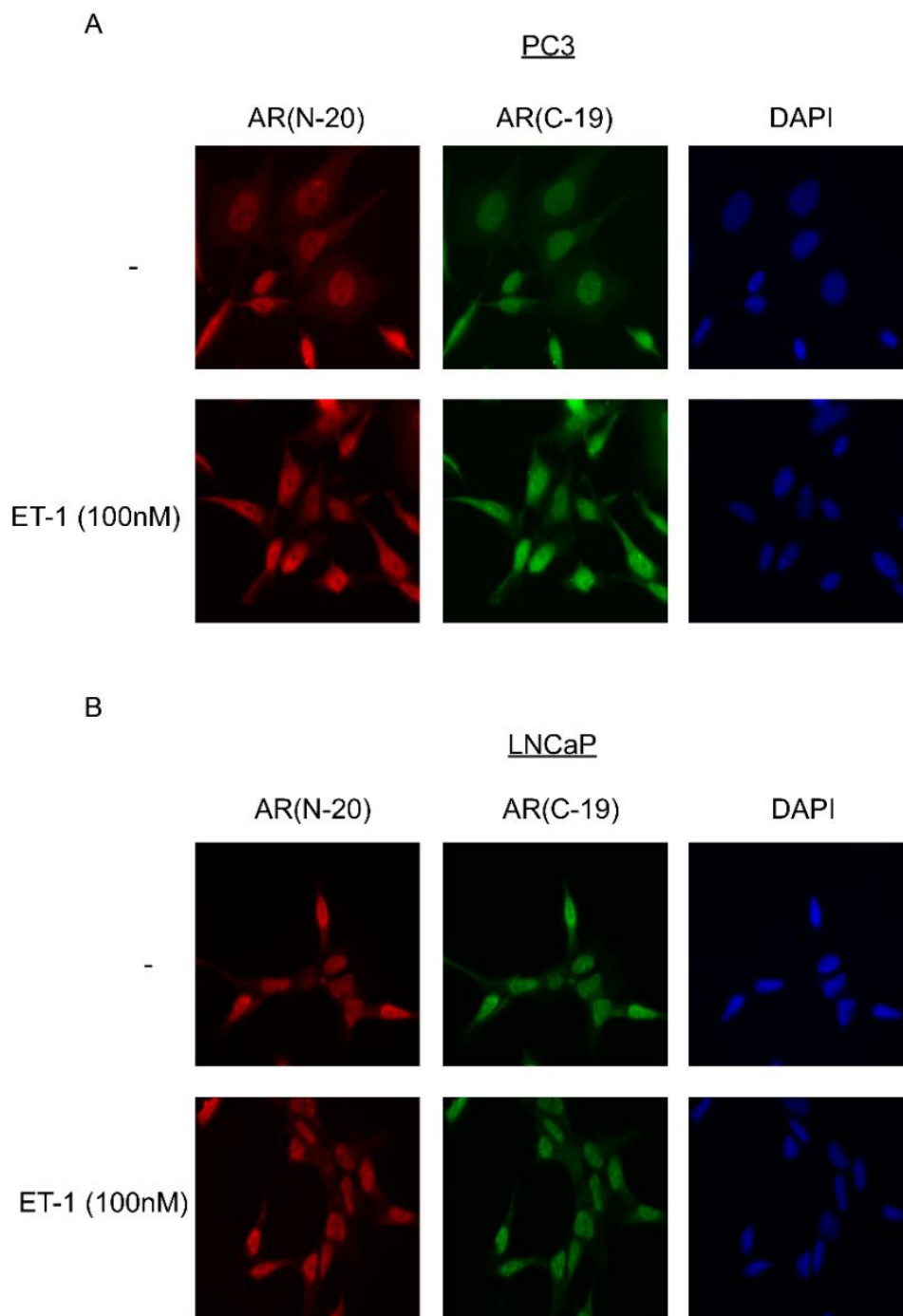
**Εικόνα 25: Επίδραση της αμπιρατερόνης (ABI) παρουσία ή απουσία ενδοθηλίνης-1 (ET-1) στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt.** Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι την p-S6RP και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων LncAP και PC3 που επωάστηκαν με αμπιρατερόνη 10nM, 100nM, 1μM και 10μM παρουσία ή απουσία ET-1 100 nM για 24 ώρες. Οι τιμές κάτω από τις διαδρομές παρουσιάζουν το λόγο p-S6RP/ακτίνη, εκφρασμένο σε σχέση με τη συνθήκη χωρίς επίδραση. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.



**Εικόνα 26: Επίδραση της αμπιρατερόνης (ABI) παρουσία ή απουσία ενδοθηλίνης-1 (ET-1) στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt.** Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι την p-p70S6 και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων PC3 και LNCaP που επωάστηκαν με αμπιρατερόνη 10nM, 100nM, 1μM και 10μM παρουσία ή απουσία ET-1 100 nM για 24 ώρες. Οι τιμές κάτω από τις διαδρομές παρουσιάζουν το λόγο p- p70S6/ακτίνη, εκφρασμένο σε σχέση με τη συνθήκη χωρίς επίδραση. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

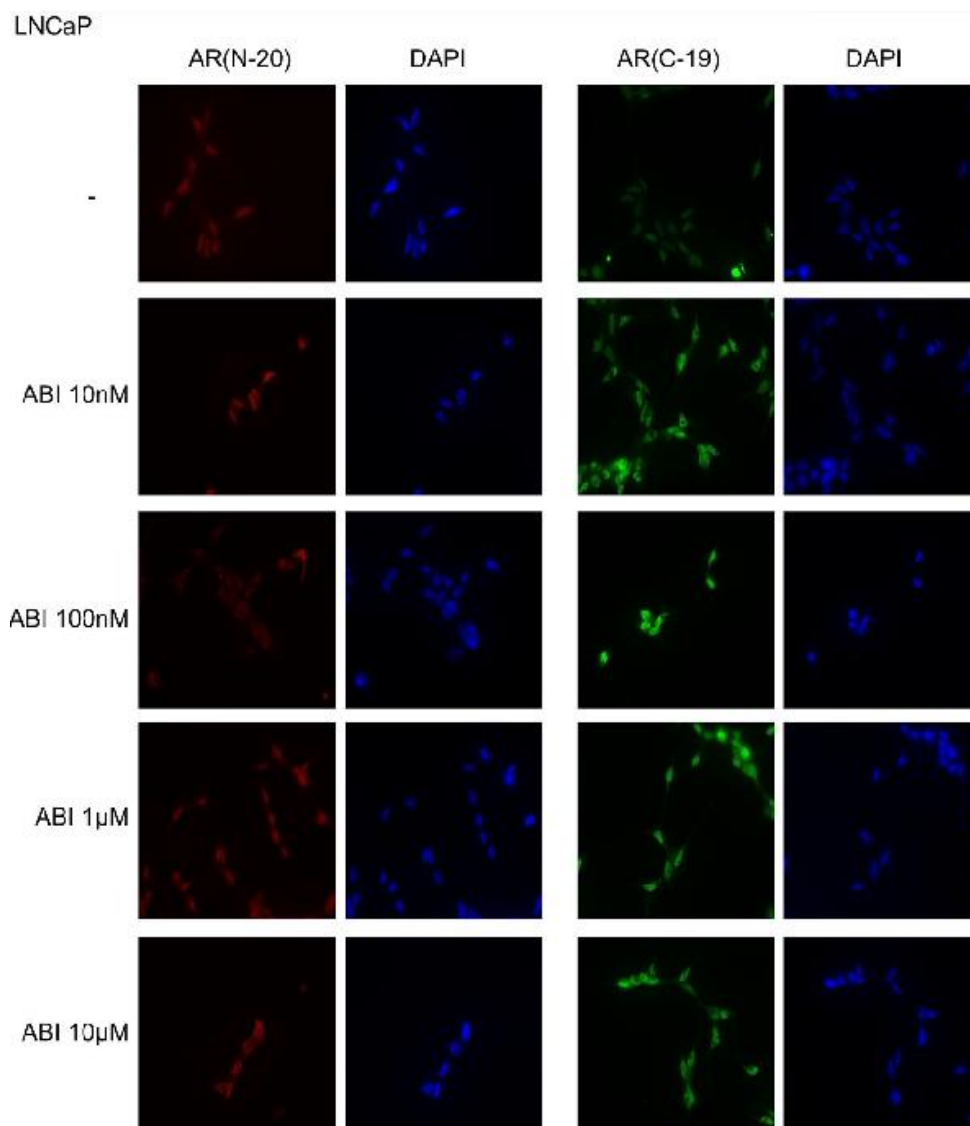
#### **4.1.5 Έλεγχος της επίδρασης της ET-1 και της αμπιρατερόνης στην μετακίνηση του ανδρογονικού υποδοχέα (AR) στο εσωτερικό των κυττάρων PC3 και LNCaP.**

Η συνέχεια της έρευνας περιλαμβάνει τη μελέτη της επίδρασης της ET-1 και της αμπιρατερόνης στο μηχανισμό μετακίνησης του ανδρογονικού υποδοχέα στο εσωτερικό των κυττάρων που μελετήθηκαν. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο ανδρογονικός υποδοχέας και πιο συγκεκριμένα η μετακίνηση του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στην προαγωγή της ενδοκυττάριας στεροειδογένεσης. Μελέτες επίσης αναφέρουν ότι εναλλακτικά με τη μετακίνηση ολόκληρου του υποδοχέα μπορεί να μετακινηθεί και τμήμα αυτού το οποίο μπορεί να περιλαμβάνει είτε το ένα (C-terminus) είτε το άλλο (N-terminus) άκρο της πρωτεΐνης του ανδρογονικού υποδοχέα. Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε μέσω ανοσοφθορισμού, η κυτταρική εντόπιση των δύο άκρων του κυτταρικού υποδοχέα παρουσία και απουσία ET-1 ή αμπιρατερόνης στις κυτταρικές σειρές PC3 και LNCaP. Αναλυτικότερα και όπως βλέπουμε στα αποτελέσματα που ακολουθούν στις εικόνες 27 και 28 η επώαση των κυττάρων PC3 και LNCaP με ET-1 δεν επέφερε κάποια αλλαγή στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ανδρογονικού υποδοχέα ο οποίος ακόμη και πριν την επώαση με την ET-1 φαίνεται εντοπισμένος πυρηνικά σε μεγαλύτερο βαθμό απ'οτι στο κυτταρόπλασμα γεγονός που αιτιολογείται από την καρκινική φύση των κυττάρων. Όμοια και η χορήγηση αμπιρατερόνης δεν μετέβαλλε τον κυτταρικό εντοπισμό του πυρηνικού υποδοχέα σε οποιαδήποτε συγκέντρωση και αν χορηγήθηκε στα κύτταρα LNCaP (Εικόνα 28)



**Εικόνα 27: Επίδραση της ενδοθηλίνης-1 (ET-1) στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ανδρογονικού υποδοχέα (AR) σε κύτταρα PC3 και LNCaP.** Ανοσοφθορισμός με αντίσωματα έναντι του ανδρογονικού υποδοχέα AR του αμινοτελικού άκρου (N-20) ή του καρβοξυτελικού άκρου (C-19) κύτταρα (A) PC3 και (B) LNCaP, που επώαστηκαν με ενδοθηλίνη-1 (ET-1) 100 nM για 24 ώρες. Για τη χρώση του DNA

χρησιμοποιήθηκε DAPI ώστε οι πυρήνες να φαίνονται με μπλε χρώμα. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.



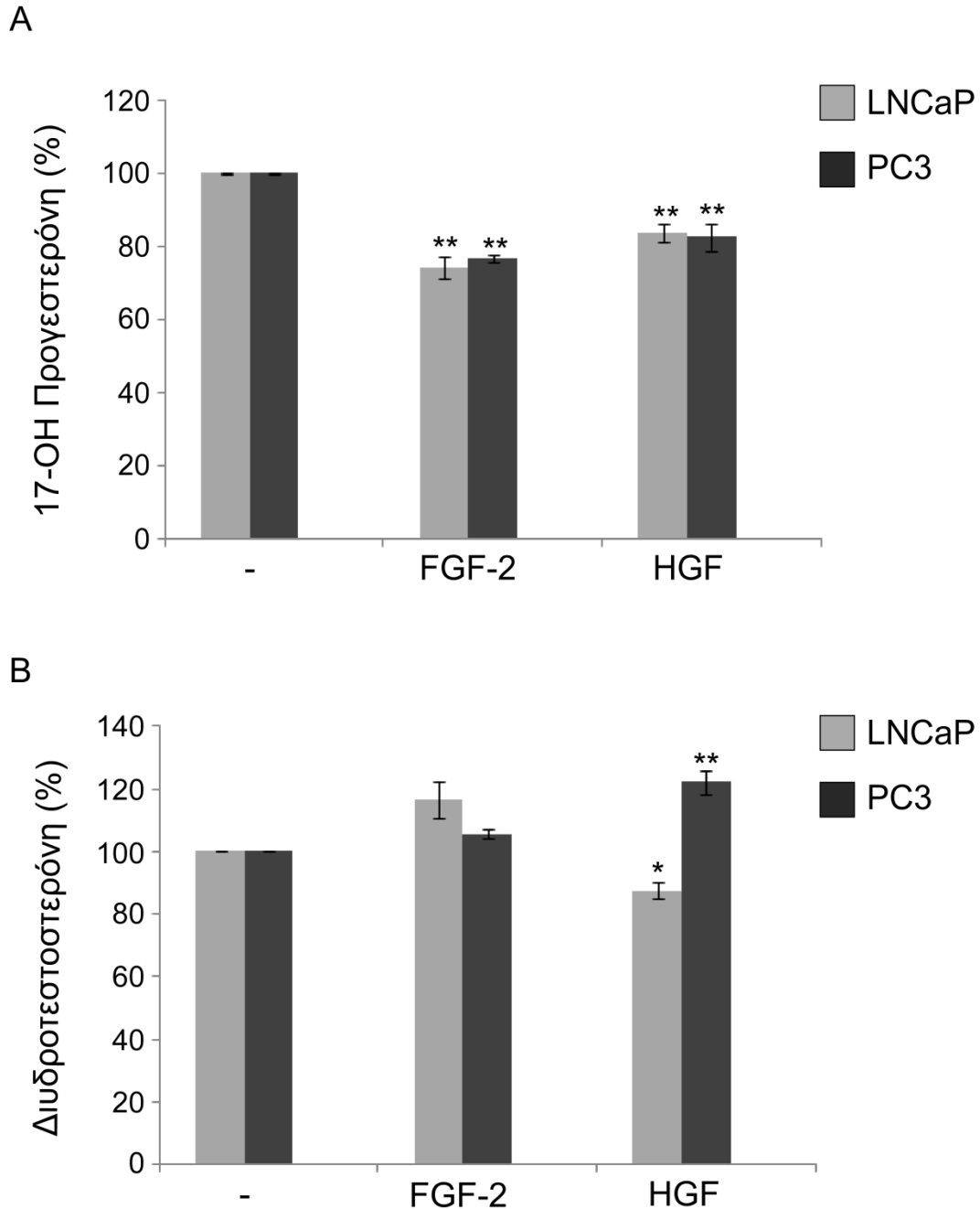
**Εικόνα 28:** Επίδραση της αμπιρατερόνης (ABI) στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ανδρογονικού υποδοχέα (AR) σε κύτταρα PC3 και LNCaP. Ανοσοφθορισμός με αντίσωματα έναντι του ανδρογονικού υποδοχέα AR του αμινοτελικού άκρου (N-20) ή του καρβοξυτελικού άκρου (C-19) κύτταρα LNCaP, που

επωάστηκαν με αμπιρατερόνη (ABI) συγκεντρώσεων 10nM, 100nM, 1μM, 10μM για 24 ώρες. Για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε DAPI ώστε οι πυρήνες να φαίνονται με μπλε χρώμα. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

## **4.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ FGF-2 ΚΑΙ HGF ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΜΠΙΡΑΤΕΡΟΝΗ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ PC3 ΚΑΙ LNCaP**

### **4.2.1 Η επίδραση του FGF-2 και του HGF στη στεροειδογένεση σε κύτταρα PC3 και LNCaP.**

Το δεύτερο μέρος της έρευνας περιλαμβάνει τη μελέτη της επίδρασης των αυξητικών παραγόντων FGF-2 και HGF καθώς και της ταυτόχρονης επίδρασής τους με την αμπιρατερόνη στην ενδοκυττάρια στεροειδογένεση των καρκινικών προστατικών κυττάρων PC3 και LNCaP. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η χορήγηση FGF-2 οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων της 17-OH προγεστερόνης κατά 26% στα κύτταρα LNCaP και κατά 23% στα κύτταρα PC3 (Εικόνα 29A). Όμοια η καλλιέργεια των κυττάρων με HGF προκάλεσε μία μείωση της τάξης του 16% στα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης στα κύτταρα LNCaP και 17,5% στα PC3 (Εικόνα 29A). Η επίδραση του παράγοντα FGF-2 στα ενδοκυττάρια επίπεδα διδροτεστοστερόνης αναλύθηκε επίσης και έδειξε μία μη σημαντική αύξηση στα ενδοκυττάρια επίπεδα διδροτεστοστερόνης στα κύτταρα LNCaP, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στα κύτταρα PC3 (Εικόνα 29B) σε σχέση με τα κύτταρα που δεν είχαν υποστεί καμία επίδραση. Η χορήγηση HGF αντίστοιχα ελαφρώς μείωσε τα επίπεδα διδροτεστοστερόνης στα κύτταρα LNCaP, ενώ αύξησε στατιστικά σημαντικά κατά 22% τα ενδοκυττάρια επίπεδα διδροτεστοστερόνης στα κύτταρα PC3 (Εικόνα 29B).



**Εικόνα 29: Επίδραση των FGF-2 και HGF στα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης και διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα LNCaP και PC3.** Προσδιορισμός των επιπέδων της ενδοκυττάριας (A) 17-OH προγεστερόνης και (B) διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα LNCaP και PC3 μετά από επίδραση FGF-2 (10 ng/ml) ή HGF (33,3 ng/ml) για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό των επιπέδων 17-OH προγεστερόνης ή διυδροτεστοστερόνης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους

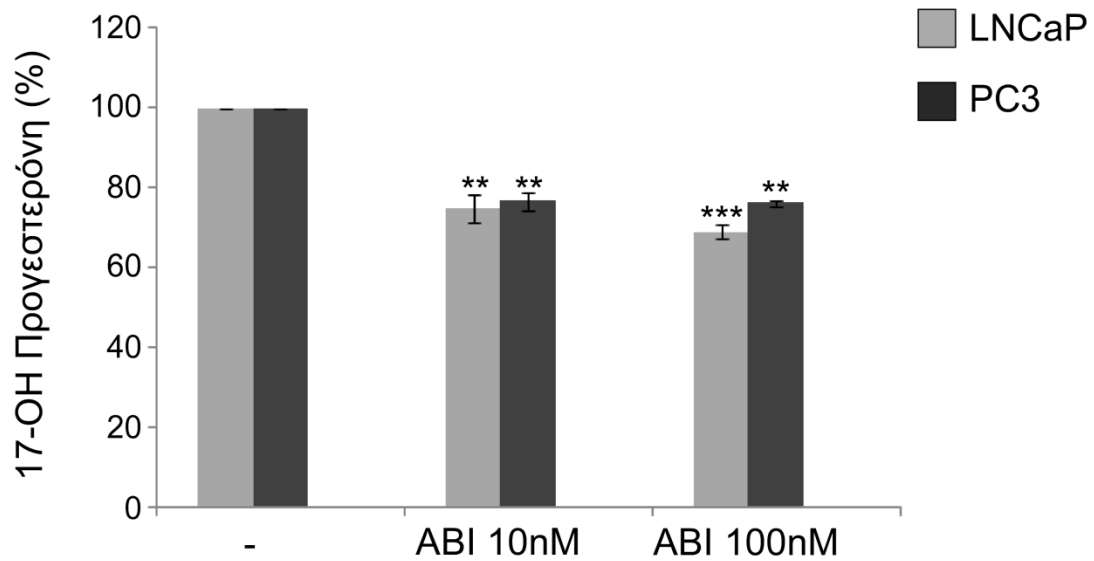


μέσους όρους 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*\* P<0,01, \*P<0,05- σε σχέση με το δείγμα ελέγχου).

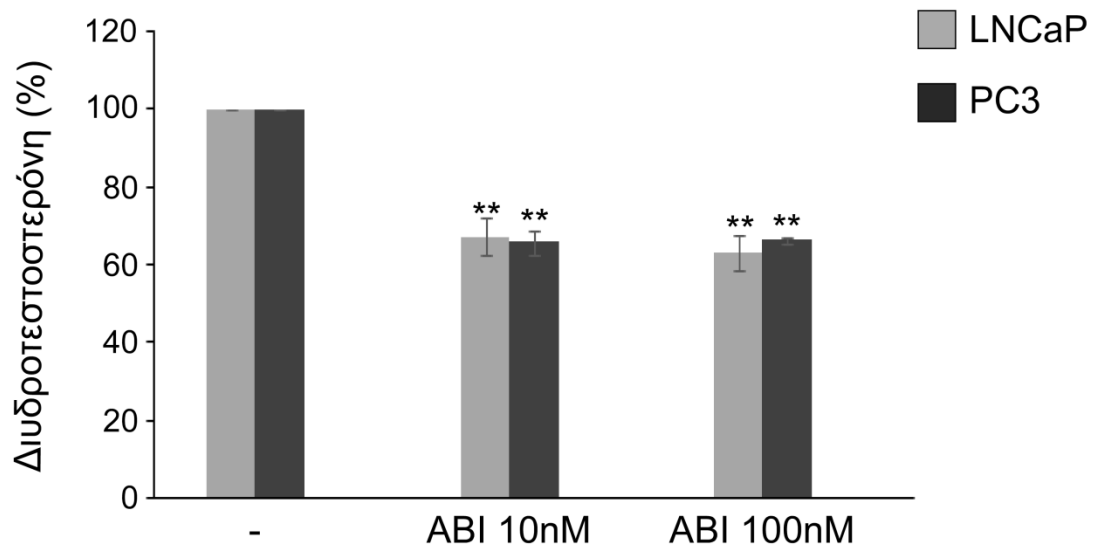
#### **4.2.2 Μελέτη του FGF-2 ως μηχανισμός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης σε κύτταρα PC3 και LNCaP**

Η συνέχεια της έρευνας περιλαμβάνει τη μελέτη του κάθε παράγοντα ξεχωριστά σε συνδυασμό με την αμπιρατερόνη προκειμένου να μελετηθεί αν δρα σαν οδός διαφυγής στη δράση του φαρμάκου. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε με τον παράγοντα FGF-2 μόνο (βλέπε 3.2.1) είτε με την αμπιρατερόνη μόνο είτε και με τον συνδυασμό των δύο ουσιών. Στο τέλος μετρήθηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης και διδροτεστοστερόνης. Τα κύτταρα LNCaP και τα PC3 καλλιεργήθηκαν με αμπιρατερόνη συγκεντρώσεων 10 nM και 100 nM για 24 ώρες. Η καλλιέργεια των κυττάρων με 10 nM αμπιρατερόνης προκάλεσε μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων 17-OH προγεστερόνης κατά 25% στα κύτταρα LNCaP και 24% στα κύτταρα PC3 (Εικόνα 30A). Επιπλέον, η χορήγηση 10 nM αμπιρατερόνης οδήγησε σε σημαντικότερη στατιστικά μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων διδροτεστοστερόνης κατά 33% στα κύτταρα LNCaP και κατά 35% στα PC3 (Εικόνα 30B). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με υψηλότερη συγκέντρωση 100 nM αμπιρατερόνης η οποία οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων 17-OH προγεστερόνης και διδροτεστοστερόνης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 30B, τα επίπεδα διδροτεστοστερόνης μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά κατά 37% στα κύτταρα LNCaP και 33,5% στα κύτταρα PC3.

A



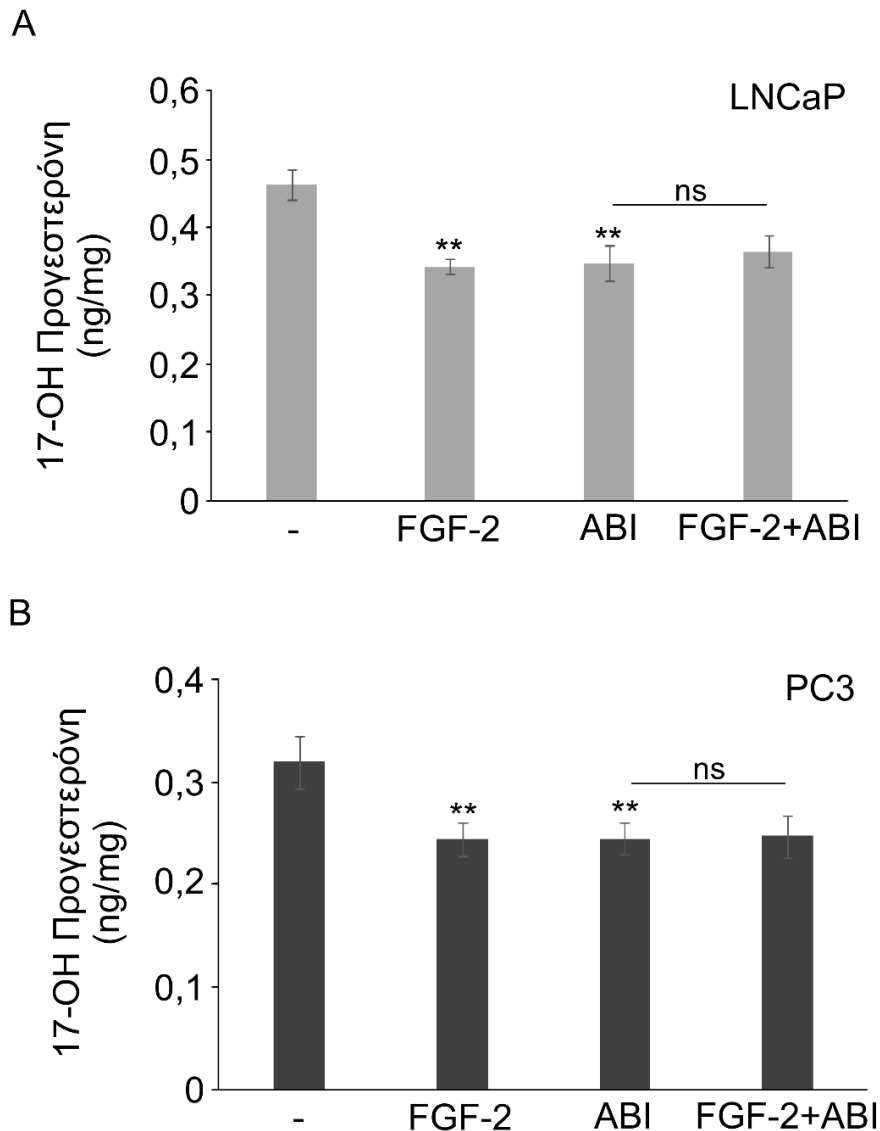
B



**Εικόνα 30: Επίδραση της αμπιρατερόνης (ABI) στα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης και διδροτεστοστερόνης σε κύτταρα LNCaP και PC3.** Προσδιορισμός των επιπέδων της ενδοκυττάριας (A) 17-OH προγεστερόνης και (B) διδροτεστοστερόνης σε κύτταρα LNCaP και PC3 μετά από επίδραση αμπιρατερόνης (ABI) (10 και 100 nM) για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό των επιπέδων 17-OH προγεστερόνης ή διδροτεστοστερόνης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και

αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*\* $P < 0,005$ , \*\* $P < 0,01$ - σε σχέση με το δείγμα ελέγχου).

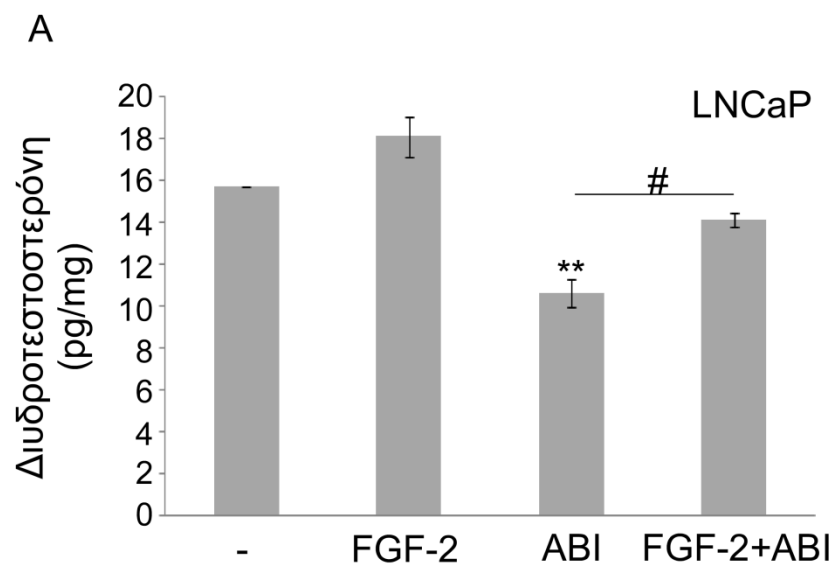
Η συγχορήγηση αμπιρατερόνης και FGF-2 δεν είχε καμία επίδραση στα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης στα κύτταρα LNCaP και PC3 συγκριτικά με αυτά στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο αμπιρατερόνη (Εικόνα 31).

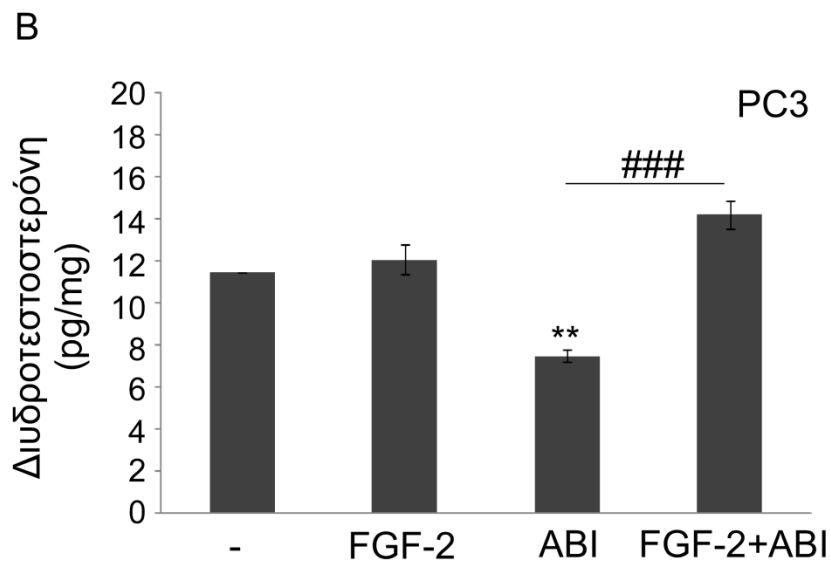


**Εικόνα 31: Επίδραση του FGF-2 και της αμπιρατερόνης (ABI) στα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης σε κύτταρα LNCaP και PC3.** Προσδιορισμός των επιπέδων της ενδοκυττάριας 17-OH προγεστερόνης σε κύτταρα (A) LNCaP και (B) PC3 μετά από επίδραση FGF-2 (10 ng/ml) ή/και

αμπιρατερόνης (ABI) συγκέντρωσης 10nM για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ng 17-OH προγεστερόνης ανά mg ολικής πρωτεΐνης των κυττάρων και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*\* $P < 0,005$ , \*\* $P < 0,01$  - σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, ns: not significant).

Στα κύτταρα LNCaP η προσθήκη FGF-2 σε κύτταρα που βρίσκονταν ήδη υπό την επίδραση αμπιρατερόνης οδήγησε σε μία στατιστικά σημαντική αύξηση της τάξης του 23% στα επίπεδα διδροτεστοστερόνης ενώ στα κύτταρα PC3 τα επίπεδα διδροτεστοστερόνης αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά κατά 60% σε σχέση με τα κύτταρα που βρίσκονταν μόνο υπό την επίδραση αμπιρατερόνης (Εικόνα 32, A και B αντίστοιχα).





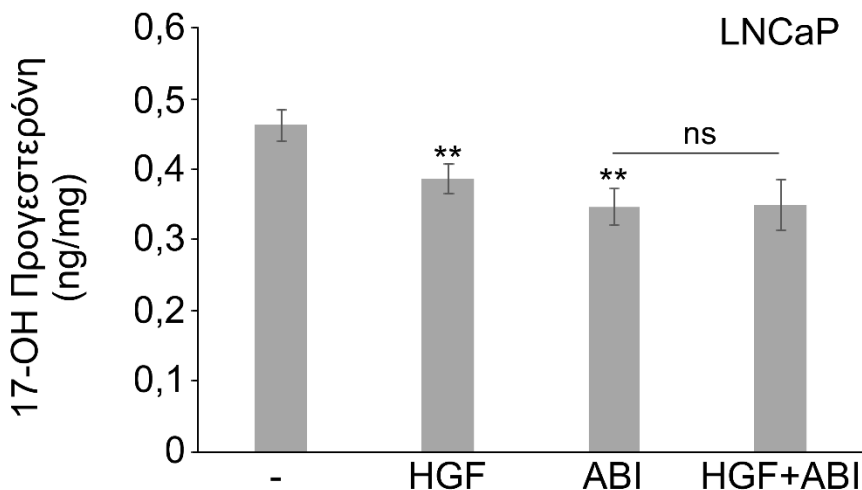
**Εικόνα 32: Επίδραση του FGF-2 και της αμπιρατερόνης (ABI) στα ενδοκυττάρια επίπεδα διδροτεστοστερόνης σε κύτταρα LNCaP και PC3.** Προσδιορισμός των επιπέδων της ενδοκυττάριας διδροτεστοστερόνης σε κύτταρα (A) LNCaP και (B) PC3 μετά από επίδραση FGF-2 (10 ng/ml) ή/και αμπιρατερόνης (ABI) συγκέντρωσης 10nM για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ng διδροτεστοστερόνης ανά mg ολικής πρωτεΐνης των κυττάρων και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*\* P<0,01- σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, ### P<0,005, # P<0,05).

#### 4.2.3 Μελέτη του HGF ως μηχανισμός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης σε κύτταρα PC3 και LNCaP

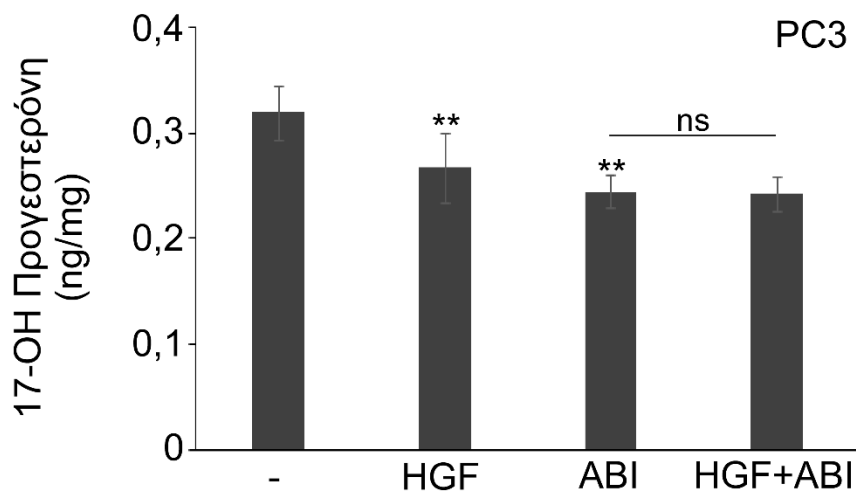
Ο αυξητικός παράγοντας HGF, δρώντας με παρόμοιο τρόπο όπως ο HGF, όταν συγχρηγήθηκε με αμπιρατερόνη δεν επηρέασε τα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης σε καμία από τις δύο κυτταροσειρές συγκριτικά με τα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο αμπιρατερόνη απουσία του παράγοντα (Εικόνα 33). Παρόλα αυτά η προσθήκη HGF είχε επίδραση στα ενδοκυττάρια επίπεδα διδροτεστοστερόνης. Πιο συγκεκριμένα, στα κύτταρα LNCaP η προσθήκη HGF αύξησε τα ενδοκυττάρια επίπεδα διδροτεστοστερόνης κατά 41% (Εικόνα 34A)

και στα κύτταρα PC3 κατά 57% συγκριτικά με τα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο αμπιρατερόνη (Εικόνα 34B).

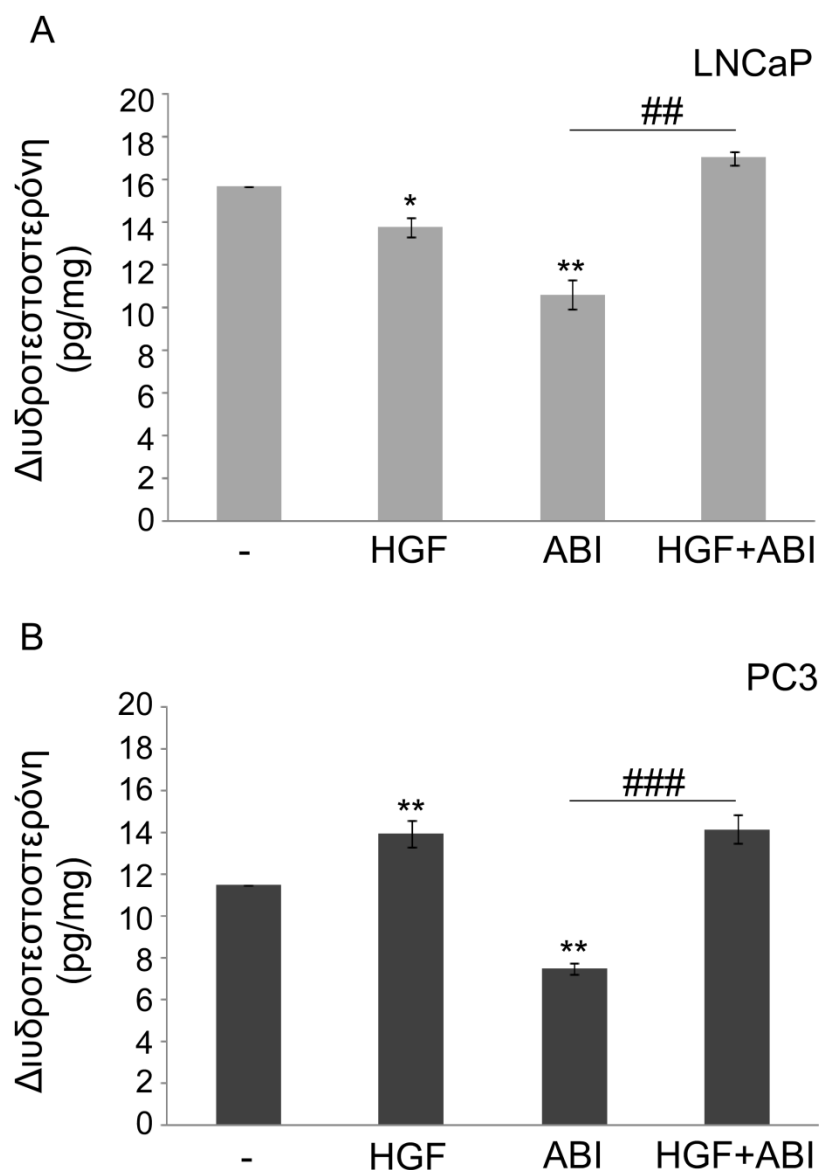
A



B



**Εικόνα 33: Επίδραση του HGF και της αμπιρατερόνης (ABI) στα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης σε κύτταρα LNCaP και PC3.** Προσδιορισμός των επιπέδων της ενδοκυττάριας 17-OH προγεστερόνης σε κύτταρα (A) LNCaP και (B) PC3 μετά από επίδραση HGF (33,3 ng/ml) ή/και αμπιρατερόνης συγκέντρωσης 10nM για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ng 17-OH προγεστερόνης ανά mg ολικής πρωτεΐνης των κυττάρων και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα ( \*\* P<0,01- σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, ns: not significant).

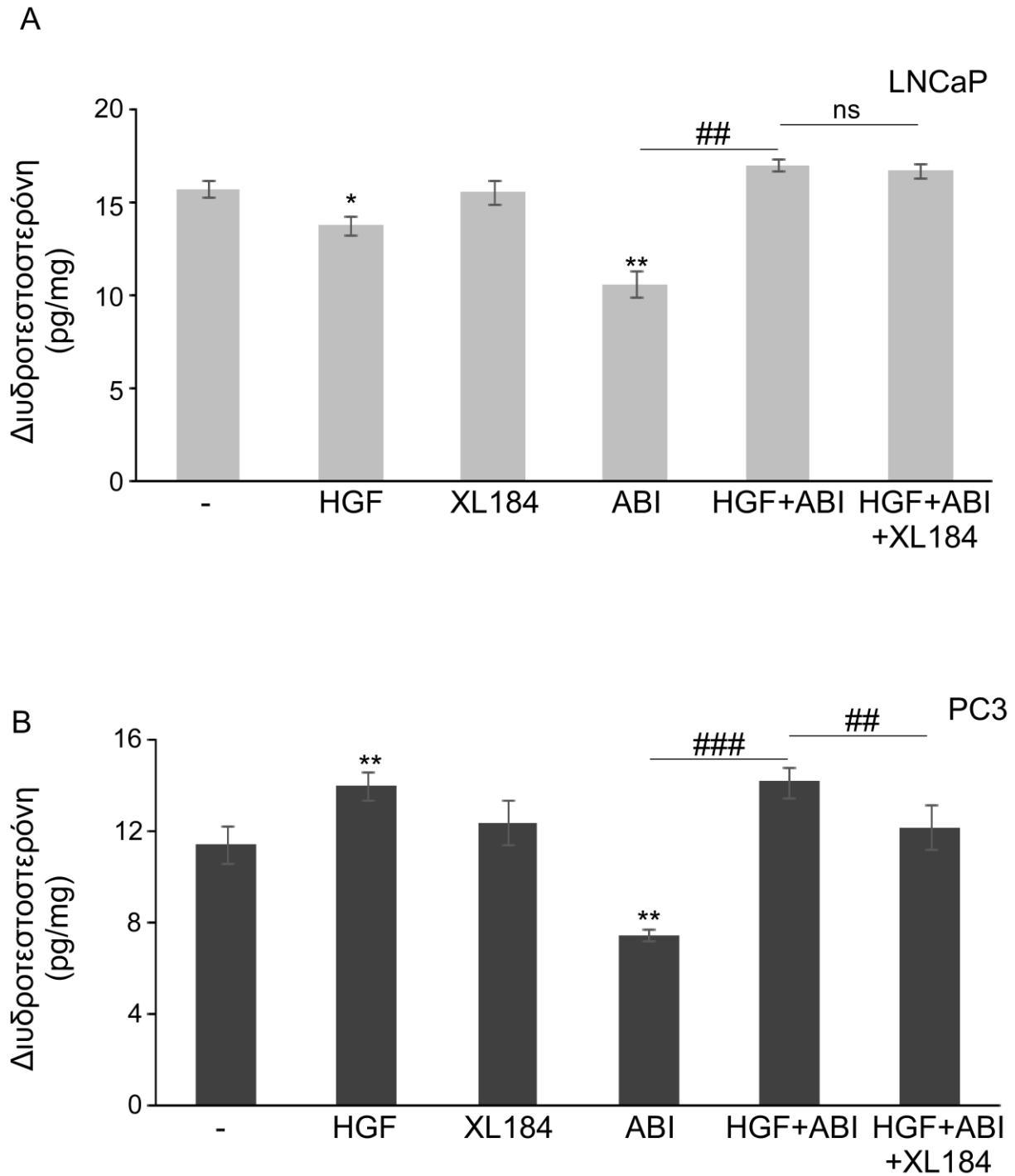


**Εικόνα 34: Επίδραση του HGF και της αμπατερόνης (ABI) στα ενδοκυττάρια επίπεδα διδροτεστοστερόνης σε κύτταρα LNCaP και PC3.** Προσδιορισμός των επιπέδων της ενδοκυττάριας διδροτεστοστερόνης σε κύτταρα (A) LNCaP και (B) PC3 μετά από επίδραση HGF (33,3 ng/ml) ή/και αμπατερόνης συγκέντρωσης 10nM για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ng διδροτεστοστερόνης ανά mg ολικής πρωτεΐνης των κυττάρων και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*\* P<0,01, \* P<0,05- σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, ### P<0,005, ## P<0,01).

Η αναίρεση της κατασταλτικής δράσης της αμπιρατερόνης μετά την προσθήκη HGF επαληθεύει την υποψία μας ότι ο αυξητικός παράγοντας HGF μπορεί να λειτουργεί σαν οδός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης. Ωστόσο για τελική επιβεβαίωση της δράσης του HGF έγινε συγχορήγηση HGF, αμπιρατερόνης και του αναστολέα XL184, ο οποίος εμποδίζει τη δράση του HGF. Αναλυτικότερα, ο αναστολέας XL184 προσδένεται στον υποδοχέα c-Met ο οποίος αποτελεί τον υποδοχέα με τη μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης για τον παράγοντα HGF. Θεωρητικά αν η οδός που ακολουθεί ο αυξητικός παράγοντας HGF είναι οδός διαφυγής, η αναστολή της δράσης του θα πρέπει να επαναφέρει την κατασταλτική δράση της αμπιρατερόνης.

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του αναστολέα XL184 στις κυτταρικές σειρές PC3 και LNCaP. Η χορήγηση του αναστολέα XL184 δε μετέβαλε τα επίπεδα DHT και στις δύο κυτταροσειρές. Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του αναστολέα στα επίπεδα DHT συγχορηγούμενου με HGF και αμπιρατερόνη και έγινε σύγκριση της δράσης σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο HGF και αμπιρατερόνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα LNCaP κύτταρα η προσθήκη του αναστολέα δεν μετέβαλε τα επίπεδα DHT σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί HGF και αμπιρατερόνη (Εικόνα 35Α). Επιπλέον στα PC3 κύτταρα η προσθήκη του αναστολέα μείωσε στατιστικά σημαντικά τα ενδοκυττάρια επίπεδα DHT συγκριτικά με τα κύτταρα τα οποία είχαν καλλιεργηθεί με HGF και αμπιρατερόνη μόνο. Αυτή η μείωση των επιπέδων DHT στα κύτταρα PC3 ενισχύει την υπόθεση για ύπαρξη οδού διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης μέσω c-Met στα PC3 κύτταρα.



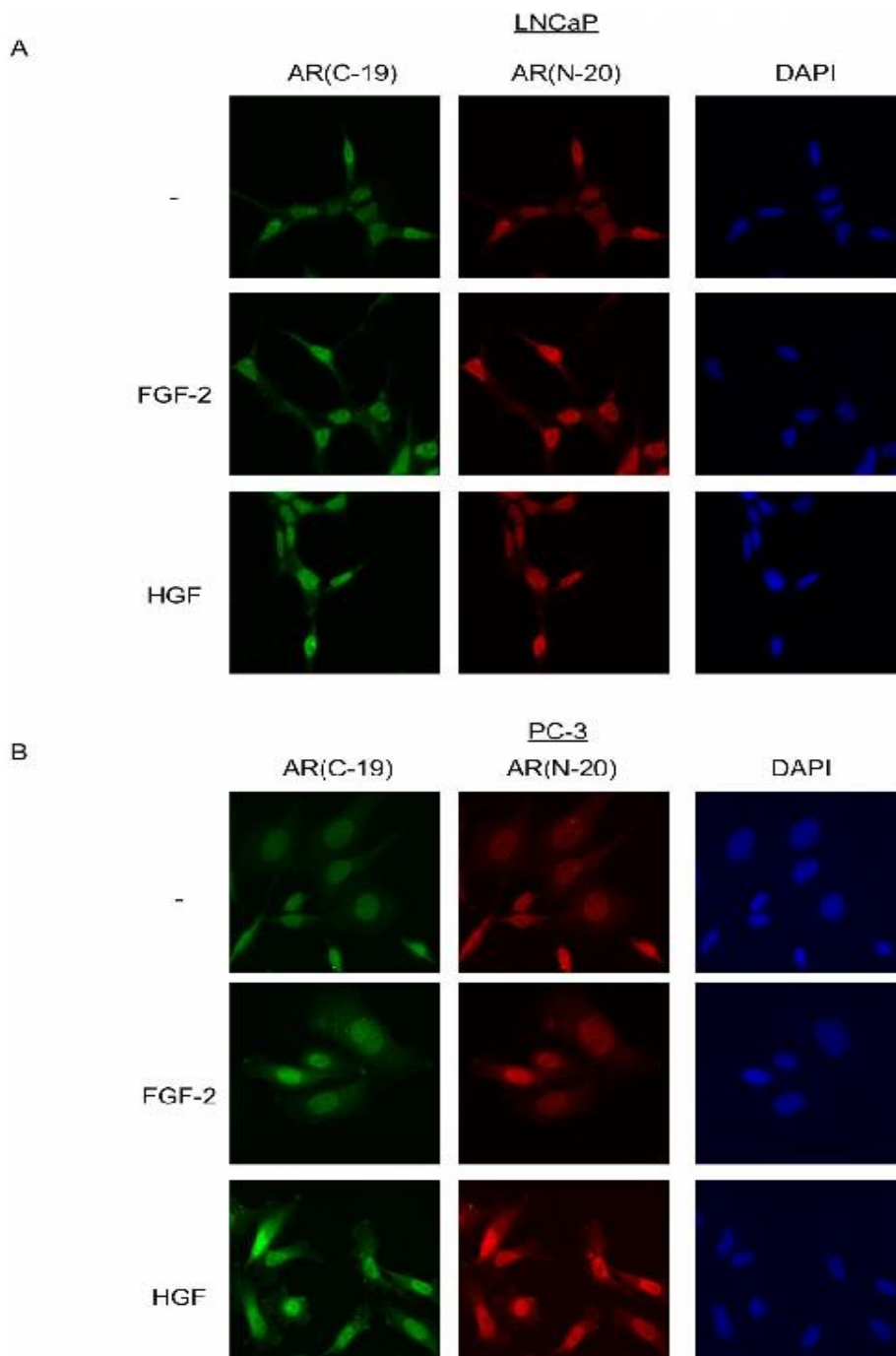


**Εικόνα 35: Επίδραση των HGF, XL184 και της αμπιρατερόνης (ABI) στα ενδοκυττάρια επίπεδα διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα LNCaP και PC3.** Προσδιορισμός των επιπέδων της ενδοκυττάριας διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα (A) LNCaP και (B) PC3 μετά από επίδραση HGF (33,3 ng/ml), του αναστολέα XL184 (500nM) ή/και αμπιρατερόνης συγκέντρωσης 10nM για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ng διυδροτεστοστερόνης ανά mg ολικής πρωτεΐνης των κυττάρων και

αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*\*  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,05$ - σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, ###  $P < 0,005$ , ##  $P < 0,01$  ns: not significant).

#### **4.2.4 Έλεγχος της επίδρασης των αυξητικών παραγόντων FGF-2 και HGF στην μετακίνηση του ανδρογονικού υποδοχέα (AR) στο εσωτερικό των κυττάρων PC3 και LNCaP.**

Η συνέχεια της έρευνας περιλαμβάνει τη μελέτη της επίδρασης του FGF-2 και HGF στο μηχανισμό μετακίνησης του ανδρογονικού υποδοχέα στο εσωτερικό των κυττάρων που μελετήθηκαν. Όπως ήδη έχει αναφερθεί η πυρηνική μετατόπιση ολόκληρου του υποδοχέα ή τμήματος αυτού το οποίο μπορεί να περιλαμβάνει είτε το ένα (C-terminus) είτε το άλλο (N-terminus) άκρο της πρωτεΐνης του υποδοχέα εμπλέκεται στην προαγωγή της στεροειδογένεσης στα κύτταρα. Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε μέσω ανοσοφθορισμού, η κυτταρική εντόπιση των δύο άκρων του κυτταρικού υποδοχέα παρουσία και απουσία FGF-2 και HGF στις κυτταρικές σειρές PC3 και LNCaP. Αναλυτικότερα και όπως βλέπουμε στα αποτελέσματα που ακολουθούν στην εικόνα 36 η επώαση των κυττάρων PC3 και LNCaP με FGF-2 ή HGF δεν επέφερε κάποια αλλαγή στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ανδρογονικού υποδοχέα ο οποίος ακόμη και πριν την επώαση με τους ενεργοποιητές φαίνεται εντοπισμένος πυρηνικά σε μεγαλύτερο βαθμό απ'οτι στο κυτταρόπλασμα γεγονός που ενδεχομένως δικαιολογείται από την καρκινική φύση των κυττάρων.



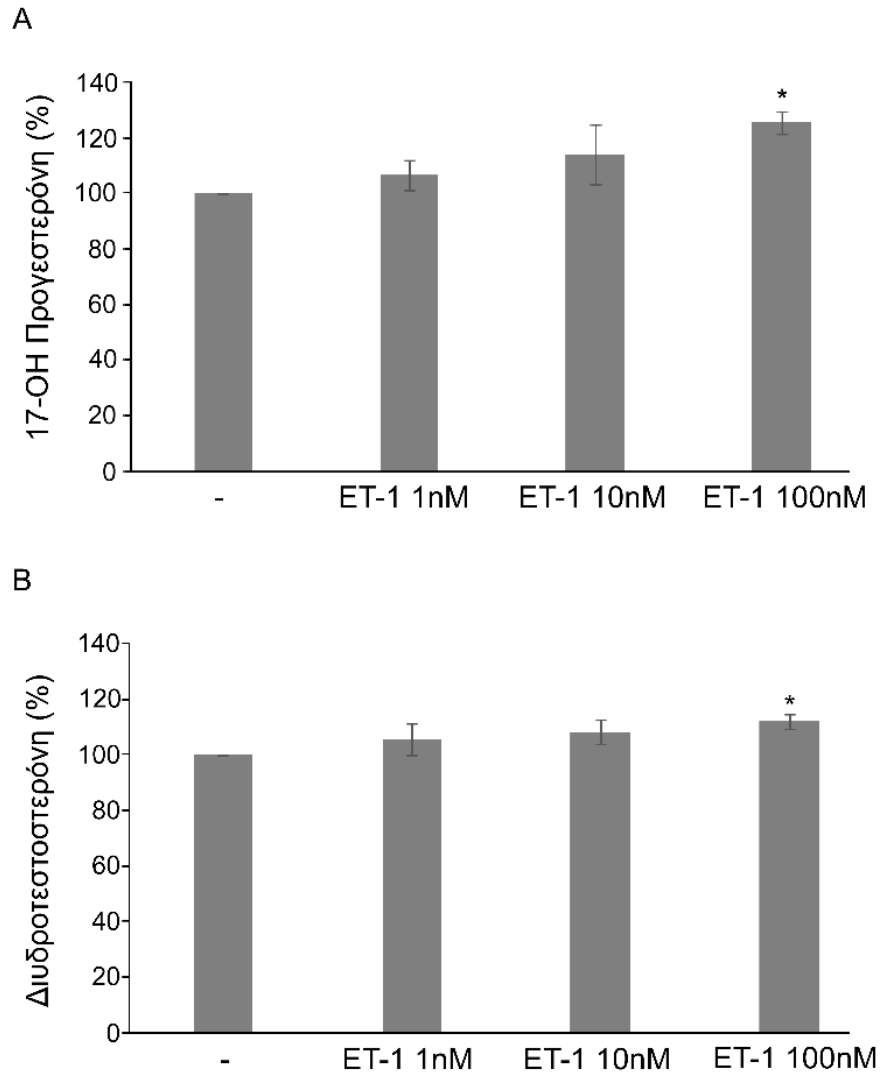
**Εικόνα 36: Επίδραση των παραγόντων FGF-2 και HGF στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ανδρογονικού υποδοχέα (AR) σε κύτταρα PC3 και LNCaP.** Ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι του ανδρογονικού υποδοχέα AR του αμινοτελικού άκρου (N-20) ή του καρβοξυτελικού άκρου (C-19) κύτταρα (A) LNCaP και (B) PC3, που επωάστηκαν με FGF-2 (10 ng/ml) ή HGF (33,3 ng/ml) για 24 ώρες. Για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε DAPI ώστε οι πυρήνες να φαίνονται με μπλε χρώμα. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

### **4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ET-1, ΤΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ FGF-2 ΚΑΙ HGF ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΜΠΙΡΑΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ VCaP**

#### **4.3.1 Η επίδραση της ενδοθηλίνης-1 στη στεροειδογένεση και τον πολλαπλασιασμό σε κύτταρα VCaP**

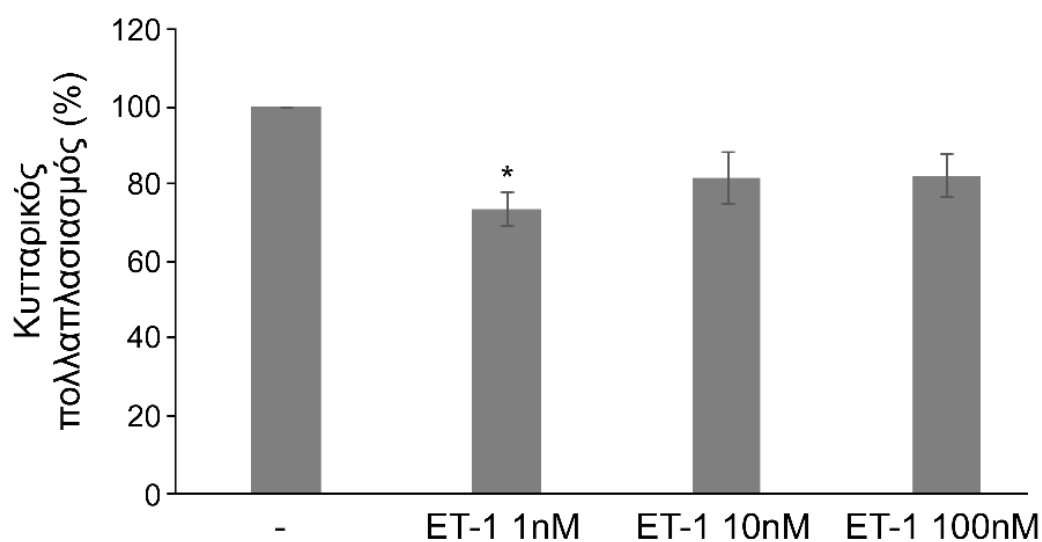
Το τελευταίο μέρος των αποτελεσμάτων της διατριβής περιλαμβάνει τη μελέτη των ουσιών ET-1, FGF-2 και HGF σε συνδυασμό με αμπιρατερόνη στα καρκινικά προστατικά κύτταρα VCaP. Η κυτταρική σειρά VCaP αποτελεί ένα μοντέλο ανδρογono-εξαρτώμενου καρκίνου του προστάτη η οποία φέρει τον άγριο τύπο του ανδρογονικού υποδοχέα. Όλες οι συνθήκες που αναλύθηκαν ως τώρα, εφαρμόστηκαν και στα κύτταρα VCaP με τα παρακάτω αποτελέσματα.

Με σκοπό να ελεγχθεί η επίδραση της ET-1 στη στεροειδογένεση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κύτταρα VCaP καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ενδοθηλίνης και προσδιορίστηκε η ενδοκυττάρια συγκέντρωση 17-OH προγεστερόνης, διυδροτεστοστερόνης καθώς επίσης και ο πολλαπλασιασμός αυτών των κυττάρων. Η χορήγηση ET-1 σε συγκεντρώσεις 1 nM, 10 nM και 100 nM αύξησε τα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης και διυδροτεστοστερόνης με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Η χορήγηση ET-1 100 nM αύξησε στατιστικά σημαντικά κατά 25% τα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης και κατά 12% στα ενδοκυττάρια επίπεδα διυδροτεστοστερόνης (Εικόνα 37 A & B).



**Εικόνα 37: Επίδραση της ενδοθηλίνης-1 (ET-1) στα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης και διδροτεστοστερόνης σε κύτταρα VCaP.** Προσδιορισμός των επιπέδων της ενδοκυττάριας (A) 17-OH προγεστερόνης και (B) διδροτεστοστερόνης σε κύτταρα VCaP μετά από επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ET-1 (1, 10 και 100 nM) για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % των επιπέδων 17-OH προγεστερόνης ή διδροτεστοστερόνης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*  $P < 0,05$ ).

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε ο πολλαπλασιασμός αυτών των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε συγκεντρώσεις ενδοθηλίνης 1 nM, 10nM και 100nM . Κατά τη χορήγηση και των τριών συγκεντρώσεων ET-1 παρουσιάστηκαν μειώσεις στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με μεγαλύτερη και στατιστικά σημαντική μείωση κατά τη χορήγηση ET-1 1 nM όπου ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων μειώθηκε κατά 27% σε σχέση με τα κύτταρα που δεν είχαν υποστεί την επίδραση ET-1 (Εικόνα 38).

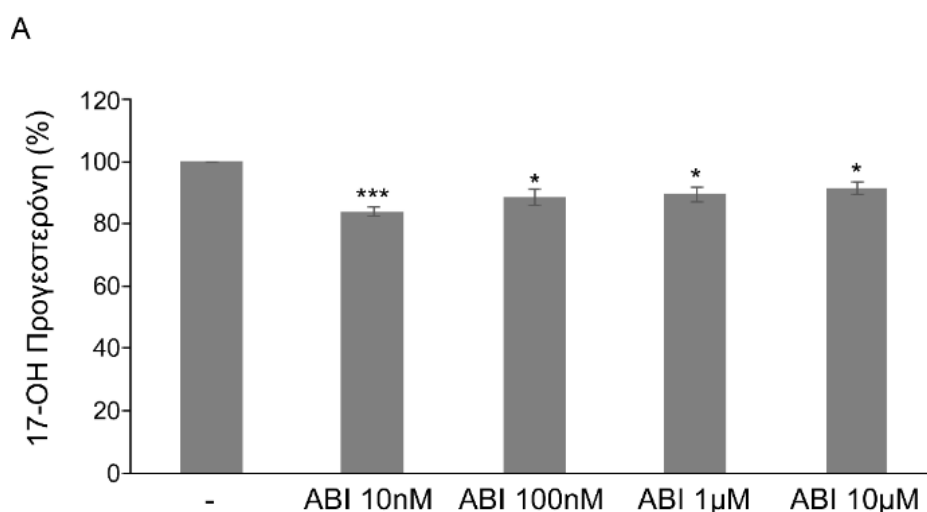


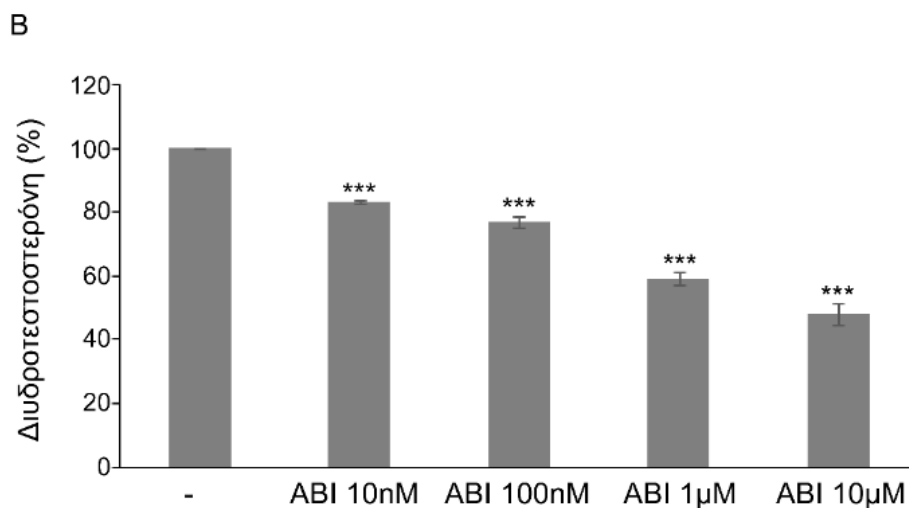
**Εικόνα 38: Επίδραση της ενδοθηλίνης-1 (ET-1) στο πολλαπλασιασμό κυττάρων VCaP.** Προσδιορισμός του πολλαπλασιασμού κυττάρων VCaP μετά από επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ET-1 (1, 10 και 100 nM) για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 3 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\* P<0,05).

#### 4.3.2 Η επίδραση της αμπιρατερόνης στη στεροειδογένεση και τον πολλαπλασιασμό σε κύτταρα VCaP

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων αμπιρατερόνης στα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης, διδροτεστοστερόνης καθώς και του πολλαπλασιασμού στα κύτταρα VCaP. Η χορήγηση αμπιρατερόνης συγκέντρωσης 10nM οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων 17-OH προγεστερόνης κατά 16% στα κύτταρα VCaP. Όταν η συγκέντρωση αμπιρατερόνης αυξήθηκε στα 100 nM, 1 μM και 10 μM, η μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων 17-OH προγεστερόνης ήταν 11%, 10% και 8,5% αντίστοιχα σε σχέση με τα κύτταρα τα οποία δεν είχαν υποστεί την επίδραση αμπιρατερόνης (Εικόνα 39A).

Όσον αφορά τα ενδοκυττάρια επίπεδα διδροτεστοστερόνης, η χορήγηση αμπιρατερόνης όλων των συγκεντρώσεων προκάλεσε στατιστικά σημαντικές μειώσεις με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Αναλυτικότερα, η χορήγηση αμπιρατερόνης 10 nM προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση 17% στα κύτταρα VCaP. Όμοια στατιστικά σημαντική μείωση κατά 24% στα επίπεδα διδροτεστοστερόνης παρατηρήθηκε με χορήγηση αμπιρατερόνης 100 nM όπου η διδροτεστοστερόνη μειώθηκε κατά 24%. Τέλος, η χορήγηση αμπιρατερόνης συγκεντρώσεων 1 μM και 10 μM οδήγησε επίσης σε στατιστικά σημαντικές μειώσεις κατά 40% και 52% αντίστοιχα σε σχέση με τα κύτταρα τα οποία δεν είχαν υποστεί την επίδραση αμπιρατερόνης (Εικόνα 39B).

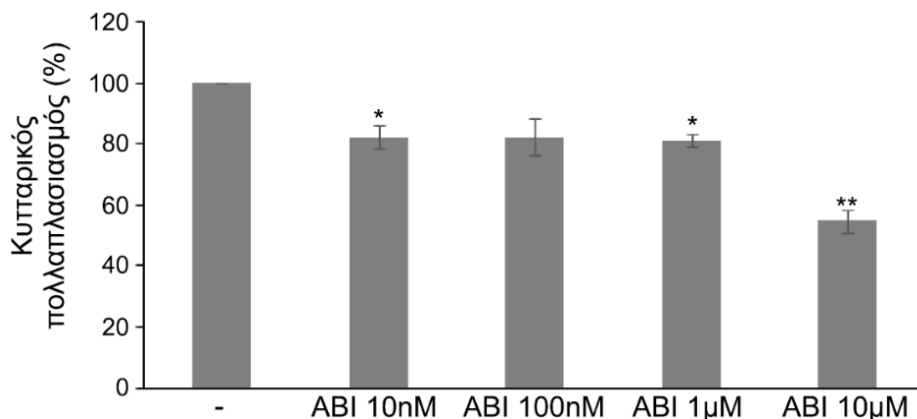




**Εικόνα 39: Επίδραση της αμπιρατερόνης (ABI) στα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης και δι-υδροτεστοστερόνης σε κύτταρα VCaP.** Προσδιορισμός των επιπέδων της ενδοκυττάριας (A) 17-OH προγεστερόνης και (B) διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα VCaP μετά από επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων αμπιρατερόνης (ABI) (10nM , 100nM 1µM και 10µM) για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % των επιπέδων 17-OH προγεστερόνης ή διυδροτεστοστερόνης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*\*\*)  $P < 0,005$ , \* $P < 0,05$ ).

Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι αλλαγές στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων στα οποία χορηγήθηκε αμπιρατερόνη σε συγκεντρώσεις 10 nM, 100 nM, 1 µM και 10 µM. Κατά τη χορήγηση 10 nM ή 100 nM αμπιρατερόνης για 24 ώρες, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων μειώθηκε κατά 18% ενώ με χορήγηση 1 µM αμπιρατερόνης μειώθηκε σημαντικά κατά 19%. Τέλος, η χορήγηση αμπιρατερόνης συγκέντρωσης 10 µM οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση κατά 46% στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Εικόνα 40).





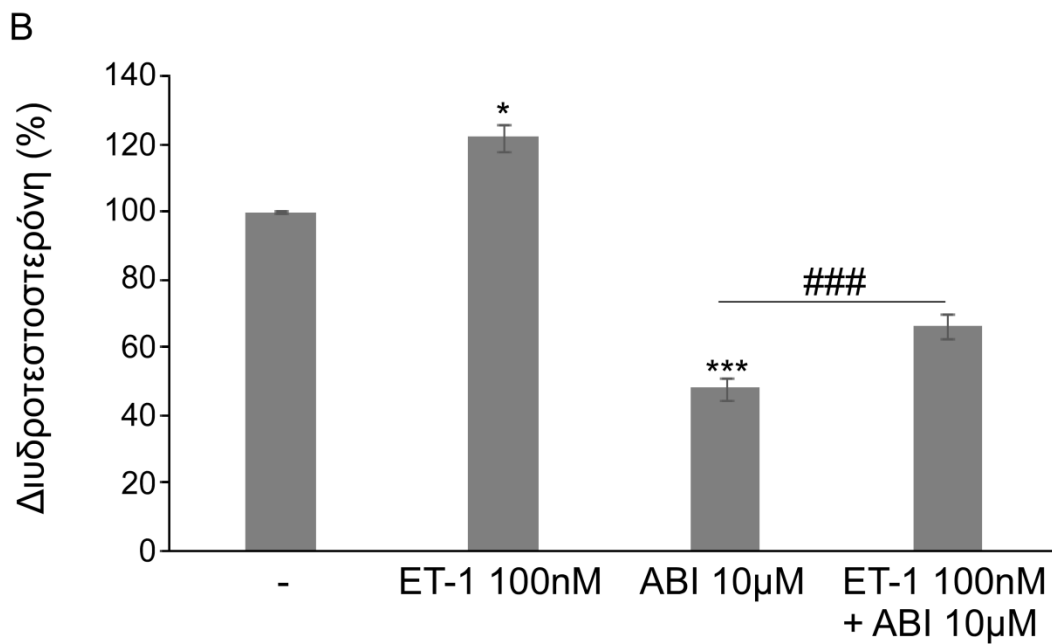
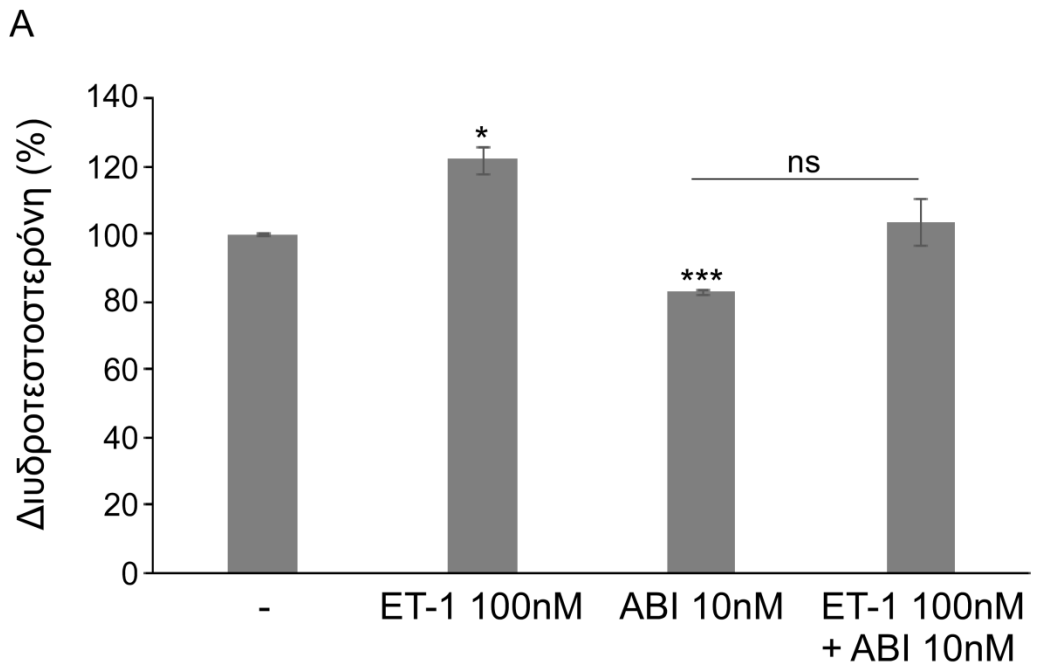
**Εικόνα 40: Επίδραση της αμπιρατερόνης (ABI) στο πολλαπλασιασμό κυττάρων VCaP.** Προσδιορισμός του πολλαπλασιασμού κυττάρων VCaP μετά από επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων αμπιρατερόνης ABI (10nM , 100nM 1μM και 10μM) για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 3 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα ( \*\* P<0,01, \*P<0,05).

#### 4.3.3 Μελέτη της ET-1 ως μηχανισμός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης σε κύτταρα VCaP.

Στη συνέχεια, όπως και στη μελέτη των προηγούμενων κυτταρικών σειρών, μελετήθηκε η ET-1 ως μηχανισμός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης και στα κύτταρα VCaP. Για το σκοπό αυτό, έγινε συγχρόνηση ET-1 και αμπιρατερόνης για 24 ώρες και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα διδροτεστοστερόνης καθώς και ο πολλαπλασιασμός στα VCaP κύτταρα. Για τις συγχρονήσεις χρησιμοποιήθηκε ET-1 συγκέντρωσης 100 nM και αμπιρατερόνη συγκεντρώσεων 10 nM ή 10 μM ακολουθώντας το πρότυπο των προηγούμενων πειραμάτων.

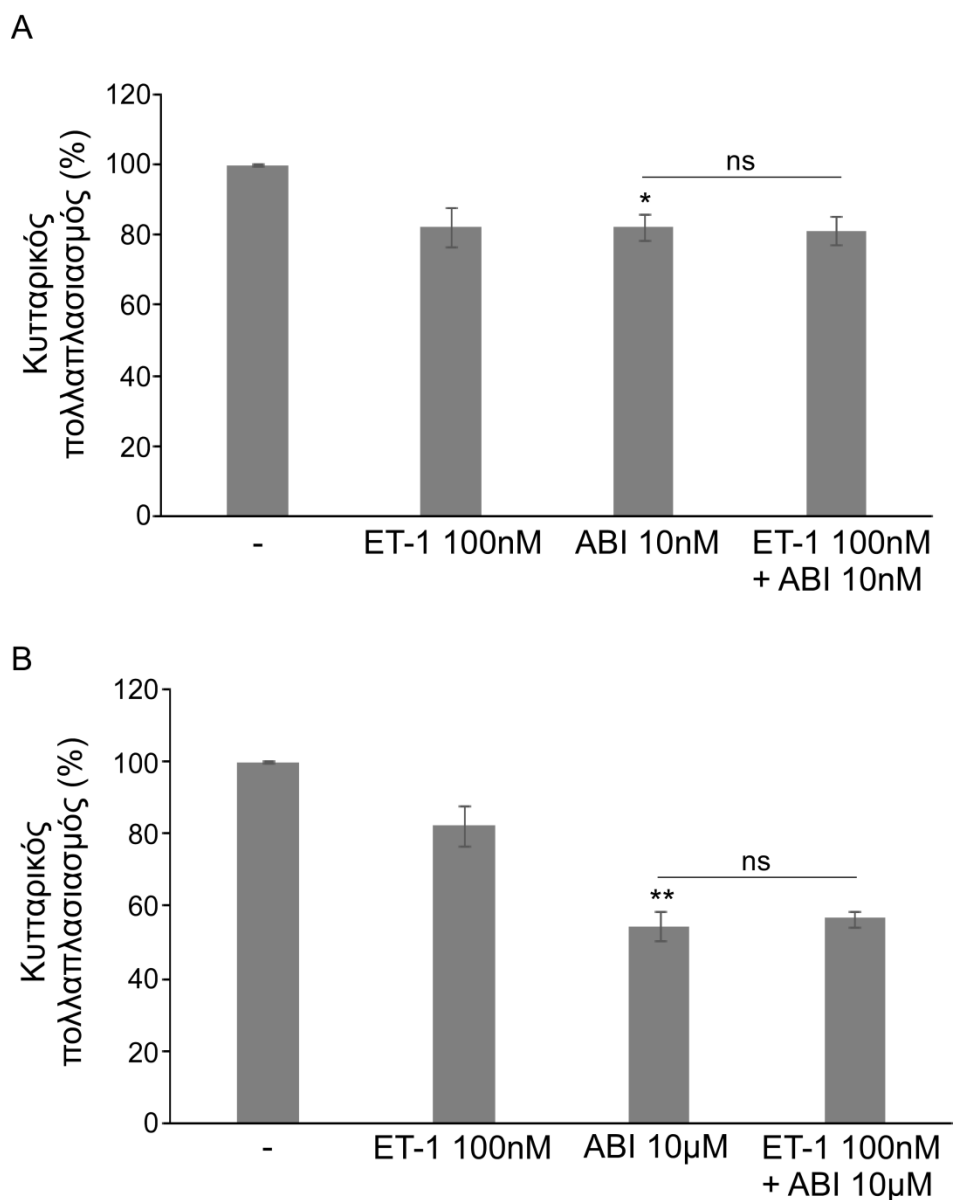
Η συγχρόνηση των κυττάρων με ET-1 και αμπιρατερόνη 10 nM οδήγησε σε αύξηση 20% των ενδοκυττάρων επιπέδων διδροτεστοστερόνης συγκριτικά με τα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο αμπιρατερόνη. Η αύξηση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική ενώ στην ουσία επανέφερε τα επίπεδα διδροτεστοστερόνης σε αυτά που έχουν τα κύτταρα που δεν έχουν υποστεί

καμία επίδραση ουσιών (Εικόνα 41Α). Όμοια η συγχορήγηση ET-1 και αμπιρατερόνης 10  $\mu$ M οδήγησε σε μία αύξηση των επιπέδων διυδροτεστοστερόνης κατά 18% η οποία ήταν στατιστικά σημαντική (Εικόνα 41B).



**Εικόνα 41: Επίδραση της ET-1 και της αμπιρατερόνης (ABI) στα ενδοκυττάρια επίπεδα διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα VCaP.** Προσδιορισμός των επιπέδων της ενδοκυττάριας διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα VCaP μετά από επίδραση ET-1 συγκέντρωσης 100 nM ή/και αμπιρατερόνης συγκέντρωσης (A) 10 nM και (B) 10 μM για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % των επιπέδων διυδροτεστοστερόνης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*\* $P < 0,005$ , \*  $P < 0,05$  σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, ###  $P < 0,005$ , ns: not significant).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της συγχορήγησης ET-1 και αμπιρατερόνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων VCaP. Αναλυτικότερα, η συγχορήγηση στα κύτταρα με ET-1 και αμπιρατερόνη συγκέντρωσης 10 nM αλλά και 10 μM και δεν είχε καμία επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο αμπιρατερόνη. Πιο συγκεκριμένα η προσθήκη ET-1 και αμπιρατερόνης 10 nM φάνηκε να μην επηρεάζει καθόλου τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μιας και τον κράτησε μειωμένο στα ίδια επίπεδα που είχε με το αν χορηγείται στα κύτταρα μόνο ET-1 ή μόνο αμπιρατερόνη (Εικόνα 42A). Όμοια η συγχορήγηση ET-1 και αμπιρατερόνης 10 μM δεν είχε καμία μεταβολή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο αμπιρατερόνη (Εικόνα 42B). Οι αλλαγές αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ωστόσο παρόλα αυτά παρατηρούμε την τάση της αμπιρατερόνης να κυριαρχεί στη δράση της ET-1 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό το οποίο είναι φανερό ειδικά στη μέγιστη συγκέντρωση αμπιρατερόνης που χρησιμοποιήθηκε (10 μM). Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε και στις άλλες δύο κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν PC3 και LNCaP.

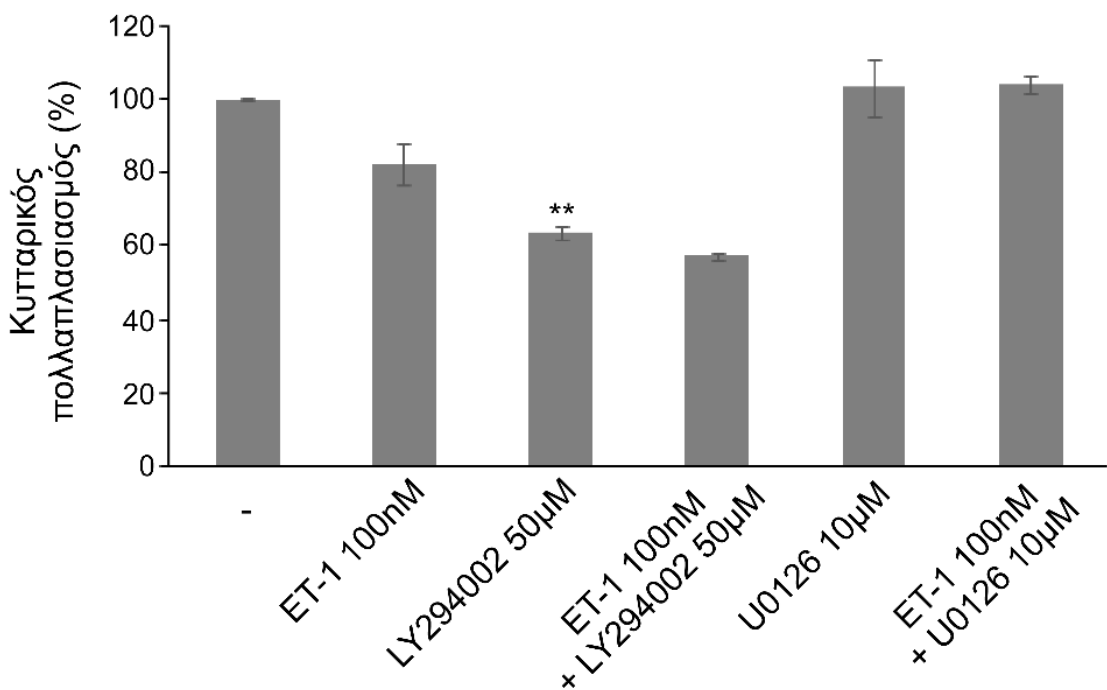


**Εικόνα 42: Επίδραση της ET-1 και της αμπιρατερόνης (ABI) στο πολλαπλασιασμό κυττάρων VCaP.**

Προσδιορισμός του πολλαπλασιασμού κυττάρων VCaP μετά από επίδραση ET-1 (100nM) ή/και αμπιρατερόνης (ABI) συγκέντρωσης (A) 10nM και (B) 10µM για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 3 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα ( \*\* P<0,01, \*P<0,05, ns: not significant).

#### 4.3.4 Διερεύνηση του μηχανισμού της κατασταλτικής δράσης της αμπιρατερόνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Όμοια με τις κυτταροσειρές PC3 και LNCaP που μελετήθηκαν και προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός της κατασταλτικής δράσης της αμπιρατερόνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να γίνει μία προσέγγιση των σηματοδοτικών μηχανισμών που χρησιμοποιούνται και στα VCaP κύτταρα, μετρήθηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός σε κύτταρα στα οποία είχε συγχορηγηθεί η μέγιστη συγκέντρωση ET-1 (100nM) και LY294002 (αναστολέας PI3K) ή U0126 (αναστολέας MAPK) για 24 ώρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η χορήγηση αναστολέα LY294002 προκάλεσε μία στατιστικά σημαντική μείωση στο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού ως 37% συγκριτικά με τα κύτταρα τα οποία δεν υποστεί καμία επίδραση ουσιών. Η προσθήκη ET-1 στα κύτταρα τα οποία είχαν ήδη επωαστεί με αναστολέα LY294002 δεν ανέστρεψε την επίδραση του αναστολέα και κράτησε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μειωμένο. Επιπρόσθετα, κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί αναστολέας U0126 μόνο είτε συγχορηγούμενος με ET-1 δεν έδειξαν κάποια αλλαγή στο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού συγκριτικά με τα κύτταρα τα οποία δεν είχαν υποστεί καμία επίδραση (Εικόνα 43).

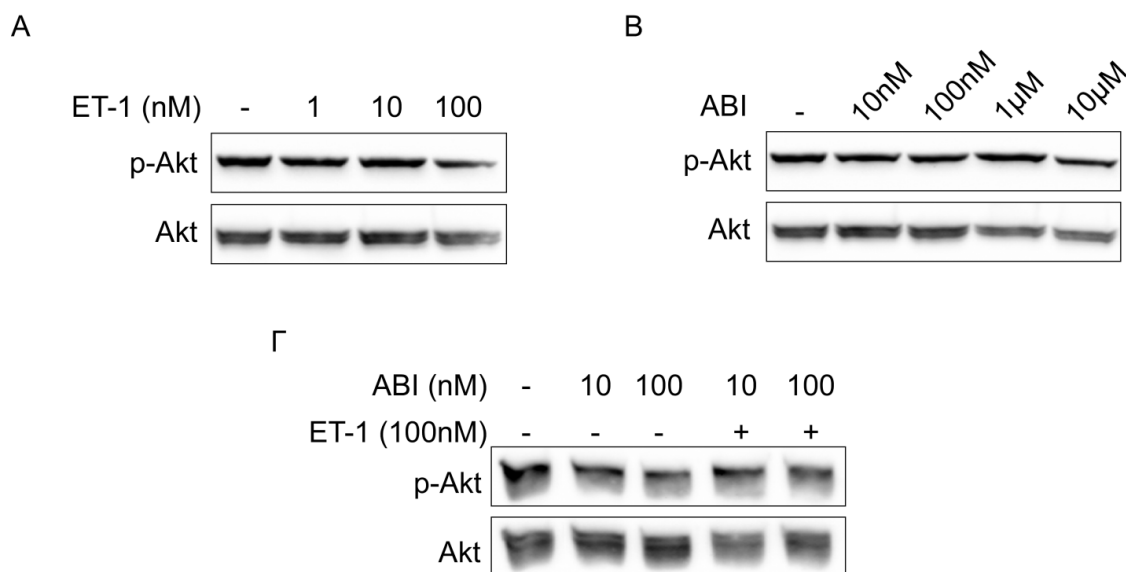


Εικόνα 43:

Επίδραση της ET-1 και των αναστολέων LY294002 και U0126 στο πολλαπλασιασμό κυττάρων

**VCaP.** Προσδιορισμός του πολλαπλασιασμού κυττάρων VCaP μετά από επίδραση ET-1 (100nM) ή/και των αναστολέων LY294002 (50μM) και U0126 (10μM) για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 3 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα ( \*\* P<0,01).

Με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που προκαλείται από την αμπιρατερόνη και του αν σχετίζεται με τη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt, εξετάστηκε η επίδραση της αμπιρατερόνης σε αυτά τα μονοπάτια σε κύτταρα VCaP. Όπως φαίνεται στην εικόνα 44A, η ET-1 προκάλεσε αναστολή της έκφρασης της phospho-Akt όταν χορηγήθηκε σε συγκέντρωση 100 nM και στις δύο κυτταρικές σειρές ενώ παράλληλα τα επίπεδα της συνολικής πρωτεΐνης Akt δεν μεταβλήθηκαν. Στη συνέχεια όπως φαίνεται στην εικόνα 44B, η αμπιρατερόνη μείωσε την έκφραση της phospho-Akt όταν χορηγήθηκε σε συγκεντρώσεις 1 μM και 10 μM. Επιπρόσθετα, η συγχορήγηση αμπιρατερόνης και ET-1 κράτησε τη φωσφορυλίωση της Akt σε μειωμένα επίπεδα ακριβώς όπως και η αμπιρατερόνη μόνη της. Το αποτέλεσμα συμφωνεί με την επίδραση της αμπιρατερόνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων η οποία προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού ο οποίος δεν αναστρέφεται μετά την προσθήκη ET-1. Συμπερασματικά η αμπιρατερόνη χρησιμοποιεί το μονοπάτι PI3K/Akt για την αναστολή του πολλαπλασιασμού παρουσία ET-1.

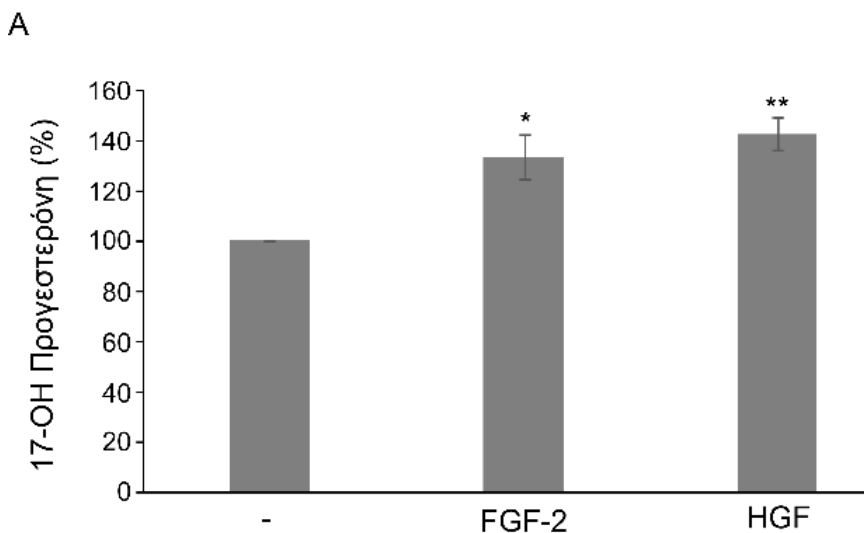


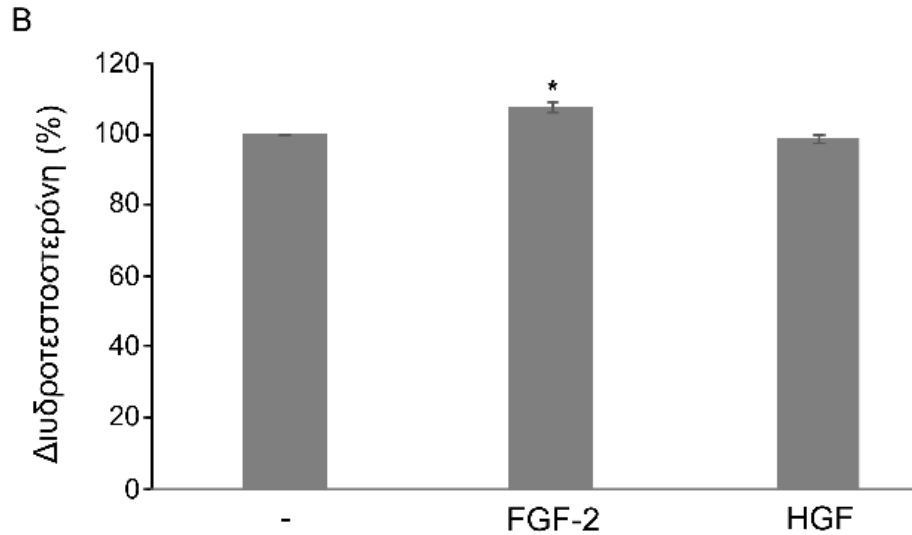
**Εικόνα 44: Επίδραση της ενδοθηλίνης-1 ή/και της αμπιρατερόνης στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3k/Akt.** Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι την p-Akt και την Akt ολικού εκχυλίσματος κυττάρων

VCaP που επώαστηκαν με (Α) ET-1 (1nM, 10nM και 100nM) για 24 ώρες, (Β) αμπιρατερόνη (ABI) (10nM, 100nM, 1μM και 10μM) για 24 ώρες και (Γ) αμπιρατερόνη (ABI) (10 nM και 100 nM) παρουσία ή απουσία ET-1 100nM για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

#### 4.3.5 Η επίδραση του FGF-2 και του HGF στη στεροειδογένεση σε κύτταρα VCaP

Όμοια με τα PC3 και LNCaP, η έρευνα συνεχίστηκε με τη μελέτη δύο αυξητικών παραγόντων του FGF-2 και HGF ως πιθανές οδούς διαφυγής. Κατ' αντιστοιχία με τα προηγούμενα πειράματα έγινε μέτρηση των ενδοκυττάρων επιπέδων 17-OH προγεστερόνης και διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα VCaP στα οποία είχε χορηγηθεί κάθε παράγοντας ξεχωριστά καθώς και σε συνδυασμό με αμπιρατερόνη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η χορήγηση FGF-2 οδήγησε σε μία στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 34% των ενδοκυττάρων επιπέδων της 17-OH προγεστερόνης, ενώ η χορήγηση HGF αύξησε σημαντικά τα ενδοκυττάρια επίπεδα κατά 43% (Εικόνα 45). Η επίδραση και των δύο παραγόντων στα ενδοκυττάρια επίπεδα διυδροτεστοστερόνης αναλύθηκε επίσης και έδειξε μία μικρή αύξηση στα ενδοκυττάρια επίπεδα διυδροτεστοστερόνης μετά την προσθήκη FGF-2, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή μετά την προσθήκη HGF (Εικόνα 45 Β).





**Εικόνα 45: Επίδραση των FGF-2 και HGF στα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης και διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα VCaP.** Προσδιορισμός των επιπέδων της ενδοκυττάριας (A) 17-OH προγεστερόνης και (B) διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα VCaP μετά από επίδραση FGF-2 (10 ng/ml) ή HGF (33,3 ng/ml) για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % των επιπέδων 17-OH προγεστερόνης ή διυδροτεστοστερόνης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*\* P<0,01, \*P<0,05).

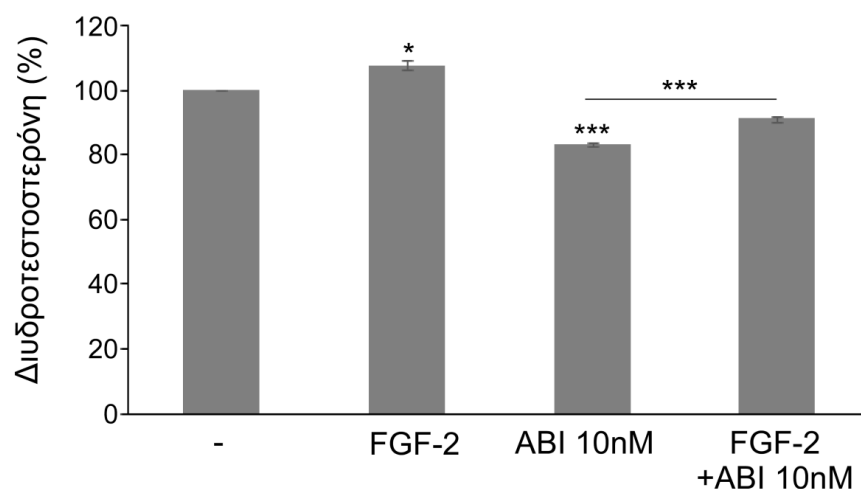
#### **4.3.6 Μελέτη του FGF-2 και του HGF ως μηχανισμός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης σε VCaP κύτταρα**

Η συνέχεια της έρευνας περιλαμβάνει τη μελέτη του κάθε παράγοντα ξεχωριστά σε συνδυασμό με την αμπιρατερόνη προκειμένου να μελετηθεί αν δρα σαν οδός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης. Όπως είδαμε και στην προηγούμενη ενότητα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν αρχικά με τον κάθε παράγοντα ξεχωριστά, μετά με την αμπιρατερόνη μόνο, και στη συνέχεια με τον συνδυασμό των δύο ουσιών. Στο τέλος μετρήθηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα διυδροτεστοστερόνης.

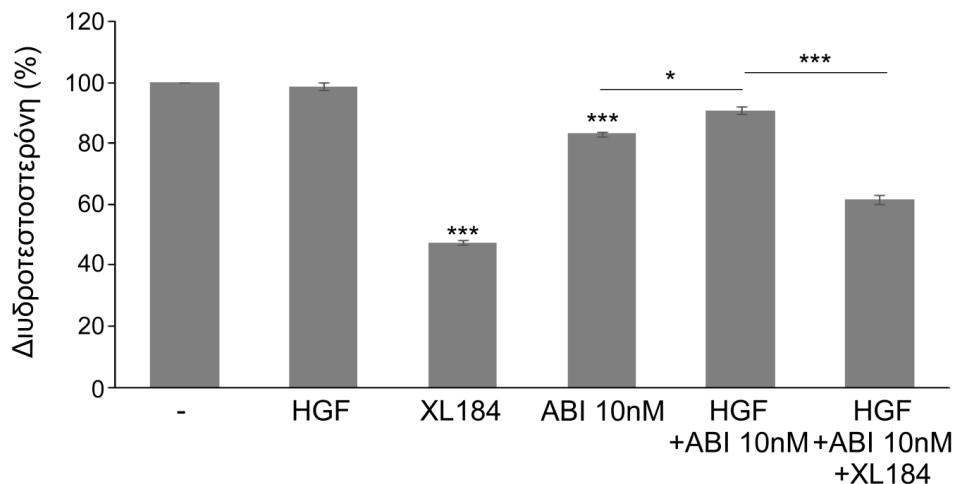


Η συγχορήγηση αμπιρατερόνης και FGF-2 οδήγησε σε μία μικρή αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων διυδροτεστοστερόνης κατά 8% συγκριτικά με κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο αμπιρατερόνη (Εικόνα 46).

Παρόμοια δράση με αυτή του FGF-2, η συγχορήγηση του αυξητικού παράγοντα HGF με την αμπιρατερόνη η οποία οδήγησε επίσης σε μία μικρή αύξηση της τάξης του 8% σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο αμπιρατερόνη. Στη συνέχεια η προεπώαση των κυττάρων με τον αναστολέα XL184 στα κύτταρα στα οποία συγχορηγήθηκε HGF και αμπιρατερόνη οδήγησε σε μια περαιτέρω στατιστικά σημαντική μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων διυδροτεστοστερόνης κατά 20,5% συγκριτικά με αυτά που δεν χορηγήθηκε αναστολέας (Εικόνα 47).



**Εικόνα 46: Επίδραση του FGF-2 και της αμπιρατερόνης (ABI) στα ενδοκυττάρια επίπεδα διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα VCaP.** Προσδιορισμός των επιπέδων της ενδοκυττάριας διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα VCaP μετά από επίδραση FGF-2 (10 ng/ml) ή/και αμπιρατερόνης συγκέντρωσης 10nM για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % των επιπέδων διυδροτεστοστερόνης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*\*\*  $P < 0,005$ , \*  $P < 0,05$ ).



**Εικόνα 47: Επίδραση των HGF, XL184 και της αμπιρατερόνης (ABI) στα ενδοκυττάρια επίπεδα διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα VCaP.** Προσδιορισμός των επιπέδων της ενδοκυττάριας διυδροτεστοστερόνης σε κύτταρα VCaP μετά από επίδραση HGF (33,3 ng/ml), του αναστολέα XL184 (500 nM) ή/και αμπιρατερόνης συγκέντρωσης 10 nM για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % των επιπέδων διυδροτεστοστερόνης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις διπλούν. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα (\*\*\* P<0,005, \*\* P<0,01).

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολλές μελέτες οι οποίες σχετίζονται με την ανάπτυξη του μεταστατικού ενουχο-άντοχου καρκίνου του προστάτη (mCRPC) έχουν δείξει ότι δεν είναι απόλυτα ανδρογονο-ανεξάρτητος καθώς εξακολουθεί να σχετίζεται με τη σηματοδότηση των ανδρογόνων παρόλες τις θεραπείες στέρησης ανδρογόνων [141]. Ως αποτέλεσμα αυτών των μελετών, ο παγκόσμιος οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων ενέκρινε ένα καινούριο φάρμακο, την αμπιρατερόνη, αναστολέα P450 17A1 (CYP17A1) για τη θεραπεία του mCRPC το 2011 και για τη θεραπεία του μεταστατικού ανδρογονο-εξαρτώμενου καρκίνου του προστάτη το 2018 [142]. Παρόλα αυτά, ερευνητικά δεδομένα προ-κλινικών και κλινικών μελετών υποδεικνύουν ότι οι ασθενείς με mCRPC αναπτύσσουν μηχανισμούς αντίστασης στη θεραπεία με αμπιρατερόνη. Η στόχευση των μηχανισμών αντίστασης, είτε εξαρτώνται είτε όχι από τους ανδρογονικούς υποδοχείς, είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για τους ασθενείς με mCRPC [143]. Ένας από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς αντίστασης θεωρείται η σύνθεση ανδρογόνων στο περιβάλλον του όγκου παρόλη τη θεραπεία στέρησης ανδρογόνων στους ασθενείς. Έτσι, οι συγκεντρώσεις τεστοστερόνης και διυδροτεστοστερόνης που ανιχνεύονται μέσα στους όγκους φαίνεται πως επαρκούν για την ενεργοποίηση του ανδρογονικού υποδοχέα και την πυροδότηση της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με τη δράση του [42],[144].

### 5.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ-1 ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΜΠΙΡΑΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ PC3 ΚΑΙ LNCaP

Στη βιβλιογραφία υποστηρίζεται ότι η ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη σχετίζεται με τα σηματοδοτικά μονοπάτια της ET-1. Η ET-1 είναι ένα νευροπεπτίδιο που παράγεται στα καρκινικά κύτταρα, ανιχνεύεται στο πλάσμα των ασθενών και ενεργοποιεί διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια όπως τα Akt, MAPK, PKC και EGFR με αυτοκρινή ή παρακρινή δράση [145]. Στο πλάσμα των ασθενών βρίσκονται αυξημένα επίπεδα ET-1, ωστόσο παραμένει άγνωστο αν αποτελεί την αιτία ή το αποτέλεσμα της καρκινικής δραστηριότητας. Μελέτες σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη έχουν δείξει πιο αυξημένα επίπεδα ET-1 στο πλάσμα αυτών

των ασθενών σε σχέση με τους ασθενείς που βρίσκονται στα αρχικά στάδια της νόσου [146]. Επιπρόσθετα, *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η ET-1 διαθέτει αντι-αποπτωτική δράση στα καρκινικά προστατικά κύτταρα [147]. Ενώ υπάρχουν μελέτες σε κύτταρα PC3 και LNCaP που έχουν δείξει ότι η ET-1 δεν έχει σημαντική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [148]. Παρόλα αυτά έχειδειχτεί ότι η ET-1 προάγει τη στεροειδογένεση σε κύτταρα Leydig ποντικού [149]. Άλλοι συγγραφείς έχουν δείξει ότι η ET-1 μπορεί να ενεργοποιήσει την κινάση Src και να προκαλέσει φωσφορυλίωση του ανδρογονικού υποδοχέα (AR), δείχνοντας με αυτόν τον τρόπο ότι η ET-1 μπορεί να επιδρά και στη δραστηριότητα του AR [84]. Ωστόσο, δεν υπάρχει μέχρι σήμερα βιβλιογραφία που να μελετά την επίδραση της ET-1 και τον συνδυασμό της με αμπιρατερόνη στη στεροειδογένεση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ανδρογόνου-ανεξάρτητων PC3 και ανδρογόνου-εξαρτώμενων LNCaP κυττάρων, γι αυτό και το ερώτημα αυτό αποτέλεσε ένα από τα αντικείμενα της παρούσας διατριβής.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η ET-1 έχει ρυθμιστικό ρόλο στη στεροειδογένεση κυρίως αυξάνοντας τα ενδοκυττάρια επίπεδα της DHT στα PC3 κύτταρα ενώ παρατηρήθηκε ότι δεν έχει σημαντική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των δύο καθιερωμένων κυτταρικών σειρών που μελετήσαμε.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η δράση της αμπιρατερόνης στη στεροειδογένεση και τον πολλαπλασιασμό δύο κυτταρικών σειρών σε διάφορες συγκεντρώσεις και είδαμε ότι η παρουσία αμπιρατερόνης με συγκεντρώσεις 10nM, 100nM και 1μM έδειξε μία μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων DHT στα κύτταρα PC3 και LNCaP. Η συγκέντρωση των 10μM αμπιρατερόνης οδήγησε σε αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων DHT και στις δύο κυτταρικές σειρές.

Όσον αφορά το ρυθμό πολλαπλασιασμού, τα κύτταρα LNCaP έδειξαν στατιστικά σημαντικές μειώσεις στο ρυθμό πολλαπλασιασμού σ' όλες τις συγκεντρώσεις αμπιρατερόνης που καλλιεργήθηκαν και μάλιστα με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Επίσης παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα PC3 έδειξαν μειωμένο πολλαπλασιασμό μόνο όταν σε αυτά χορηγήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση αμπιρατερόνης (10μM). Τα ευρήματά μας συμφωνούν με τα αποτελέσματα άλλων μελετών που έχουν ήδη δείξει ότι η χορήγηση αμπιρατερόνης σε συγκεντρώσεις από 4 έως 30 μM, σε κύτταρα LNCaP and PC3, οδήγησε σε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο [150]. Επιπρόσθετα, υπάρχει και άλλη μελέτη η οποία επιβεβαιώνει την ανασταλτική δράση της αμπιρατερόνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε συγκεντρώσεις όμοιες με αυτές που επιτυγχάνονται κλινικά στο αίμα των ασθενών [151].

Μελετώντας το μηχανισμό δράσης της αμπιρατερόνης στα σηματοδοτικά μονοπάτια του πολλαπλασιασμού, παρατηρήσαμε ότι προκαλεί αναστολή της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών p-akt και p-S6RP στα κύτταρα PC3 που καλλιεργήθηκαν με συγκεντρώσεις αμπιρατερόνης 1μM και 10μM. Αντίθετα στα κύτταρα LNCaP η ανασταλτική δράση της αμπιρατερόνης ήταν λιγότερο εμφανής και είναι πιο σημαντική κυρίως όταν τα κύτταρα αντικρίζουν τη μέγιστη συγκέντρωση αμπιρατερόνης των 10μM.

Προκειμένου να δοθεί απάντηση στο ερώτημα για το αν μπορεί η ET-1 να δράσει σε μηχανισμός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης μελετήθηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα της DHT και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός σε κύτταρα στα οποία συγχορηγήθηκε ET-1 και αμπιρατερόνη. Γι αυτό και στις συνθήκες συγχορήγησης χρησιμοποιήθηκε αμπιρατερόνη σε συγκέντρωση 10nM, η οποία έδειξε τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση στην παραγωγή ενδοκυττάριας DHT, και αμπιρατερόνη σε συγκέντρωση 10μM, η οποία έδειξε τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παρατηρήθηκε ότι η συγχορήγηση αμπιρατερόνης και ET-1 οδήγησε σε μία αύξηση των ενδοκυττάριας επιπέδων DHT σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο αμπιρατερόνη, υποδεικνύοντας ότι η ET-1 κυριαρχεί της δράσης της αμπιρατερόνης στην ενδοκυττάρια στεροειδογένεση τόσο στη μικρή όσο και στη μεγάλη συγκέντρωση της αμπιρατερόνης που χρησιμοποιήθηκε. Στη μελέτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού διαπιστώσαμε ότι η συγχορήγηση ET-1 και αμπιρατερόνης δεν φαίνεται να μεταβάλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων PC3 και LNCaP σε σύγκριση με τα κύτταρα τα οποία είχαν καλλιεργηθεί παρουσία μόνο αμπιρατερόνης. Συμπερασματικά τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η ET-1 δρα σε μηχανισμός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης μέσω της DHT εφόσον η παρουσία της αυξάνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα DHT και φαίνεται να έχει ένα σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στις μεταβολές της στεροειδογένεσης. Επιπλέον, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματά μας, η αμπιρατερόνη πιθανόν να έχει έναν ακόμη ρόλο αυτόν της αναστολής του πολλαπλασιασμού στα κύτταρα PC3 και LNCaP, γεγονός που μας οδήγησε να το μελετήσουμε.

Με στόχο να διερευνηθεί αν η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μελετήθηκε το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K/Akt/mTOR που είναι γενικώς αποδεκτό ότι σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στον καρκίνο του προστάτη. Παρατηρήσαμε ότι η χορήγηση ET-1 σε κύτταρα τα οποία είχαν ήδη καλλιεργηθεί παρουσία αναστολέα της οδού Akt (LY294002) δεν επηρέασε τη δράση που είχε ήδη ο αναστολέας στον πολλαπλασιασμό και των δύο κυτταρικών σειρών όπως όμοια δεν επηρέασε και τη δράση της αμπιρατερόνης στον κυτταρικό

πολλαπλασιασμό. Στη συνέχεια αναλύσαμε το φαινόμενο της συγχορήγησης αμπιρατερόνης και ET-1 στην έκφραση των πρωτεϊνών p-akt και p-S6RP και βρήκαμε ότι η αμπιρατερόνη προκάλεσε αναστολή της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών akt και S6RP που αποτελεί στόχο καθοδικά του ίδιου μονοπατιού και η αναστολή αυτή δεν αναστράφηκε όταν προστέθηκε ET-1. Συνεπώς το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/akt αναστέλλεται από την παρουσία της αμπιρατερόνης και συμβάλλει στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC3 και LNCaP.

Ακόμη τα αποτελέσματά μας, φανερώνουν ότι η αμπιρατερόνη έχει διαφορετική δράση μεταξύ των ανδρογόνου-εξαρτώμενων κυττάρων (LNCaP) και των ανδρογόνου-ανεξάρτητων κυττάρων (PC3). Πιο συγκεκριμένα, παρόλο που η αμπιρατερόνη είχε παρόμοια δράση στην απορύθμιση των ενδοκυττάρων επιπέδων DHT και στις δύο κυτταρικές σειρές, υπήρχε σημαντική διαφορά στη δράση της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η αμπιρατερόνη ανέστειλλε τον πολλαπλασιασμό στα κύτταρα LNCaP με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, ενώ στα PC3 κύτταρα ο πολλαπλασιασμός μειώθηκε μόνο όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με τη μέγιστη συγκέντρωση αμπιρατερόνης (10μM). Όπως ήδη έχει αναφερθεί νωρίτερα, υπάρχουν ήδη δεδομένα μελετών σε κύτταρα LNCaP, που σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά τους έχουν μία μεταλλαγμένη μορφή του AR, και σε κύτταρα PC3, που στερούνται ανδρογονικού υποδοχέα, που δείχνουν ότι η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού συνοδεύεται από σημαντική μείωση της έκφρασης και της δραστηριότητας της πρωτεΐνης του ανδρογονικού υποδοχέα [152]. Παρόλα αυτά το γεγονός ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μειώθηκε και στα PC3 κύτταρα που θεωρητικά στερούνται ανδρογονικού υποδοχέα αποτελεί μία σημαντική ένδειξη ότι στη δράση της αμπιρατερόνης μπορεί να περιλαμβάνονται και μηχανισμοί ανεξάρτητοι από τον ανδρογονικό υποδοχέα. Η έλλειψη AR στα κύτταρα PC3 μπορεί ενδεχομένως να δικαιολογήσει τη μικρότερη επίδραση της αμπιρατερόνης στον πολλαπλασιασμό αυτών των κυττάρων. Επιπρόσθετα, *in vitro* μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε AR-θετικές κυτταροσειρές (LNCaP, VCaP) και AR-αρνητικές (PC3, DU145) έχουν ήδη δείξει ότι οι αναστολείς του ενζύμου CYP 17, όπως η αμπιρατερόνη, μπορούν να δράσουν ανταγωνιστικά, συνδεόμενοι στον ανδρογονικό υποδοχέα και επηρεάζοντας τη δραστηριότητά του [150]. Τα ευρήματά μας επισφραγίζουν παλαιότερα δεδομένα, ενισχύοντας τη θεωρία ότι η αμπιρατερόνη κατέχει έναν συνολικότερο ρόλο στην αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη ο οποίος διαφοροποιείται μεταξύ των ανδρογόνου-ανεξάρτητων (PC3) και ανδρογόνου-εξαρτώμενων (LNCaP) κυτταρικών σειρών καρκίνου του προστάτη.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν για πρώτη φορά ότι η αμπιρατερόνη κατέχει κυρίαρχο ρόλο στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και όχι μόνο στην αναστολή της στεροειδογένεσης. Επιπλέον, η ET-1 δρα σα μηχανισμός διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης μέσω της τελικής παραγωγής DHT. Συνεχίζοντας, η αμπιρατερόνη στοχεύει το μονοπάτι PI3K/akt για την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρουσία ET-1. Τέλος, τα *in vitro* πειράματά μας δείχνουν ότι οι διακυμάνσεις στη συγκέντρωση της αμπιρατερόνης φαίνεται να επηρεάζουν τη δράση της και κατ'επέκταση την απόκριση του ασθενή στη θεραπεία.

Συνοψίζοντας, τα ευρήματα της μελέτης μας υποδηλώνουν ότι η ET-1 προάγει τη ενδοκυττάρια στεροειδογένεση στη θεραπεία με αμπιρατερόνη. Το γεγονός ότι η ET-1 δεν έχει επίδραση στη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την αναστολή της έκφρασης των p-akt και p-S6RP που προκαλούνται από την αμπιρατερόνη οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αμπιρατερόνη αναστέλλει το μονοπάτι PI3K/akt προκειμένου να μειώσει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και με αυτό τον τρόπο να συμβάλλει στη θεραπεία της ασθένειας. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να διευκάνουν το συνολικό ρόλο της αμπιρατερόνης καθώς και τους μηχανισμούς αντίστασης στη θεραπεία με αμπιρατερόνη που οδηγούν σε πρόοδο της νόσου.

## **5.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ FGF-2 ΚΑΙ HGF ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΜΠΙΡΑΤΕΡΟΝΗ ΣΕ PC3 ΚΑΙ LNCaP ΚΥΤΤΑΡΑ**

Η υπόθεση ότι υπάρχουν πιθανές οδοί διαφυγής στη δράση της αμπιρατερόνης μας οδήγησε να μελετήσουμε και την επίδραση των αυξητικών παραγόντων FGF-2 και HGF ως πιθανούς ρυθμιστές της δράσης της αμπιρατερόνης. Πιο συγκεκριμένα έγινε μελέτη της επίδρασης των αυξητικών παραγόντων FGF-2 και HGF και του συνδυασμού τους με την αμπιρατερόνη στα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης και DHT. Τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν ότι οι αυξητικοί παράγοντες FGF-2 και HGF έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν τα ενδοκυττάρια επίπεδα της 17-OH προγεστερόνης και DHT στις ανδρογόνο-εξαρτώμενες και ανδρογόνο-ανεξάρτητες κυτταρικές σειρές του καρκίνου του προστάτη επηρεάζοντας την κατασταλτική δράση της αμπιρατερόνης στις δύο παραπάνω ορμόνες κυρίως ενεργοποιώντας την παραγωγή DHT ως τελικό προϊόν της στεροειδογένεσης.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί η αμπιρατερόνη είναι σχεδιασμένη να καταστέλλει την ανάπτυξη του όγκου αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου CYP17A το οποίο είναι το ένζυμο κλειδί για την παραγωγή ανδρογόνων από την χοληστερόλη. Αναστέλλοντας τη δραστηριότητα του ενζύμου CYP17A1, η αμπιρατερόνη εμποδίζει τη μετατροπή της πρεγνενολόνης ή προγεστερόνης, μέσω της 17-OH προγεστρόνης σε DHT [153]. Τα αποτελέσματα της έρευνάς μας δείχνουν ότι και οι δύο συγκεντρώσεις αμπιτερόνης (10nM και 100nM) που χρησιμοποιήθηκαν οδήγησαν σε μία μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων 17-OH προγεστερόνης και DHT στις LNCaP και PC3 καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η επίδραση δεν ήταν δοσο-εξαρτώμενη, αν και οι συγκεντρώσεις αμπιρατερόνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η μία δεκαπλάσια της άλλης, μία παρατήρηση που υποδεικνύει ένα πλατώ στη δράση της αμπιρατερόνης τουλάχιστον στη συγκέντρωση των 10nM.

Μελέτες έχουν προσδιορίσει τα σχετιζόμενα επίπεδα του FGF-2 στο μεσέγχυμα του φυσιολογικού προστάτη ενώ οι FGFRs εκφράζονται στο προστατικό επιθήλιο [122]. Η απορύθμιση της έκφρασης του FGF-2 και των υποδοχέων FGF οδηγεί στη διαδοχική ενεργοποίηση πολλαπλών μονοπατιών και πυροδοτεί πολλούς μηχανισμούς προόδου νόσου του καρκίνου του προστάτη συμπεριλαμβανομένων της επιβίωσης, της μιτογένεσης, της



διαφοροποίησης, της κινητικότητας/διήθησης και της αγγειογένεσης [122]. Από την άλλη πλευρά ο HGF, κυρίως εκφράζεται στα κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης και οστικών μεταστάσεων καρκινικών προστατικών κυττάρων ενώ ο υποδοχέας c-MET εκφράζεται στα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα [154],[155]. Η απορύθμιση του HGF ή/και της έκφρασης του c-MET έχει παρατηρηθεί στο καρκίνο του προστάτη και συχνά σχετίζεται με κακή πρόγνωση της νόσου [156],[157]. Οι ασθενείς με mCRPC παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα HGF στον ορό και έχουν χειρότερη πρόγνωση συγκριτικά με τους ασθενείς με τοπικά προχωρημένους όγκους ή καλοήθεις εστίες [158]–[160]. Παρόλα αυτά, πολύ λίγα δεδομένα είναι γνωστά από τη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση FGF-2 και HGF στον PCa. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνάς μας, οι παράγοντες FGF-2 και HGF διαφοροποιούν τα ενδοκυττάρια επίπεδα 17-OH προγεστερόνης και DHT τόσο στις ανδρογόνο-εξαρτώμενες (LNCaP) όσο και στις ανδρογόνο-ανεξάρτητες (PC3) κυτταρικές σειρές του καρκίνου του προστάτη. Ειδικότερα, ο παράγοντας FGF-2 μειώνει τα επίπεδα 17-OH προγεστερόνης αλλά δεν έχει επίδραση στα επίπεδα DHT και στις δύο κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν. Από την άλλη πλευρά, ο HGF μείωσε τα επίπεδα 17-OH προγεστερόνης και στις δύο κυτταρικές σειρές καθώς και τα επίπεδα DHT στην κυτταρική σειρά LNCaP. Ωστόσο αύξησε τα επίπεδα DHT στην κυτταρική σειρά PC3, κάτι το οποίο ήταν εντελώς αναπάντεχο. Για πρώτη φορά αποδεικνύεται ότι οι παράγοντες FGF-2 και HGF εμπλέκονται στις διαδικασίες παραγωγής ανδρογόνων μειώνοντας την παραγωγή 17-OH προγεστερόνης. Προηγούμενη μελέτη έχει δείξει ότι ο παράγοντας HGF είναι ικανός να πυροδοτεί τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων και να καταστέλλει τη σύνθεση προγεστερόνης μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού MAPK. Ειδικότερα οι ερευνητές έδειξαν ότι ο παράγοντας HGF κατέστειλλε την έκφραση της ρυθμιστικής πρωτεΐνης της στεροειδογένεσης που πυροδοτείται από την φορσκολίνη (StAR), η οποία αποτελεί κύριο ρυθμιστή της στεροειδογένεσης και της σύνθεσης ανδρογόνων, φαινόμενο το οποίο μπορεί να ερμηνεύσει τα αποτελέσματά μας [161].

Η επιδράσεις των αυξητικών παραγόντων FGF-2 και HGF στη στεροειδογένεση μας οδήγησε στην περαιτέρω έρευνα αν αυτοί οι παράγοντες μπορούν να επιδράσουν στην καταστολή ανδρογόνων που προκαλείται από την αμπιρατερόνη. Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν για πρώτη φορά ότι οι παράγοντες FGF-2 και HGF αυξάνουν τα ενδοκυττάρια επίπεδα DHT όταν συγχρηγοούνται με αμπιρατερόνη συγκριτικά με τα κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί μόνο τη δράση αμπιρατερόνης. Με αυτό τον τρόπο υποδεικνύεται ότι οι παράγοντες FGF-2 και HGF

προάγουν την ενδοκυττάρια σύνθεση DHT χωρίς να επηρεάζουν τη σύνθεση 17-OH προγεστερόνης παρόλη την παρουσία αμπιρατερόνης. Αυτά τα ευρήματα συμφωνούν με αντίστοιχη μελέτη η οποία υποστηρίζει ότι ο αυξητικός παράγοντας IGF-2 κατέχει σημαντικό ρόλο στη αύξηση της *de novo* στεροειδογένεσης στα καρκινικά προστατικά κύτταρα [161]. Επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν δείξει την παρουσία εναλλακτικών μονοπατιών που μπορούν να προάγουν την σύνθεση ανδρογόνων στον CRPC κατέχοντας σημαντικό ρόλο την πρόοδο νόσου. Ο Chang και οι συνεργάτες ανέφεραν ότι υπάρχει ένα εναλλακτικό μονοπάτι σύνθεσης DHT στον CRPC το οποίο παρακάμπτει τη σύνθεση τεστοστερόνης [48]. Επιπρόσθετα, άλλη μελέτη στο παρελθόν έδειξε ότι η καταστολή σύνθεσης ανδρογόνων προάγει την σύνθεση DHT μέσα στον όγκο από μεταβολίτες ανδρογόνων στον PCa [162]. Κατ' αντιστοιχία, αυτό το γεγονός ενισχύει την πιθανότητα ότι η αύξηση DHT με την παρουσία FGF-2 και HGF, παρόλη την αντιανδρογονική δράση της αμπιρατερόνης, μπορεί να προκαλείται από την επιτάχυνση της αρνητικής σύνθεσης DHT από άλλα παράγωγα ανδρογόνων.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση c-Met απορυθμίζεται σε διαφορετικά είδη καρκίνων και ότι η αξιολόγηση της έκφρασης c-Met μπορεί να βοηθήσει για την κατηγοριοποίηση των τελευταίων σταδίων του καρκίνου του προστάτη ως προγνωστικός ή θεραπευτικός παράγοντας, αν και δε χρησιμοποιείται ακόμα στην κλινική πράξη [163]. Οι υποδοχείς Met και VEGFR2 οι οποίοι αποτελούν στόχο του φαρμάκου cabozantinib έχουν συσχετιστεί με ανάπτυξη ανδρογονο-ανεξαρτησίας στους ασθενείς. Κλινικές μελέτες που αξιολογούν το συνδυασμό αμπιρατερόνης και πρεδνιζόνης με καμποζατινίμη βρίσκονται σε εξέλιξη και έχουν ήδη δώσει κάποια πρώτα αποτελέσματα [164]. Συνεπώς τα ευρήματά μας βρίσκονται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία καθώς τα υψηλά επίπεδα HGF στον καρκίνο του προστάτη μπορούν να δράσουν ως μηχανισμός αντίστασης στη δράση της αμπιρατερόνης. Επιπρόσθετα της καμποζατινίμης, ένας αναστολέας υποδοχέων κίνησης της τυροσίνης δια του στόματος η ντοβιτινίμη βρίσκεται επίσης υπο αξιολόγηση σε ασθενείς με mCRPC [165].

Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν για πρώτη φορά ότι οι αυξητικοί παράγοντες FGF-2 και HGF μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση ανδρογόνων και κυρίως μπορούν να συνεισφέρουν στην εμφάνιση αντίστασης στον καρκίνο του προστάτη υπό καταστολή ανδρογόνων. Περαιτέρω *in vitro* και *in vivo* μελέτες στη δράση των αναστολλέων των παραγόντων FGF και HGF σε συνδυασμό με αμπιρατερόνη αναμένεται να ρίξουν περισσότερο φως στο ρόλο της αμπιρατερόνης στον προχωρημένο καρκίνο του προστάτη. Η κατανόηση των μηχανισμών δράσης των

νευροπεπτιδίων και των αυξητικών παραγόντων και της συμμετοχής τους στην ανθεκτικότητα στην αμυρατερόνη μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό κλινικών μελετών με νέες θεραπείες οι οποίες θα συμβάλλουν στην επιμήκυνση της επιβίωσης και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] **Siegel RL, Miller KD, Jemal A.** “Cancer statistics, 2019.” *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7-34.
- [2] **“SEER Cancer Statistics Review 1975-2006 - Previous Version - SEER Cancer Statistics.”** [https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2006/](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2006/). Accessed January 30, 2020.
- [3] **“Cancer Statistics Review, 1975-2014 - SEER Statistics.”** SEER. [https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2014/](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2014/). Accessed February 1, 2020.
- [4] **Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, et al.** “EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease.” *Eur Urol.* 2011;59(1):61-71.
- [5] **Kirby RS, Patel MI.** *Fast Facts: Prostate Cancer, 7th Edition.* Seventh edition. Abingdon: Health Press Limited; 2011.
- [6] **Nemesure B, Wu S-Y, Hennis A, Leske MC.** “Family history of prostate cancer in a black population.” *J Immigr Minor Health.* 2013;15(6):1107-1112.
- [7] **Ross RK, Bernstein L, Lobo RA, et al.** “5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males.” *Lancet.* 1992;339(8798):887-889.
- [8] **Hardin J, Cheng I, Witte JS.** “Impact of consumption of vegetable, fruit, grain, and high glycemic index foods on aggressive prostate cancer risk.” *Nutr Cancer.* 2011;63(6):860-872.
- [9] **Ganesh B, Saoba SL, Sarade MN, Pinjari SV.** “Risk factors for prostate cancer: An hospital-based case-control study from Mumbai, India.” *Indian J Urol.* 2011;27(3):345-350.
- [10] **Dennis LK, Dawson DV.** “Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer.” *Epidemiology.* 2002;13(1):72-79.
- [11] **Huang W-Y, Hayes R, Pfeiffer R, et al.** “Sexually Transmissible Infections and Prostate Cancer Risk.” *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(9):2374-2381.
- [12] **Park S-Y, Cooney RV, Wilkens LR, Murphy SP, Henderson BE, Kolonel LN.** “Plasma 25-hydroxyvitamin D and prostate cancer risk: the multiethnic cohort.” *Eur J Cancer.* 2010;46(5):932-936.
- [13] **Ragin C, Davis-Reyes B, Tadesse H, et al.** “Farming, reported pesticide use, and prostate cancer.” *Am J Mens Health.* 2013;7(2):102-109.
- [14] **Berger AP, Deibl M, Strasak A, et al.** “Large-scale study of clinical impact of PSA velocity: long-term PSA kinetics as method of differentiating men with from those without prostate cancer.” *Urology.* 2007;69(1):134-138.

- [15] **Thompson IM, Cabang AB, Wargovich MJ.** “Future directions in the prevention of prostate cancer.” *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11(1):49-60.
- [16] **Mohler J, Bahnson RR, Boston B, et al.** “NCCN clinical practice guidelines in oncology: prostate cancer.” *J Natl Compr Canc Netw.* 2010;8(2):162-200.
- [17] **Sternberg CN, Petrylak DP, Madan RA, Parker C.** “Progress in the treatment of advanced prostate cancer.” *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2014:117-131.
- [18] **Kuroda K, Liu H, Kim S, Guo M, Navarro V, Bander NH.** “Docetaxel down-regulates the expression of androgen receptor and prostate-specific antigen but not prostate-specific membrane antigen in prostate cancer cell lines: implications for PSA surrogacy.” *Prostate.* 2009;69(14):1579-1585.
- [19] **Beer TM, Tombal B.** “Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy.” *N Engl J Med.* 2014;371(18):1755-1756.
- [20] **Scher HI, Fizazi K, Saad F, et al.** “Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy.” *N Engl J Med.* 2012;367(13):1187-1197.
- [21] **Logothetis CJ, Basch E, Molina A, et al.** “Effect of abiraterone acetate and prednisone compared with placebo and prednisone on pain control and skeletal-related events in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: exploratory analysis of data from the COU-AA-301 randomised trial.” *Lancet Oncol.* 2012;13(12):1210-1217.
- [22] **Mostaghel EA, Marck BT, Plymate SR, et al.** “Resistance to CYP17A1 inhibition with abiraterone in castration-resistant prostate cancer: induction of steroidogenesis and androgen receptor splice variants.” *Clin Cancer Res.* 2011;17(18):5913-5925.
- [23] **Pardridge WM.** “Transport of protein-bound hormones into tissues in vivo.” *Endocr Rev.* 1981;2(1):103-123.
- [24] **Suzuki H, Ueda T, Ichikawa T, Ito H.** “Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer.” *Endocr Relat Cancer.* 2003;10(2):209-216.
- [25] **Brock BJ, Waterman MR.** “Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species.” *Biochemistry.* 1999;38(5):1598-1606.
- [26] **Nakajin S, Hall PF.** “Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis. Purification and properties of A C21 steroid side-chain cleavage system (17 alpha-hydroxylase-C17,20 lyase).” *J Biol Chem.* 1981;256(8):3871-3876.
- [27] **Auchus RJ, Lee TC, Miller WL.** “Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer.” *J Biol Chem.* 1998;273(6):3158-3165.
- [28] **Youngblood GL, Payne AH.** “Isolation and characterization of the mouse P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20-lyase gene (Cyp17): transcriptional regulation of the gene by cyclic

- adenosine 3',5'-monophosphate in MA-10 Leydig cells." *Mol Endocrinol*. 1992;6(6):927-934.
- [29] **Rey R, Picard JY.** "Embryology and endocrinology of genital development." *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1998;12(1):17-33.
- [30] **Isaacs JT, Furuya Y, Berges R.** "The role of androgen in the regulation of programmed cell death/apoptosis in normal and malignant prostatic tissue." *Semin Cancer Biol*. 1994;5(5):391-400.
- [31] **Cunha GR, Ricke W, Thomson A, et al.** "Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development." *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;92(4):221-236.
- [32] **Hayward SW, Cunha GR.** "The prostate: development and physiology." *Radiol Clin North Am*. 2000;38(1):1-14.
- [33] **Moltzahn FR, Volkmer J-P, Rottke D, Ackermann R.** "Cancer stem cells'-lessons from Hercules to fight the Hydra." *Urol Oncol*. 2008;26(6):581-589.
- [34] **Condon MS.** "The role of the stromal microenvironment in prostate cancer." *Semin Cancer Biol*. 2005;15(2):132-137.
- [35] **Cunha GR.** "Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future." *Differentiation*. 2008;76(6):578-586.
- [36] **Cunha GR.** "Growth factors as mediators of androgen action during male urogenital development." *Prostate Suppl*. 1996;6:22-25.
- [37] **Long RM, Morrissey C, Fitzpatrick JM, Watson RWG.** "Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies." *Clin Sci*. 2005;108(1):1-11.
- [38] **Isaacs WB.** "Molecular genetics of prostate cancer." *Cancer Surv*. 1995;25:357-379.
- [39] **Hanahan D, Weinberg RA.** "The hallmarks of cancer." *Cell*. 2000;100(1):57-70.
- [40] **Huggins C.** "Endocrine-induced regression of cancers." *Am J Surg*. 1978;136(2):233-238.
- [41] **Penning TM, Bauman DR, Jin Y, Rizner TL.** "Identification of the molecular switch that regulates access of 5alpha-DHT to the androgen receptor." *Mol Cell Endocrinol*. 2007;265-266:77-82.
- [42] **Locke JA, Guns ES, Lubik AA, et al.** "Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer." *Cancer Res*. 2008;68(15):6407-6415.

- [43] **Leon CG, Locke JA, Adomat HH, et al.** “Alterations in cholesterol regulation contribute to the production of intratumoral androgens during progression to castration-resistant prostate cancer in a mouse xenograft model.” *Prostate*. 2010;70(4):390-400.
- [44] **Chang K-H, Li R, Kuri B, et al.** “A gain-of-function mutation in DHT synthesis in castration-resistant prostate cancer.” *Cell*. 2013;154(5):1074-1084.
- [45] **Auchus RJ.** “The backdoor pathway to dihydrotestosterone.” *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15(9):432-438.
- [46] **Auchus RJ.** “Non-traditional metabolic pathways of adrenal steroids.” *Rev Endocr Metab Disord*. 2009;10(1):27-32.
- [47] **Miller WL, Auchus RJ.** “The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders.” *Endocr Rev*. 2011;32(1):81-151.
- [48] **Chang K-H, Li R, Papari-Zareei M, et al.** “Dihydrotestosterone synthesis bypasses testosterone to drive castration-resistant prostate cancer.” *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(33):13728-13733.
- [49] **Stanbrough M, Bubley GJ, Ross K, et al.** “Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer.” *Cancer Res*. 2006;66(5):2815-2825.
- [50] **Yu Y, Li W, Han Z, Luo M, Chang Z, Tan J.** “The effect of follicle-stimulating hormone on follicular development, granulosa cell apoptosis and steroidogenesis and its mediation by insulin-like growth factor-I in the goat ovary.” *Theriogenology*. 2003;60(9):1691-1704.
- [51] **Negri-Cesi P, Motta M.** “Androgen metabolism in the human prostatic cancer cell line LNCaP.” *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1994;51(1-2):89-96.
- [52] **Koh E, Noda T, Kanaya J, Namiki M.** “Differential expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozyme genes in prostate cancer and noncancer tissues.” *Prostate*. 2002;53(2):154-159.
- [53] **Ji Q, Chang L, Stanczyk FZ, Ookhtens M, Sherrod A, Stolz A.** “Impaired dihydrotestosterone catabolism in human prostate cancer: critical role of AKR1C2 as a pre-receptor regulator of androgen receptor signaling.” *Cancer Res*. 2007;67(3):1361-1369.
- [54] **Montgomery RB, Mostaghel EA, Vessella R, et al.** “Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth.” *Cancer Res*. 2008;68(11):4447-4454.
- [55] **Bennett NC, Hooper JD, Lambie D, et al.** “Evidence for steroidogenic potential in human prostate cell lines and tissues.” *Am J Pathol*. 2012;181(3):1078-1087.
- [56] **Hofland J, van Weerden WM, Dits NFJ, et al.** “Evidence of limited contributions for intratumoral steroidogenesis in prostate cancer.” *Cancer Res*. 2010;70(3):1256-1264.

- [57] **Mitsiades N, Sung CC, Schultz N, et al.** “Distinct patterns of dysregulated expression of enzymes involved in androgen synthesis and metabolism in metastatic prostate cancer tumors.” *Cancer Res.* 2012;72(23):6142-6152.
- [58] **Yepuru M, Wu Z, Kulkarni A, et al.** “Steroidogenic enzyme AKR1C3 is a novel androgen receptor-selective coactivator that promotes prostate cancer growth.” *Clin Cancer Res.* 2013;19(20):5613-5625.
- [59] **Brookes DE, Zandvliet D, Watt F, Russell PJ, Molloy PL.** “Relative activity and specificity of promoters from prostate-expressed genes.” *Prostate.* 1998;35(1):18-26.
- [60] **Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM.** “Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome.” *Science.* 1988;240(4850):327-330.
- [61] **Lorente D, Mateo J, Zafeiriou Z, et al.** “Switching and withdrawing hormonal agents for castration-resistant prostate cancer.” *Nat Rev Urol.* 2015;12(1):37-47.
- [62] **Shapiro E.** “Paternity and hormone levels.” *Rev Urol.* 2001;3(2):108-109.
- [63] **Imperato-McGinley J, Binienda Z, Arthur A, Mininberg DT, Vaughan ED, Quimby FW.** “The development of a male pseudohermaphroditic rat using an inhibitor of the enzyme 5 alpha-reductase.” *Endocrinology.* 1985;116(2):807-812.
- [64] **Wilson JD, Griffin JE, Russell DW.** “Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency.” *Endocr Rev.* 1993;14(5):577-593.
- [65] **Brinkmann AO, Trapman J.** “Genetic analysis of androgen receptors in development and disease.” *Adv Pharmacol.* 2000;47:317-341.
- [66] **Shang Y, Myers M, Brown M.** “Formation of the androgen receptor transcription complex.” *Mol Cell.* 2002;9(3):601-610.
- [67] **Heinlein CA, Chang C.** “Androgen receptor in prostate cancer.” *Endocr Rev.* 2004;25(2):276-308.
- [68] **Laitinen S, Martikainen PM, Tammela TLJ, Visakorpi T.** “Cellular changes in prostate cancer cells induced by intermittent androgen suppression.” *Eur Urol.* 2007;52(3):725-732.
- [69] **Kinoshita H, Shi Y, Sandefur C, et al.** “Methylation of the androgen receptor minimal promoter silences transcription in human prostate cancer.” *Cancer Res.* 2000;60(13):3623-3630.
- [70] **Chen CD, Welsbie DS, Tran C, et al.** “Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy.” *Nat Med.* 2004;10(1):33-39.
- [71] **Bologna M, Festuccia C, Muzi P, Biordi L, Ciomei M.** “Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro.” *Cancer.* 1989;63(9):1714-1720.



- [72] **Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, et al.** “Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer.” *Cancer Res.* 1996;56(4):663-668.
- [73] **Rozenfurt E.** “Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuro peptide receptor agonists.” *J Cell Physiol.* 1998;177(4):507-517.
- [74] **Bagnato A, Rosanò L.** “The endothelin axis in cancer.” *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(8):1443-1451.
- [75] **Shipp MA, Look AT.** “Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key!” *Blood.* 1993;82(4):1052-1070.
- [76] **Sumitomo M, Shen R, Walburg M, et al.** “Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling.” *J Clin Invest.* 2000;106(11):1399-1407.
- [77] **Paule B, Terry S, Kheuang L, Soyeux P, Vacherot F, de la Taille A.** “The NF-kappaB/IL-6 pathway in metastatic androgen-independent prostate cancer: new therapeutic approaches?” *World J Urol.* 2007;25(5):477-489.
- [78] **Dai J, Shen R, Sumitomo M, et al.** “Tumor-suppressive effects of neutral endopeptidase in androgen-independent prostate cancer cells.” *Clin Cancer Res.* 2001;7(5):1370-1377.
- [79] **Dawson LA, Maitland NJ, Berry P, Turner AJ, Usmani BA.** “Expression and localization of endothelin-converting enzyme-1 in human prostate cancer.” *Exp Biol Med (Maywood).* 2006;231(6):1106-1110.
- [80] **Godara G, Pecher S, Jukic DM, et al.** “Distinct patterns of endothelin axis expression in primary prostate cancer.” *Urology.* 2007;70(1):209-215.
- [81] **Bagnato A, Spinella F, Rosanò L.** “The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy.” *Can J Physiol Pharmacol.* 2008;86(8):473-484.
- [82] **Leonard JP, Furman RR, Coleman M.** “Proteasome inhibition with bortezomib: a new therapeutic strategy for non-Hodgkin’s lymphoma.” *Int J Cancer.* 2006;119(5):971-979.
- [83] **Li Y, Choi PS, Casey SC, Dill DL, Felsher DW.** “MYC through miR-17-92 suppresses specific target genes to maintain survival, autonomous proliferation, and a neoplastic state.” *Cancer Cell.* 2014;26(2):262-272.
- [84] **Lee JG, Zheng R, McCafferty-Cepero JM, Burnstein KL, Nanus DM, Shen R.** “Endothelin-1 enhances the expression of the androgen receptor via activation of the c-myc pathway in prostate cancer cells.” *Mol Carcinog.* 2009;48(2):141-149.
- [85] **Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, et al.** “CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung.” *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(23):10662-10666.

- [86] **Turner AJ, Isaac RE, Coates D.** “The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function.” *Bioessays*. 2001;23(3):261-269.
- [87] **Nanus DM.** “Of peptides and peptidases: the role of cell surface peptidases in cancer.” *Clin Cancer Res*. 2003;9(17):6307-6309.
- [88] **King KA, Hua J, Torday JS, et al.** “CD10/neutral endopeptidase 24.11 regulates fetal lung growth and maturation in utero by potentiating endogenous bombesin-like peptides.” *J Clin Invest*. 1993;91(5):1969-1973.
- [89] **Nelson JB, Carducci MA.** “Small bioactive peptides and cell surface peptidases in androgen-independent prostate cancer.” *Cancer Invest*. 2000;18(1):87-96.
- [90] **Papandreou CN, Usmani B, Geng Y, et al.** “Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression.” *Nat Med*. 1998;4(1):50-57.
- [91] **Usmani BA, Shen R, Janeczko M, et al.** “Methylation of the neutral endopeptidase gene promoter in human prostate cancers.” *Clin Cancer Res*. 2000;6(5):1664-1670.
- [92] **Shen R, Sumitomo M, Dai J, et al.** “Androgen-induced growth inhibition of androgen receptor expressing androgen-independent prostate cancer cells is mediated by increased levels of neutral endopeptidase.” *Endocrinology*. 2000;141(5):1699-1704.
- [93] **Osman I, Yee H, Taneja SS, et al.** “Neutral endopeptidase protein expression and prognosis in localized prostate cancer.” *Clin Cancer Res*. 2004;10(12 Pt 1):4096-4100.
- [94] **Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A.** “Fibroblast growth factors, their receptors and signaling.” *Endocr Relat Cancer*. 2000;7(3):165-197.
- [95] **Folkman J, Shing Y.** “Angiogenesis.” *J Biol Chem*. 1992;267(16):10931-10934.
- [96] **Partanen J, Vainikka S, Korhonen J, Armstrong E, Alitalo K.** “Diverse receptors for fibroblast growth factors.” *Prog Growth Factor Res*. 1992;4(1):69-83.
- [97] **Kanda S, Landgren E, Ljungström M, Claesson-Welsh L.** “Fibroblast growth factor receptor 1-induced differentiation of endothelial cell line established from tsA58 large T transgenic mice.” *Cell Growth Differ*. 1996;7(3):383-395.
- [98] **Arese M, Chen Y, Florkiewicz RZ, Gualandris A, Shen B, Rifkin DB.** “Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals.” *Mol Biol Cell*. 1999;10(5):1429-1444.
- [99] **Polnaszek N, Kwabi-Addo B, Peterson LE, et al.** “Fibroblast growth factor 2 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer.” *Cancer Res*. 2003;63(18):5754-5760.

- [100] **Klagsbrun M, Baird A.** “A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity.” *Cell*. 1991;67(2):229-231.
- [101] **Dow JK, deVere White RW.** “Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions.” *Urology*. 2000;55(6):800-806.
- [102] **Gotoh N.** “Regulation of growth factor signaling by FRS2 family docking/scaffold adaptor proteins.” *Cancer Sci*. 2008;99(7):1319-1325.
- [103] **Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, et al.** “A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway.” *Cell*. 1997;89(5):693-702.
- [104] **Turner N, Grose R.** “Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer.” *Nat Rev Cancer*. 2010;10(2):116-129.
- [105] **Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, et al.** “Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.” *Cell*. 1999;96(6):857-868.
- [106] **Goetz R, Mohammadi M.** “Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology.” *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(3):166-180.
- [107] **Li H, Rao A, Hogan PG.** “Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins.” *Trends Cell Biol*. 2011;21(2):91-103.
- [108] **Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, et al.** “Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product.” *Science*. 1991;251(4995):802-804.
- [109] **Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Vande Woude G.** “Targeting MET in cancer: rationale and progress.” *Nat Rev Cancer*. 2012;12(2):89-103.
- [110] **Maeda A, Nakashiro K, Hara S, et al.** “Inactivation of AR activates HGF/c-Met system in human prostatic carcinoma cells.” *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;347(4):1158-1165.
- [111] **Verras M, Lee J, Xue H, Li T-H, Wang Y, Sun Z.** “The androgen receptor negatively regulates the expression of c-Met: implications for a novel mechanism of prostate cancer progression.” *Cancer Res*. 2007;67(3):967-975.
- [112] **Russo AL, Jedlicka K, Wernick M, et al.** “Urine analysis and protein networking identify met as a marker of metastatic prostate cancer.” *Clin Cancer Res*. 2009;15(13):4292-4298.
- [113] **Xu L, Nilsson MB, Saintigny P, et al.** “Epidermal growth factor receptor regulates MET levels and invasiveness through hypoxia-inducible factor-1alpha in non-small cell lung cancer cells.” *Oncogene*. 2010;29(18):2616-2627.

- [114] **Dulak AM, Gubish CT, Stabile LP, Henry C, Siegfried JM.** “HGF-independent potentiation of EGFR action by c-Met.” *Oncogene*. 2011;30(33):3625-3635.
- [115] **Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J.** “Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility.” *Nature*. 1987;327(6119):239-242.
- [116] **Stetler-Stevenson WG.** “Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention.” *J Clin Invest*. 1999;103(9):1237-1241.
- [117] **Ropiquet F, Giri D, Lamb DJ, Ittmann M.** “FGF7 and FGF2 are increased in benign prostatic hyperplasia and are associated with increased proliferation.” *J Urol*. 1999;162(2):595-599.
- [118] **Giri D, Ropiquet F, Ittmann M.** “Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer.” *Clin Cancer Res*. 1999;5(5):1063-1071.
- [119] **Cronauer MV, Hittmair A, Eder IE, et al.** “Basic fibroblast growth factor levels in cancer cells and in sera of patients suffering from proliferative disorders of the prostate.” *Prostate*. 1997;31(4):223-233.
- [120] **Huss WJ, Barrios RJ, Foster BA, Greenberg NM.** “Differential expression of specific FGF ligand and receptor isoforms during angiogenesis associated with prostate cancer progression.” *Prostate*. 2003;54(1):8-16.
- [121] **Zuck B, Goepfert C, Nedlin-Chittka A, Sohr K, Voigt KD, Knabbe C.** “Regulation of fibroblast growth factor-like protein(s) in the androgen-responsive human prostate carcinoma cell line LNCaP.” *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992;41(3-8):659-663.
- [122] **Kwabi-Addo B, Ozen M, Ittmann M.** “The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer.” *Endocr Relat Cancer*. 2004;11(4):709-724.
- [123] **Weidner KM, Behrens J, Vandekerckhove J, Birchmeier W.** “Scatter factor: molecular characteristics and effect on the invasiveness of epithelial cells.” *J Cell Biol*. 1990;111(5 Pt 1):2097-2108.
- [124] **Boissinot M, Vilaine M, Hermouet S.** “The Hepatocyte Growth Factor (HGF)/Met Axis: A Neglected Target in the Treatment of Chronic Myeloproliferative Neoplasms?” *Cancers (Basel)*. 2014;6(3):1631-1669.
- [125] **Knudsen BS, Gmyrek GA, Inra J, et al.** “High expression of the Met receptor in prostate cancer metastasis to bone.” *Urology*. 2002;60(6):1113-1117.
- [126] **Humphrey PA, Zhu X, Zarnegar R, et al.** “Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma.” *Am J Pathol*. 1995;147(2):386-396.

- [127] **Pisters LL, Troncoso P, Zhau HE, Li W, von Eschenbach AC, Chung LW.** “c-met proto-oncogene expression in benign and malignant human prostate tissues.” *J Urol.* 1995;154(1):293-298.
- [128] **Gupta A, Karakiewicz PI, Roehrborn CG, Lotan Y, Zlotta AR, Shariat SF.** “Predictive value of plasma hepatocyte growth factor/scatter factor levels in patients with clinically localized prostate cancer.” *Clin Cancer Res.* 2008;14(22):7385-7390.
- [129] **Yasuda K, Nagakawa O, Akashi T, et al.** “Serum active hepatocyte growth factor (AHGF) in benign prostatic disease and prostate cancer.” *Prostate.* 2009;69(4):346-351.
- [130] **Barrie SE, Potter GA, Goddard PM, Haynes BP, Dowsett M, Jarman M.** “Pharmacology of novel steroidal inhibitors of cytochrome P450(17) alpha (17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase).” *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1994;50(5-6):267-273.
- [131] **O'Donnell A, Judson I, Dowsett M, et al.** “Hormonal impact of the 17alpha-hydroxylase/C(17,20)-lyase inhibitor abiraterone acetate (CB7630) in patients with prostate cancer.” *Br J Cancer.* 2004;90(12):2317-2325.
- [132] **Attard G, Reid AHM, A'Hern R, et al.** “Selective inhibition of CYP17 with abiraterone acetate is highly active in the treatment of castration-resistant prostate cancer.” *J Clin Oncol.* 2009;27(23):3742-3748.
- [133] **Attard G, Reid AHM, Olmos D, de Bono JS.** “Antitumor activity with CYP17 blockade indicates that castration-resistant prostate cancer frequently remains hormone driven.” *Cancer Res.* 2009;69(12):4937-4940.
- [134] **Ryan CJ, Smith MR, Fong L, et al.** “Phase I clinical trial of the CYP17 inhibitor abiraterone acetate demonstrating clinical activity in patients with castration-resistant prostate cancer who received prior ketoconazole therapy.” *J Clin Oncol.* 2010;28(9):1481-1488.
- [135] **de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, et al.** “Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer.” *N Engl J Med.* 2011;364(21):1995-2005.
- [136] **Ryan CJ, Smith MR, Fong L, et al.** “Phase I Clinical Trial of the CYP17 Inhibitor Abiraterone Acetate Demonstrating Clinical Activity in Patients With Castration-Resistant Prostate Cancer Who Received Prior Ketoconazole Therapy.” *J Clin Oncol.* 2010;28(9):1481-1488.
- [137] **Irani S, Salajegheh A, Smith RA, Lam AK-Y.** “A review of the profile of endothelin axis in cancer and its management.” *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014;89(2):314-321.
- [138] **Humphrey PA, Zhu X, Zarnegar R, et al.** “Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma.” *Am J Pathol.* 1995;147(2):386-396.

- [139] **Kasai S, Sugimura K, Matsumoto K, Nishi N, Kishimoto T, Nakamura T.** “Hepatocyte growth factor is a paracrine regulator of rat prostate epithelial growth.” *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;228(2):646-652.
- [140] **Lalich M, McNeel DG, Wilding G, Liu G.** “Endothelin receptor antagonists in cancer therapy.” *Cancer Invest.* 2007;25(8):785-794.
- [141] **Longo DL.** “New therapies for castration-resistant prostate cancer.” *N Engl J Med.* 2010;363(5):479-481.
- [142] **Tsao C-K, Oh WK.** “First-Line Treatment of Hormone-Sensitive Metastatic Prostate Cancer: Is There a Single Standard of Care?” *J Clin Oncol.* 2018;36(11):1060-1061.
- [143] **Boudadi K, Antonarakis ES.** “Resistance to Novel Antiandrogen Therapies in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer.” *Clin Med Insights Oncol.* 2016;10(Suppl 1):1-9.
- [144] **Gregory CW, Johnson RT, Mohler JL, French FS, Wilson EM.** “Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen.” *Cancer Res.* 2001;61(7):2892-2898.
- [145] **Bagnato A, Loizidou M, Pflug BR, Curwen J, Growcott J.** “Role of the endothelin axis and its antagonists in the treatment of cancer.” *Br J Pharmacol.* 2011;163(2):220-233.
- [146] **Nelson JB, Hedican SP, George DJ, et al.** “Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate.” *Nat Med.* 1995;1(9):944-949.
- [147] **Nelson JB, Udan MS, Guruli G, Pflug BR.** “Endothelin-1 inhibits apoptosis in prostate cancer.” *Neoplasia.* 2005;7(7):631-637.
- [148] **Tsapakidis K, Vlachostergios PJ, Voutsadakis IA, et al.** “Bortezomib reverses the proliferative and antiapoptotic effect of neuropeptides on prostate cancer cells.” *Int J Urol.* 2012;19(6):565-574.
- [149] **Ergul A, Glassberg MK, Majercik MH, Puett D.** “Endothelin-1 promotes steroidogenesis and stimulates protooncogene expression in transformed murine Leydig cells.” *Endocrinology.* 1993;132(2):598-603.
- [150] **Grossebrummel H, Peter T, Mandelkow R, et al.** “Cytochrome P450 17A1 inhibitor abiraterone attenuates cellular growth of prostate cancer cells independently from androgen receptor signaling by modulation of oncogenic and apoptotic pathways.” *Int J Oncol.* 2016;48(2):793-800.
- [151] **Kosaka T, Miyajima A, Yasumizu Y, Miyazaki Y, Kikuchi E, Oya M.** “Limited in vitro efficacy of CYP17A1 inhibition on human castration resistant prostate cancer.” *Steroids.* 2014;92:39-44.

- [152] **Norris JD, Ellison SJ, Baker JG, et al.** “Androgen receptor antagonism drives cytochrome P450 17A1 inhibitor efficacy in prostate cancer.” *J Clin Invest.* 2017;127(6):2326-2338.
- [153] **Salem M, Garcia JA.** “Abiraterone acetate, a novel adrenal inhibitor in metastatic castration-resistant prostate cancer.” *Curr Oncol Rep.* 2011;13(2):92-96.
- [154] **Giordano S, Di Renzo MF, Narsimhan RP, Cooper CS, Rosa C, Comoglio PM.** “Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene.” *Oncogene.* 1989;4(11):1383-1388.
- [155] **Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF.** “Met, metastasis, motility and more.” *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(12):915-925.
- [156] **Rehman Y, Rosenberg JE.** “Abiraterone acetate: oral androgen biosynthesis inhibitor for treatment of castration-resistant prostate cancer.” *Drug Des Devel Ther.* 2012;6:13-18.
- [157] **Lin Y, Wang F.** “FGF signalling in prostate development, tissue homeostasis and tumorigenesis.” *Biosci Rep.* 2010;30(5):285-291.
- [158] **Naughton M, Picus J, Zhu X, Catalona WJ, Vollmer RT, Humphrey PA.** “Scatter factor-hepatocyte growth factor elevation in the serum of patients with prostate cancer.” *J Urol.* 2001;165(4):1325-1328.
- [159] **Humphrey PA, Halabi S, Picus J, et al.** “Prognostic significance of plasma scatter factor/hepatocyte growth factor levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer: results from cancer and leukemia group B 150005/9480.” *Clin Genitourin Cancer.* 2006;4(4):269-274.
- [160] **Nishida S, Hirohashi Y, Torigoe T, et al.** “Expression of hepatocyte growth factor in prostate cancer may indicate a biochemical recurrence after radical prostatectomy.” *Anticancer Res.* 2015;35(1):413-418.
- [161] **Lubik AA, Gunter JH, Hollier BG, et al.** “IGF2 increases de novo steroidogenesis in prostate cancer cells.” *Endocr Relat Cancer.* 2013;20(2):173-186.
- [162] **Ishizaki F, Nishiyama T, Kawasaki T, et al.** “Androgen deprivation promotes intratumoral synthesis of dihydrotestosterone from androgen metabolites in prostate cancer.” *Sci Rep.* 2013;3:1528.
- [163] **Verhoef EI, Kolijn K, De Herdt MJ, et al.** “MET expression during prostate cancer progression.” *Oncotarget.* 2016;7(21):31029-31036.
- [164] **Choudhury AD, Gray KP, Supko JG, et al.** “A dose finding clinical trial of cabozantinib (XL184) administered in combination with abiraterone acetate in metastatic castration-resistant prostate cancer.” *Prostate.* June 2018.

- [165] **Choi YJ, Kim HS, Park SH, et al.** “Phase II Study of Dovitinib in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer (KCSG-GU11-05).” *Cancer Res Treat.* 2018;50(4):1252-1259.