

# Π.Σ.Ε ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ  
Ημερομ. .... 29/07/02  
Αριθ. Πρωτ. .... 2392

12

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΑΝΤΕΛΑΚΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ

**ΘΕΜΑ:** «ΔΡΑΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ AR ΚΑΙ HSP 90 ΣΤΟΝ  
ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ »

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κος ΑΡΒΑΝΙΤΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2002

ΑΡ. ΕΙΣ. ... 14/902



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 954/1

Ημερ. Εισ.: 3-2-03

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ

2002

ΠΑΝ

## Εισαγωγή Εργασίας

Πρόκειται για μια εργασία που σκοπό έχει να καταγράψει τη συσχέτιση και τη λειτουργία των υποδοχέων ανδρογόνου και των HSP- 90 υπό συνθήκες έκδηλου καρκίνου του προστάτη.

Έτσι εδώ παρουσιάζονται εργασίες που έχουν δημοσιευθεί παγκοσμίως, χρησιμοποιώντας μεθόδους που αναλύουν τη λειτουργία των υποδοχέων ανδρογόνου και των HP-90 ύπο ποθολογικές συνθήκες.

Καταγράφεται ακόμα μια στατιστική έρευνα που αφορά το PSA ως προϊόν παρακολούθησης ασθενών που πάσχουν από Ca προστάτου. Η στατιστική έρευνα έγινε σε τυχαίο δείγμα στο νομό Λάρισας.



## Πρόλογος για υλικά και μεθόδους

Παρακάτω καταγράφονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν απ' τους ερευνητές προκειμένου να έρθει εις πέρας το ερευνητικό έργο.

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 1 ΙΣΤΟΙ

Εννέα καλοήθειες υπερπλασίες προστάτη, 63 αθεράπευτοι καρκίνοι προστάτη, και αύξησι-ξανά προστατών από 8 υποτροπιαζόμενους καρκίνους. Χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτήν την μελέτη. Ασθενείς υποτροπιαζόμενων καρκίνων έδειξαν τοπικές αυξήσεις (8 περιπτώσεις) και αυξημένο PAP (5 περιπτώσεις) 9mo- έξι χρόνια μετά την αρχή της ενδοκρινούς θεραπείας (ευνούχισης και οιστρογόνου (5) / chlormadinone acetate (3). Ιστοί πάρθηκαν είτε μέσω τομής στον προστάτη πίσω από το ηβικό (σε όλες τις καλοήθειες υπερπλασίες και σε 1 καρκίνο) ή σε βιοψία με βελόνα (70 καρκίνοι) από ασθενείς που εισήλθαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Chiba. Αμέσως μετά την αφαίρεση, ένα μικρό κομμάτι ιστού βουτήχτηκε σε υγρό άζωτο και φυλάχτηκε στους -80°C μέχρι την επεξεργασία.

### Κηλιδώσεις από αποδέκτη ανδρογόνου

Μονοκλωνικός αρουραίος με αντί-ανθρώπινο αντίσωμα ανδρογενούς αποδέκτη (AN1-15), το οποίο προετοιμάστηκε από εμβολιασμό με συγχώνευση πρωτεΐνης A που περιείχε 1tr E323 (323 αμινοξέα από E, coli 1tr E γονίδιο) και 242 αμινοξέα (no 331-572) ανθρώπινου αποδέκτη ανδρογόνου (9) χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη. Για τις κηλιδώσεις 3 μικρογραμμάρια IgG, η καθαρότητα του οποίου ήταν 80% περίπου ενάντια στον αποδέκτη ανδρογόνου, διαλύθηκε σε 1ml 0,1 M phosphate-buffered saline (PBS). Παγωμένα δείγματα βρέθηκαν σε -20°C και κόπηκαν σε 6mm φέτες με κρυοστάτη. Οι τομές τοποθετήθηκαν σε Bioden Meschcement καλυμένες φέτες και τοποθετημένες σε 4% διαδοχικά σε Zambonis fixative [10], που περιείχε 0,025% γκλουταραλδεϋδη για 2 λεπτά, Zambonis fixative χωρίς γλυταταλδεϋδη για 10 λεπτά και 85% αιθανόλη για 4 λεπτά. Αφού πλύθηκε με PBS που περιείχε 0,1% ζελατίνη, οι τομείς επεξεργάστηκαν με συμπλήρωμα PBS 0,05% sodium borohydride στους 4°C για 2 λεπτά, και μετά ξεπλύθηκαν

με PBS [1]. Οι τομές επεξεργάστηκαν με PBS που περιείχε 5% κανονικό ορό κουνελιού σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, μετά σε διάλυμα αποδέκτη αντισώματος με αντί-ανδρογόνο σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, ακολουθούμενο με 4°C κατά την διάρκεια της νύχτας. Αφού πλύθηκαν, οι τομές επώαστηκαν με biotinylated αντί-αρουραίου διάλυμα κουνελιού IgG. (Vector Labs Inc. Burlingame (A) σε διάλυμα 1:500 σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά και μετά με Streptavidin biotin peroxidase σύμπλεγμα (DAKO Japan Co-Kyoto) για 30 λεπτά, ακολουθούμενο με 3,3 λεπτά- diaminobenzidine tetra hydrochloride και hydrogen peroxide mixture.

Αντικηλίδωση με methylgreen εκτελέστηκε μετά. Σαν αρνητικό έλεγχο με μη ανοσοποιούμενο καθαρό IgG αρουραίου (Cappel Organon Tech. Corp. West Chester, PA) χρησιμοποιήθηκε αντί για αντίσωμα αποδέκτη αντί-ανδρογόνου. Εντονότητα κηλίδων δεν διαχωρίστηκε σε καμιά, αδύνατα θετικό και δυνατά θετικό, συγκρίνοντάς το με την εντονότητα των εσωτερικών κυλινδρικών κυττάρων της αδενικής προστατικής υπερπλασίας, η οποία αναφέρθηκε σαν δυνατά θετική. Σε οποιαδήποτε περίπτωση 200-1000 κύτταρα μετρήθηκαν και το ποσοστό των δυνατά θετικών κυττάρων μετρήθηκε.

### Ταξινόμηση του καρκίνου του Προστάτη

Ιστολογική βαθμολόγηση έγινε σύμφωνα με την μέθοδο Γκλίσον [12].

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 2

Έγκριση για συλλογή ιστού για σκοπούς ερεύνης δόθηκε από το Ηθικό Συμβούλιο Υγείας Δυτικής Γλασκόβης. Από ασθενείς που υποβάλλονται σε Trans urethral επανα-κατανομή του προστάτη (TURP) για καλοήγη προστατική υπερπλασία σε CaP, μη μαυρισμένες λεπτές φέτες προστάτη που αμέσως πάγωσαν και φυλάχθηκαν στους  $-195^{\circ}\text{C}$  σε υγρό άζωτο. Τα κομμάτια αυτά (οι λεπτές φέτες) βρέθηκαν να περιέχουν αδενοκαρκίνωμα (caP) ταξινομήθηκαν χρησιμοποιώντας την ταξινόμηση Γκλίσον. Ο ιστός πάρθηκε από ασθενείς με παρόμοια ηλικία σε κάθε γκρουπ (καλοήθεις: μέση ηλικία 71,6 χρονών, με ποικιλία ηλικίας 61-81 χρόνια, κακοήθεις: μέση ηλικία 72,7 χρονών, με ποικιλία ηλικίας 58-87 χρόνια). Οι τιμές Γκλίσον για τους όγκους ποίκιλαν από 2 μέχρι 8.

Δύο κύρια αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν: Ivorphilized αρουραίος (μονοκλωνικό) αντίσωμα. Ειδικό για ανθρώπους HSP 90 (SPA-840, Bio2 note Ltd, York, U.K.) [4] και Ivorphilized ποντίκι μονοκλωνικό αντίσωμα, που αναφέρεται σαν DS, ειδικό για ανθρώπους HSP 27 [3].

Πέντε τμήματα κρυοστάτη (7 μη παχύ) κόπηκαν από κάθε λεπτή φέτα, μια για κάθε HSP 27 και 90 αντίσωμα που ήταν κηλιδωμένο, ένα για κάθε αρνητικό έλεγχο αντισώματος και ένα για κάθε στάνταρ αιματοξυλίνη και eosin κηλιδωμα. Όλα τα τμήματα αρχικώς είχαν σχηματιστεί σε 100% ακετόνη. Δύο σταγόνες του πρωταρχικού αντισώματος τοποθετήθηκαν (αντικειμενοφόρες πλάκες) του τεστ στα σλάϊντς του τεστ για 60 λεπτά. Τα αρνητικά τμήματα ελέγχου παρέμειναν σε υγρό παράγοντα [5% 60 vine serum albumen (BSA)/0,05 M. Tris buffered saline (T.S.) pH 7,48] για την διάρκεια της επώασης του πρώτου δοκιμαστικού αλλά μετά δουλεύτηκαν το καθένα μόνο του σε όλα τα επακόλουθα στάδια της διαδικασίας κηλίδωσης.

Στα σλάϊντς (αντικειμενοφόρες πλάκες) δουλεύτηκαν με HSP 90 αντίσωμα και τους αρνητικούς τους ελέγχους και με 2 σταγόνες biotinylated από γίδα και αντίθετο με των αρουραίων σταγονίδιο ανοσίας (immunoglobulin 1:400 διάλυση, Dako Ltd) με την προσθήκη pooled ανθρωπίνου AB ορού (Διαλύματος 1:25) προστέθηκαν για 30 λεπτά. Αφού πλύθηκαν με TBS, προστέθηκαν για 45 λεπτά δύο σταγόνες όσο το καλύτερο διαλυμένο streptavidin – biotinylated-liked alkaline phosphatase (προερχόμενο από τα σπλάχνα). (Strept AB complex/AP-Kit in 5% BSA/TBS; Dako Ltd).

Στις αντικειμενοφόρες πλάκες που δουλεύτηκαν με HSP 27 αντίσωμα και τους αρνητικούς τους ελέγχους προστέθηκαν για 60 λεπτά δύο σταγόνες αλκαλικής φωσφατάσης, κλίθηκαν με οργανική ομοιότητα και τελείως καθαρισμένα σταγονίδια ανοσίας αντίθετα με των αρουραίων. (1:35 διάλυσης ; Dako Ltd).

Η μέση επώαση για την αντίδραση του χρώματος για την αλκαλική ανοσία φωσφατάσης περιελάμβανε 20 ml veronal acetate buffer (sodium acetate trihydrate 0,03 M, barbitone sodium 0,63 M. Σε αποσταγμένο νερό με pH 9,2) στο οποίο προστέθηκε με την σειρά, (i) Fast Red T.R. αλάτι (10mg, Sigma, Ηνωμένο Βασίλειο), (ii) Naphthol AS-TR φωσφατάσης νιτρικό αλάτι (4mg, sigma, Ηνωμένο Βασίλειο) διαλυμένο σε δύο σταγόνες διμεθιλικής φορμαμίδης (BDH, Ηνωμένο Βασίλειο), και τελικώς (iii) Levamisole (2,5mg, Sigma Ηνωμένο Βασίλειο) για να αναστείλει την αλκαλική φωσφατάσης μη-βασικής προελεύσεως. Αυτή η αντίδραση τερματίστηκε βυθίζοντας τα κομμάτια σε αλατούχα φορμόλη πριν την πυρηνική αντί-κηλίδωση με αιματοξυλίνη. Τελικώς, κάποια κομμάτια ανέβηκαν με Immu-mount (Διεθνείς επιστήμες της ζωής) και σφραγίστηκαν με Glyceel (BDH, Ηνωμένο Βασίλειο).

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 3

### ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

RPMI – 1640 διάλυμα πενικιλίνης και στρεπτορικίνης, L-γλουταμίνη, (φωσφορικό άλας).

Phosphate-buffered saline (PBS) και fetal calf serum (FCS) αγοράστηκαν από την GIBCO Life Technologies Ltd (Cambridge U.K.). Αντι-ανθρώπινος ορός ποντικού HSP 27, 72 και 90 kDa που αγοράστηκαν από την Stress Gen Εταιρία βιοτεχνολογίας, Bio2note Ltd (York, UK). Murine-anti-human caspase 3 Mcl-1, Bcl-2 Bcl XI και Anti-GST  $\Delta$  αντισώματα, καθώς επίσης και δεύτερο murine και αντισώματα γίδας, ήταν murine horseradish peroxidase-conjugated ενώθηκαν και αγοράστηκαν από την Transduction, Εργαστήρια (Λέξινκτον, Κτ). Όλα τα άλλα χημικά προμηθεύτηκαν από την Sigma Chemical Co., (St. Louis, Mo) εκτός κι αν έχει αναφερθεί κάτι, αλλιώς κάπου αλλού.

### Καλλιέργεια κυττάρων

Οι σειρές κυττάρων των καρκινωμάτων του ανθρώπινου προστάτη LNCap και PC-3 αγοράστηκαν από την Αμερικανικού Τύπου Συγκέντρωση Ιστών (ATTC, Rockville, MD). Και οι δύο γραμμές κυττάρων καλλιεργήθηκαν σε RPMI-1640 μέτρια συμπληρωμένες με 10% μη ενεργοποιημένο από ζέστη, ορό fetal bovine (FBS), 1% πενικιλίνη/στρεπτομικίνη και 1% γλουταμίνη. Τα κύτταρα μεγάλωσαν υπό ρουτίνα σε 75 cm<sup>3</sup> τρυπημένο ιστό που ήταν σε φιάλες καλλιέργειας στους 37°C σε υγρή ατμόσφαιρα 5% διοξειδίου του άνθρακα. Ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων καθορίστηκε από δοχείο πειραμάτων μπλε αποκλεισμού χρησιμοποιώντας ένα hemocytometer.

Οι γραμμές κυττάρων PC-3 και LN Gop του προστάτη του καρκίνου, καλλιεργήθηκαν σε 24 καλές πλάκες που απορροφούσαν θερμότητα των 42°C για 0,60 και 120 λεπτά, αντιστοίχως σε ένα σετ επωαστήρα στους 42°C.



## Ποσότητα περιεχομένου DNA

Το περιεχόμενο του DNA χρησιμοποιήθηκε σαν μέτρηση της απόπτωσης ποσότητας καθώς το ποσοστό των κυττάρων με hypodiploid DNA προσδιορίστηκε από propidium iodide (PI) με συγχώνευση. Συντόμως, κύτταρα ( $1 \times 10^6$ ) φυγοκεντρήθηκαν στους 2009 για 10 λεπτά, μετά απαλά ξανα-αναρτήθηκαν στα 500ml υποτονικού διαλύματος fluorochrome (50 mg/ml PI, 3,4 mM sodium citrate, 1mM Tris 0,1 mM EDTA, και 0,1% Triton X-100) και αποθηκεύτηκαν στα σκοτεινά στους 4°C για 15-30 λεπτά πριν την ανάλυσή τους με ένα Coulter (Hialeah FL) Elite Cytofluorometer [12].

Το λιγότερο 5.000 περιπτώσεις συγκεντρώθηκαν και αναλύθηκαν. Κυτταρικά συντρίματα αποκλείστηκαν από την ανάλυση ανυψώνοντας το «πρώιμο κατάφλι». Όλες οι μετρήσεις έγιναν υπό τα ίδια σερ εργαλείων. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν ποσοστά περιπτώσεων με μειωμένο περιεχόμενο DNA.

## Δυτική ανάλυση κηλίδων

Όλη η πρωτεΐνη αποσπάστηκε μετά την αγωγή με  $2 \times 10^6$  PC-3 και LON Cap κύτταρα, χρησιμοποιώντας NP-40 lysis buffer (0.5% NP-40, Tris 10mM, pH 80, 60mM KCl, 1mM EDTA, pH 80, 1mM DTT, 10mM PMSF και 1μM leupeptin και aprotinin. Απομονωμένη πρωτεΐνη μετρήθηκε από το πείραμα Bradford, με σύνεργα ανίχνευσης πρωτεΐνης (BioRAD, Laboratories, Hertfordshire, UK και γέμισαν με 50mg σε κάθε φιάλη. Όλη η πρωτεΐνη εκτέθηκε σε 12% SDS polyacrylamide gradient gel και μετά electrophoretically μεταφέρθηκε στο Immobilion P (Millipore, Bedford, MA). Τα τζελ κηλιδώθηκαν μετά τη μεταφορά με μπλε coomassie για να βεβαιωθεί η ισότιμη φόρτωση. Οι κηλίδες μπλοκαρίστηκαν με 5% BSA, TBS και 0,1% Tween-20 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά επώαστηκαν σε βασικό αντίσωμα σε 1:1000 για 1 ώρα. Αφού πλύθηκε, οι μεμβράνες επώαστηκαν με horseradish peroxidase – ενώθηκαν υποδιέστερα σε διάλυμα 1:5000 για 1 ώρα κηλίδες αναπτύχθηκαν χρησιμοποιώντας μία επαυξημένη chemiluminescence σύστημα υποστρώματος για ανίχνευση της horse radish peroxidase (Amersham, Bucks, U.K.).

## Πείραμα για Γκλουταδιόνη εντός του κυττάρου (GSH)

GSH εντός του κυττάρου προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την Thiol και Sulfide κουτί με τα σύνεργα για μέτρηση ποσότητας, που προμηθεύτηκε από την Molecular Probes (Eugene OR). Τα κύτταρα ( $7 \times 10^6$ ) μαζεύτηκαν ως συγκομιδή και πλύθηκαν σε κρύο PBS και οι μετρήσεις των κυττάρων έγιναν από δοχείο πειραμάτων μπλε. Τα κύτταρα μετά αναλύθηκαν από επαναλαμβανόμενη ψύξη-λιώσιμο (δύο φορές στους  $-80^\circ\text{C}$ ) και μετά έγιναν σφαιρίδια. Ισότιμα ποσοστά πρωτεΐνης lysate supernatants χρησιμοποιήθηκαν σε GSH πειράματα. Τα supernatants επώαστηκαν σε 0,5ml διαλύματος A εν ενεργεία (0,6 mg/ml rapain-SSCH<sub>3</sub>) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και μετά 0,5ml διαλύματος B εν ενεργεία (4,9 nM N-benzoyl-L arginine, pirtzoanilide, (L-BARNA) προστέθηκε και επώαστηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το μη ενεργοποιημένο ντισουλφίδιο παράγωγο της rapain, rapain-SSCH<sub>3</sub> είναι ενεργοποιημένο στην παρουσία του GSH stoichiometrically. Η δραστηριότητα της rapain μετά μετρείται χρησιμοποιώντας το χρωμογενοποιημένο υπόστρωμα της rapain (L-BARNA) στα 410nm. Τα αποτελέσματα μετρήθηκαν από μία σταθερή καμπύλη συγκέντρωσης thiol και εκφράστηκε σε nM GsH/ $1 \times 10^6$  κύτταρα.

### Εικ. 1

Τα αποτελέσματα της απορρόφησης της θερμότητας στο PC-3(a) και LNCaP (b) έκφραση του HSP 27,72 και 90. Τα PC-3 και LNCaP κύτταρα καλλιεργήθηκαν για να συμβάλλουν και να θερμανθούν στους  $42^\circ\text{C}$  για 0,60 και 120 λεπτά. Τα κύτταρα μετά επώαστηκαν στους  $37^\circ\text{C}$  και ολόκληρη η πρωτεΐνη πάρθηκε σε 2 και 6 ώρες. SDS-PAGE Δυτική κηλίδωση διεξάχθηκε για να προσδιορίσει HSP 27,72 και 90. Τα τζελς αναπτύχθηκαν χρησιμοποιώντας επαυξημένη chemiluminescence. Οι κηλιδώσεις αναπαριστούν 1 στα 3 πειράματα. Τα γραφήματα αναπαριστούν την πυκνότητα των ταινιών από τα τρία διαφορετικά πειράματα και παριστάθηκαν γραφικά σαν μέση  $\pm$  στάνταρτ απόκλιση.

## Αντίθετη αίσθηση Ολίγο-νουκλεοτιδίων

Τα PC-3 επεξεργάστηκαν με μία βάση 14 phosphorothioated αντίθετης αίσθησης ολίγο-νουκλεοτιδίων (5-CAGGTCGATGCCGA-3') για να μπλοκάρουν. Η SP 72 σύνθεση σε μία συγκέντρωση 40μM για 24 ώρες πριν την απορρόφηση της θερμότητας (είχαν συντεθεί από την Baylor Nucleic Acid Core Facility, Gibco, Paisley, UK).

Εφ' όσον καταγράφηκαν τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν, παρακάτω προχωράμε στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

#### Υλικο και μεθοδοι 4

Χρησιμοποιήθηκαν 30 περιστατικά καρκίνου του προστάτη.

Το δείγμα συγκεντρώθηκε από το προσωπικό αρχείο του κ.Κ.Αρβανιτη καθηγητή Ανατομικής και Εμβρυολογίας καθώς και από το αρχείο του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λαρίσας. Το υλικό συγκεντρώθηκε τυχαία χωρίς κάποιο κριτήριο(ηλικιας, τιμες, Gleason Scale, PSA ).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 1

Οι αποδέκτες ανδρογόνου κηλιδώθηκαν σε νουκλεοτίδια (πυρήνες) αδενικών επιθηλιακών κυττάρων στις τομές καλοήθους υπερπλασίας. Η κηλίδωση δεν παρατηρήθηκε στο κυτόπλασμα των αδενικών κυττάρων. Οι πυρήνες των κυττάρων που αντίκριζαν το lumen είχαν κηλιδωθεί περισσότερο έντονα παρά τα γειτονικά στην βασική μεμβράνη. Τα κύτταρα των στρωμάτων στην καλοήγη υπερπλασία έδειχναν μία παρόμοια ένταση κηλίδωσης (Εικ. 1).

Οι πυρήνες των καρκινικών κυττάρων έδειξαν θετικές κηλίδες, αλλά το κυτόπλασμα δεν εκθέσανε οποιοδήποτε σημάδι θετικής κηλίδωσης.

Στο συγκρότημα των πυρηνικών κυττάρων, ο αποδέκτης ανδρογόνου θετικών και αρνητικών κυττάρων ήταν αναμεμιγμένος (Εικ. 2).

Αν και ο αριθμός των κηλιδωμένων κυττάρων στο στρώμα ήταν λιγότερος από εκείνο της καλοήθους υπερπλασίας, θετική πυρηνική κηλίδωση στα κύτταρα των στρωμάτων ήταν παρούσα τριγύρω στα πυρηνικά κύτταρα, χαρακτηριστικά των οποίων ήταν παρόμοια με εκείνα της καλοήθους υπερπλασίας. Στον καρκίνο που υποτροπίασε, ο πληθυσμός των θετικών κυττάρων των αποδεκτών του ανδρογόνου είχε μειωθεί (Εικ. 3) όταν συγκρίθηκε με εκείνο του μη θεραπευμένου καρκίνου με ένα παρόμοιο σχέδιο Γκλίσον (Εικ. 2). Το ποσοστό των αποδεκτών ανδρογόνου των θετικών κυττάρων στην καλοήγη υπερπλασία και τον καρκίνο δείχνεται στο σχήμα 4. Μίας και τα αδύνατα θετικά κύτταρα αποδεκτών ανδρογόνου συχνά εμφανίζονται σε ιστούς που δεν έχουν στόχο (urothelium, πάγκρεας, και γαστρική βλέννα) και αδύναμη κηλίδωση παρατηρήθηκε σε ινώδεις ιστούς, θεωρήθηκε ότι η αδύνατη θετικά κηλίδωση περιελάμβανε μη-ειδική κηλίδωση.

Έτσι δυνατά θετικά κύτταρα μετρήθηκαν στους αποδέκτες θετικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα διαχωρίστηκαν σε 3 ομάδες σύμφωνα με την ταξινόμηση Γκλίσον. 30 περιπτώσεις από τις 63 μη θεραπευμένους καρκίνων προστάτη περιείχαν δύο (28 περιπτώσεις ) ή τρεις (3 περιπτώσεις) ξεχωριστών γκρουπ μέσα στα δείγματα και τα ατομικά γκρουπ απεικονίστηκαν ξεχωριστά.

Οι αναλογίες θετικών προς αρνητικά κύτταρα στα αδενικά επιθήλια της καλοήθους υπερπλασίας ήταν παρόμοια με αυτές του στρώματος. Σε μη θεραπευμένους καρκίνους, υψηλά ποσοστά θετικών κυττάρων παρατηρήθηκαν στα γκρουπ Γκλίσον 1+2, ακολουθούμενα από το γκρουπ Γκλίσον 3 και γκρουπ 4+5. Υποτροπιαζόμενοι καρκίνοι



Fig. 1. Hyperplastic human prostate. Androgen receptor was detected in nuclei of the glandular and stromal cells. In the gland, cells facing the lumen were stained more intensively than those adjacent to the basal membrane. Not counterstained.  $\times 200$ .

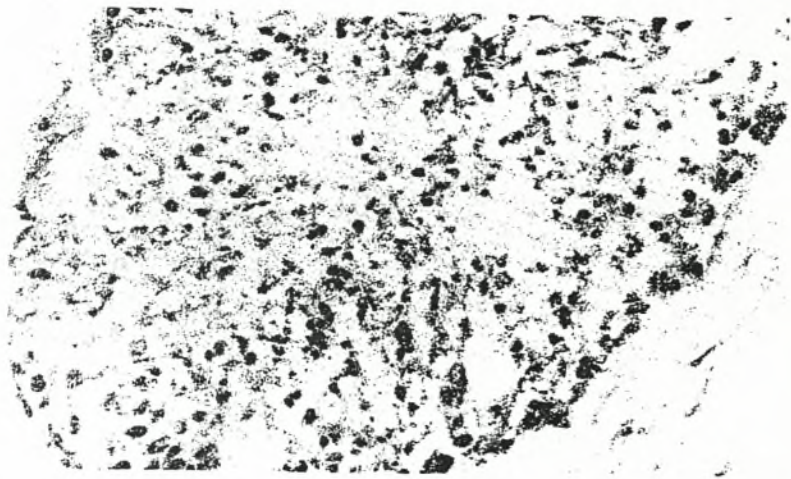


Fig. 2. Cribriform pattern (Gleason pattern 3) of prostatic cancer. Receptor-positive and -negative cells were mingled in the gland. Not counterstained.  $\times 200$ .

περιελάμβαναν δύο περιπτώσεις Γκλίσον 3 και έξι περιπτώσεις Γκλίσον γκρουπ 4+5. Όλες αυτές οι υποτροπιαζόμενες περιπτώσεις έδειξαν χαμηλά ποσοστά θετικών κηλιδωμένων κυττάρων ανεξαρτήτως βαθμού και ήταν παρόμοια με τους μη θεραπευμένους καρκίνους των γκρουπ Γκλίσον 4+5.

Εικ. 1: Υπέρ-πλαστικός ανθρώπινος προστάτης. Ο Αποδέκτης Ανδρογόνου, εντοπίστηκε στους πυρήνες των αδένων και στα στρωματικά κύτταρα. Στον αδένα, τα κύτταρα που «έβλεπαν» προς τα lumen κηλιδώθηκαν πιο έντονα από εκείνα τα γειτονικά στη βασική μεμβράνη. Δεν αντί-κηλιδώθηκαν X 200.

Εικ. 2: Σχέδιο Gibriform. (σχέδιο Γκλίσον 3) του προστατικού καρκίνου. Αποδέκτες θετικών και αρνητικών κυττάρων αναμείχθηκαν στον αδένα. Δεν αντί-κηλιδώθηκαν X 200.

Εικ. 3: Υποτροπιαζόμενος Προστατικός καρκίνος (Γκλίσον σχέδιο 3) Μειωμένος αριθμός αποδεκτών ανδρογόνου-θετικών κυττάρων. Δεν αντί-κηλιδώθηκαν X 200.

Εικ. 4: Ποσοστό των δυνατά θετικών κυττάρων στα αδενικά και στρωματικά κύτταρα από υπερπλαστικά προστατικά και καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Μη θεραπευμένα καρκινικά κύτταρα ταξινομήθηκαν από το σχέδιο Γκλίσον. Στατιστική ανάλυση (δύο δείγματα πειραμάτων t) μέσα στα καρκινικά γκρουπ: Γκλίσον 1+2 VS  $p < 0,01$ , 1+2 vs 4+5  $< 0,001$ , 1+2 vs Υποτροπιασμός  $r < 0,001$ , 3 vs. 4+5  $p < 0,001$ , 3 vs Υποτροπιασμός  $p < 0,001$ .



Fig. 3 Relapsed prostatic cancer (Gleason pattern 3). Decreased number of androgen receptor-positive cells. Not counterstained.  $\times 200$ .

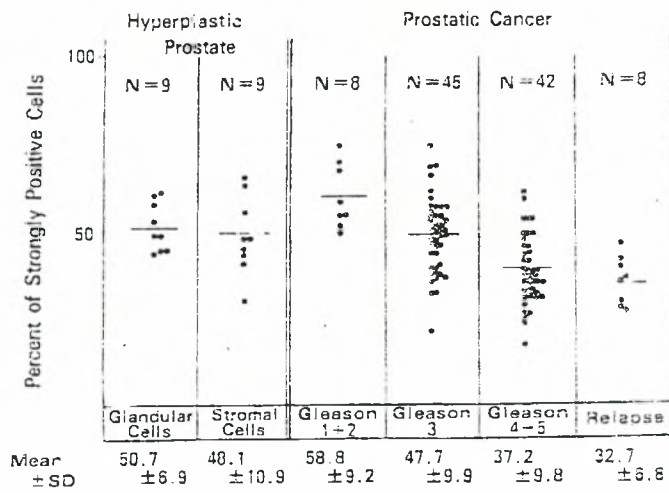


Fig. 4 Percent of strongly positive cells in the glandular and stromal cells from hyperplastic prostate and cancer cells of prostate. Untreated cancer cells were classified by Gleason pattern. Statistical analyses (two-sample t test) within cancer groups: Gleason 1 + 2 vs. 3  $p < 0.01$ , 1 + 2 vs. 4 + 5  $p < 0.001$ , 1 + 2 vs. Relapse  $p < 0.001$ , 3 vs. 4 + 5  $p < 0.001$ , 3 vs. Relapse  $p < 0.001$ .



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 2

Όλες οι αντικειμενοφόρες πλάκες του συστήματος δεν έδειξαν καθόλου κηλιδώσεις, δείχνοντας την απουσία μιας ειδικής δέσμευσης των δευτερευουσών αντισωμάτων στον ιστό του προστάτη. Επίμονα σχέδια των κηλιδώσεων του κυτταροπλάσματος βρέθηκαν σε όλα τα τμήματα του ιστού BPH και με τα δύο HSP 27 και 90 μονοκλωνιακά αντισώματα. Για την HSP 27 το στρώμα κηλιδώθηκε θετικά και το αδενικό επιθήλιο πάρα πολύ θετικά (Fig. 1).

Για την HSP 90, το στρώμα κηλιδώθηκε αρνητικά μέχρι αδύναμα θετικά με περισσότερο έντονη κηλίδωση του επιθηλίου (Fig. 2).

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες έδειξαν εσωτερική – επιθηλιακή νεοπλασία (PIN) του προστάτη δείχνοντας κηλιδώσεις της ίδιας έντασης όπως στις διπλανές περιοχές του BPH, πολύ δυνατά για HSP 27 και λιγότερο για HSP 90 (Fig. 3).

Η κηλίδωση του στρώματος CaP και για τις δύο HSP 27 και 90 ήταν παρόμοιας διανομής και εντονότητας όπως το στρώμα για τον ιστό BPH. Νεοπλαστικό επιθηλιακό κηλιδώμα για την HSP 27 αποκάλυψε μία μαρκαρισμένη ποικιλία σε εντονότητα κύτταρο-το κύτταρο, από αρνητική μέχρι δυνατά θετική.

Αυτό ήταν προφανές στα κύτταρα που ήταν πολύ κοντά το ένα με το άλλο, που το έκανε λιγότερο πιθανό να είναι artefact = αντίδραση (Fig. 4).

Τέτοια σχέδια κηλίδωσης υποδηλώνουν μαρκαρισμένη κυτταρική ετερογένεια, μη προφανής στην αιματοξυλίνη και στην κηλίδωση της eosin. Επίσης εμφανίστηκε να υπάρχει χάσιμο εντονότητας κηλίδωσης καθώς το σκορ του Γκλίσον αυξήθηκε.

Ο υψηλότερος βαθμός όγκου έδειξε επικρατέστερα αρνητικά κηλιδωμένα στρώματα φτωχών διαφοροποιημένων καρκινωμάτων και οποιαδήποτε προστατικούς πόρους μέσα στον τομέα όπου ήταν γεμάτοι με κανονικά θετικά κηλιδωμένο επιθήλιο (Fig. 5). Τα κύτταρα εμφανίστηκαν να χάνουν εντονότητα κηλίδωσης με εισβολή όγκου του περιβάλλοντος στρώματος. Η κηλίδωση CaP για την HSP 90 έδειξε κάποια ποικιλία κηλιδωμένων κυττάρων σε υψηλή μεγέθυνση αλλά αυτή ήταν λιγότερο μαρκαρισμένη από ότι για την HSP 27. Γενικά υπήρχε δυνατή κηλίδωση διαμέσου των βαθμίδων Γκλίσον (Fig. 6).

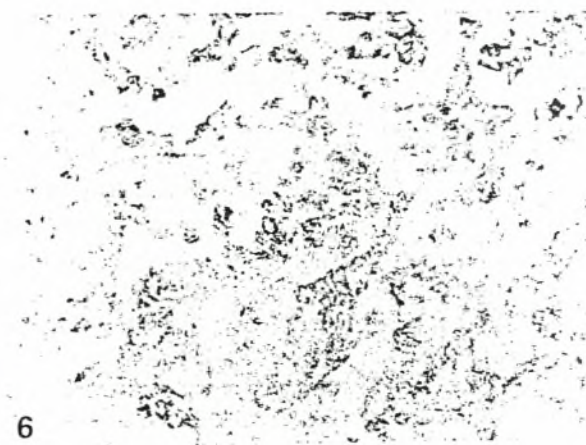
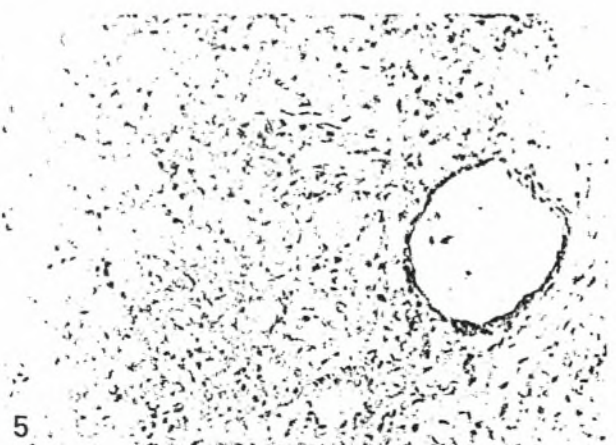
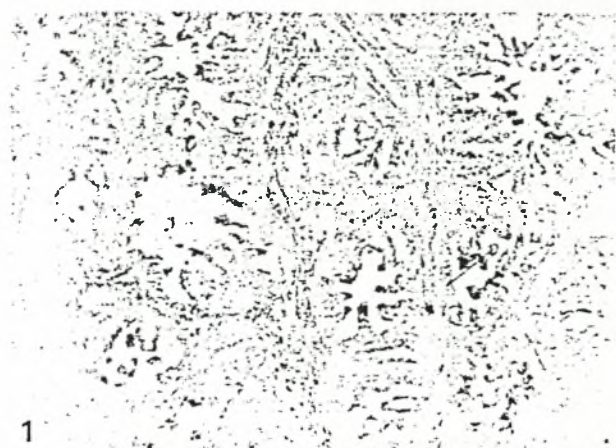


Fig. 1. Section stained for HSP 27; benign prostatic hyperplasia.  $\times 9$ .

Fig. 2. Section stained for HSP 90; benign prostatic hyperplasia.  $\times 9$ .

Fig. 3. Section stained for HSP 27; prostatic intra-epithelial neoplasia (Grade 2).  $\times 16$ .

Fig. 4. Section stained for HSP 27; prostatic carcinoma (Gleason Grade 5).  $\times 25$ .

Fig. 5. Section stained for HSP 27; prostatic carcinoma (Gleason Grade 8).  $\times 16$ .

Fig. 6. Section stained for HSP 90; prostatic carcinoma (Gleason Grade 6).  $\times 25$ .

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 3

#### HSP Έκφραση στα PC-3 και τα LNCaP κύτταρα

Τα PC-3 και LNCaP κύτταρα εκφράζουν βασικά επίπεδα HSP 27, 72 και 90, με χαμηλή έκφραση των HSP 27 και 72 που βρίσκεται στα LNCaP κύτταρα. Ζεσταίνοντας αυτά τα κύτταρα στους 42°C για 0,60 και 120 λεπτά επιφέρουν αυξημένη έκφραση των HSP 27 και 72 σε ένα τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο με καμιά αλλαγή για HSP 90. Οι μάξιμουμ αυξήσεις παρατηρήθηκαν σε 6 ώρες (Εικ. 1).

#### Επιρροές της HSP έκφρασης πάνω σε γημικές και ακτινοβολίας εξαρτώμενες αποπτώσεις.

Etoposide, DEM και cycloheximide όλες σημαντικά εξαρτώμενες αποπτώσεις σε έλεγχο PC-3 (Εικ. 2α) και LNCaP (Εικ. 2β) κυττάρων, που έχει προσδιοριστεί από propidium iodide κηλίδωση DNA. Η απόπτωση επίσης επιβεβαιώθηκε από μορφολογία (οι πληροφορίες δεν μας δείχθηκαν). Θερμαίνοντας από πριν κύτταρα για 60 και 120 λεπτά μείωσαν σημαντικά τις επιδράσεις του etoposide και DEM στα LNCaP κύτταρα. Αλλά αυτή η προστατευτική επίδραση βρέθηκε μόνο στα 60 λεπτά θερμότητας των PC-3 κυττάρων. Η HSP δεν προστατεύτηκε ενάντια στην cycloheximide – εξαρτώμενη απόπτωση (Εικ. 2 α, β). Τρεις Grays ακτινοβολίας επίσης προκάλεσαν αποπτώσεις στα PC-3 και LNCaP κύτταρα. Η HSP έκφραση είχε ένα παρόμοιο αποτέλεσμα – επίδραση στο να προστατευτεί ενάντια στην εξαρτώμενη από την ακτινοβολία απόπτωση (Εικ. 3).

#### Μηχανισμοί εντός του κυττάρου με τους οποίους η HSP μπορεί να ασκήσει προστατευτικές επιδράσεις.

Η ανάλυση των κηλίδων της Western έδειξε μία αύξηση εξαρτώμενη από το χρόνο στην έκφραση των Mcl-1, Bcl-2 και Bcl-XL μετά την αγωγή θερμότητας για 0,60 και 120 λεπτά στα PC-3 κύτταρα (Εικ. 4). Όπως με την HSP, τα μάξιμουμ αποτελέσματα βρέθηκαν στην επόμενη απορρόφηση θερμότητας των 6 ωρών. Παρόμοια αποτελέσματα

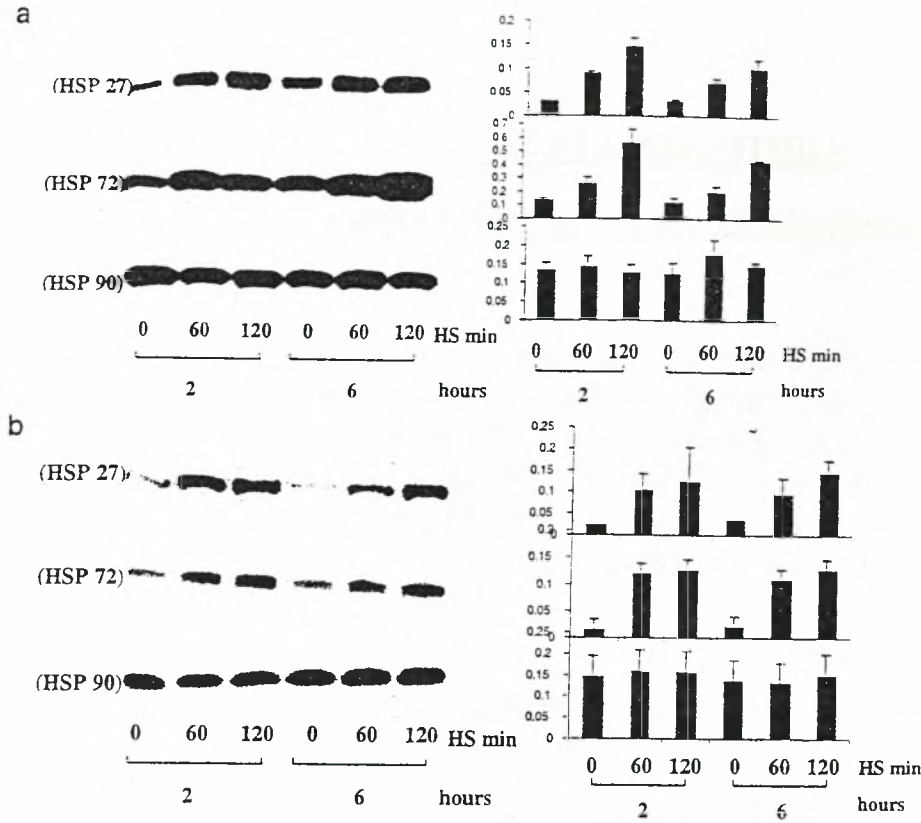


Fig. 1. Effects of heat shock on PC-3 (a) and LNCaP (b) expression of HSP 27, 72, and 90. PC-3 and LNCaP cells were cultured to confluence and heated to 42°C for 0, 60, and 120 min. Cells were then incubated at 37°C, and total protein was extracted at 2 and 6 hr. SDS-PAGE Western blotting was carried out to assess HSP 27, 72, and 90. Gels were developed using enhanced chemiluminescence. Blots represent 1 of 3 experiments. Graphs represent the density of bands from the three different experiments and are plotted as mean  $\pm$  standard deviation.

Fig. 2. Effects of heat shock protein expression on chemically induced apoptosis. PC-3 and LNCaP cells were cultured to confluence and heated to 42°C for 0, 60, and 120 min. Cells were incubated at 37°C for 6 hr and were subsequently treated with DEM (250  $\mu$ M), etoposide (60  $\mu$ M), and cyclohexamide (1  $\mu$ g/ml). Percent apoptosis of PC-3 cells (a) and LNCaP cells (b) was assessed after 3 days by PI DNA staining, using flow cytometric analysis. \* $P$  < 0.05 vs. untreated (0 min). \*\* $P$  < 0.05 vs. 0 min. Data represent mean  $\pm$  standard deviation,  $n$  = 5 separate experiments.

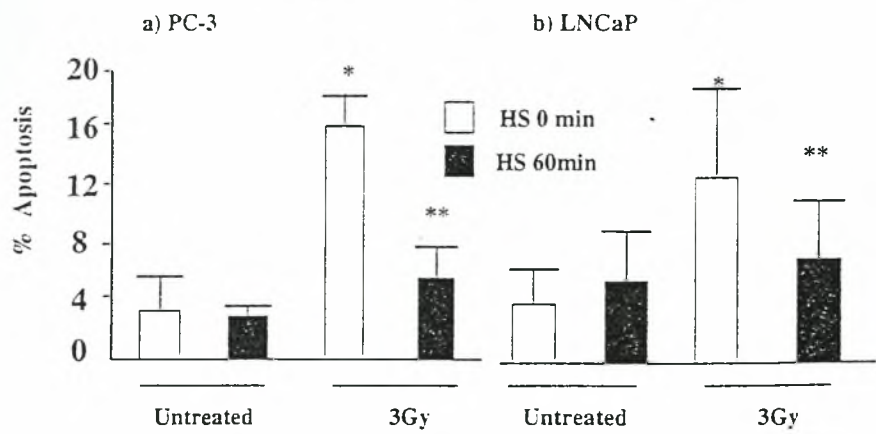
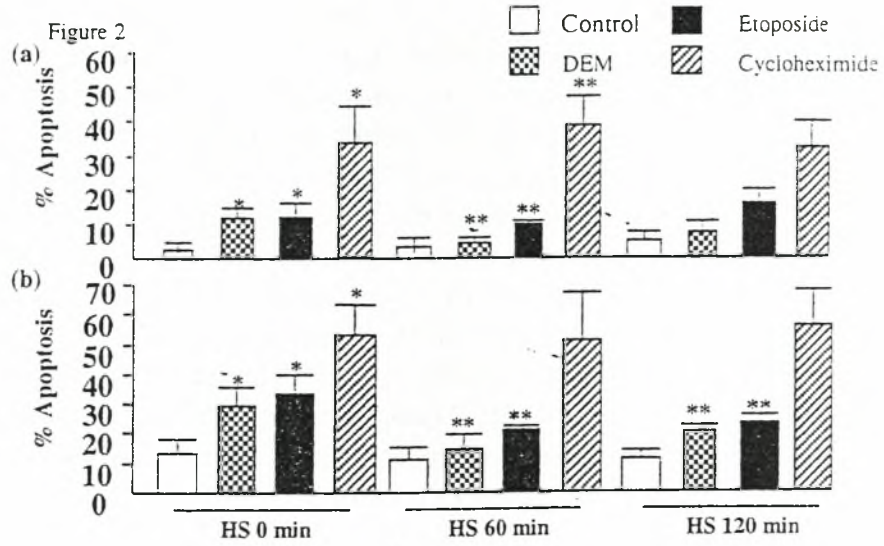


Fig. 3. Effects of heat shock protein expression on radiation-induced apoptosis. PC-3 and LNCaP cells were cultured to confluence and heated to 42°C for 0, 60, and 120 min. Cells were incubated at 37°C for 6 hr and were subsequently irradiated with 3 Gy. Percent apoptosis of PC-3 (a) and LNCaP (b) cells was assessed after 3 days, following radiation by PI DNA staining using flow cytometric analysis. \* $P$  < 0.05 vs. untreated (0 min). \*\* $P$  < 0.05 vs. 0 min, 3Gy. Data represent mean  $\pm$  standard deviation,  $n$  = 5 individual experiments carried out in triplicate.

βρέθηκαν στα LNCaP κύτταρα (οι πληροφορίες δεν το δείχνουν). Η εντός του κυττάρου γκλουταδιόνη (GSH) καθώς επίσης και η γκλουταδιόνη-S-transferase (GST) επίσης αυξήθηκαν μετά την αγωγή θερμότητας για 60 λεπτά συγκρινόμενη με τους ελεγχμούς (Εικ. 5 α, β).

## Εικόνα 2

Επιρροές της έκφρασης πρωτεΐνης της απορρόφησης θερμότητας πάνω σε χημικά προκαλούμενη απόπτωση. Τα PC-3 και τα LNCaP κύτταρα καλλιεργήθηκαν για να συμβάλλουν και να θερμανθούν στους 42°C για 0,60 και 120 λεπτά. Τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C για 6 ώρες και μετά επεξεργάστηκαν με DEM (250μM) etoposide (60μM) και cyclohexamide (1μg/ml). Η ποσοστιαία απόπτωση των PC-3 κυττάρων (α) και LNCaP κυττάρων (β) προσδιορίστηκε μετά 3 μέρες με PI DNA κηλίδωση, χρησιμοποιώντας ρέουσα κυττομετρική ανάλυση \*P < 0,05 vs μη-επεξεργαζόμενη (0 λεπτά) \*\*P < 0,05 vs 0 λεπτά. Οι πληροφορίες αναπαριστούν μέση ± στάνταρ απόκλιση, n=5 ξεχωριστά πειράματα.

Εικ. 3: Τα αποτελέσματα της έκφρασης απορρόφησης θερμότητας πρωτεΐνης πάνω σε απόπτωση απορρεόμενη ακτινοβολίας. Τα PC-3 και LNCaP κύτταρα καλλιεργήθηκαν για να συμβάλλουν και να θερμανθούν στους 40°C για 0,60 και 120 λεπτά. Τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C για 6 ώρες και μετά ακτινοβολήθηκαν με 3 Gy. Η ποσοστιαία απόκλιση των PC-3 (α) και LNCaP (β) κυττάρων προσδιορίστηκε μετά 3 μέρες ακολουθούμενη από ακτινοβολία με PI DNA κηλίδωση που χρησιμοποίησε ρέουσα κυττομετρική ανάλυση.

\*p < 0,05 vs μη επεξεργαζόμενη (0 λεπτά) \*\*p < 0,05 vs 0 λεπτά, 3Cy. Η μέση αναπαράσταση πληροφοριών ± στάνταρ απόκλιση, n=5 ατομικά πειράματα που διεξάχθηκαν εις τριπλούν.

### Μπλοκάροντας την HSP 72 έκφραση εμποδίζει την απορρόφηση θερμότητας – προστατευτική επίδραση.

Μη ειδική αναστολή της έκφρασης HSP 72 με cycloheximide (επωασμένη από πριν για 1 ώρα σε 1 mg/ml) εμπόδισε τα προστατευτικά αποτελέσματα της απορρόφησης θερμότητας (Εικ. 6). Αυτό το αποτέλεσμα υποστηρίχτηκε ακόμα περισσότερο από ειδικά μπλοκαρισμένη HSP 72 με αντι-αίσθηση ολιγονουκλεοτίδιο. Αυτό επίσης μείωσε την έκφραση της HSP 72 και το συσχετιζόμενο προστατευτικό αποτέλεσμα ενάντια στην etoposide προκλεινόμενη απόπτωση (Εικ. 7).

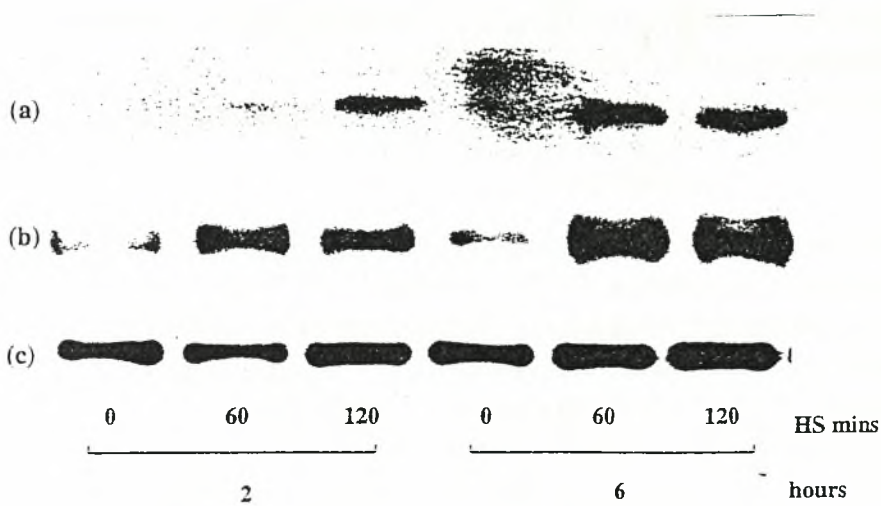
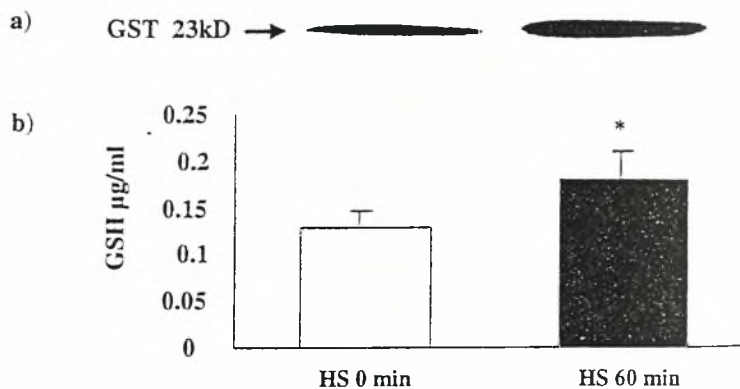


Fig. 4. Effects of heat shock on Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> expression in PC-3 cells. PC-3 cells were cultured to confluence and heated to 42°C for 0 and 60 min. Cells were then incubated at 37°C, and total protein was extracted at 2 and 6 hr. SDS-PAGE/Western blotting was carried out to assess Mcl-1 (a), Bcl-2 (b), and Bcl-X<sub>L</sub> (c) expression. Gels were developed using enhanced chemiluminescence. Blots represent 1 of 2 blots.

Fig. 5. Effects of heat shock on glutathione expression in PC-3 cells. PC-3 cells were cultured to confluence and heated to 42°C for 0 and 60 min. Cells were incubated at 37°C for 6 hr, after which protein was extracted. a: SDS-PAGE Western blotting was carried out to assess GST expression. Gels were developed using enhanced chemiluminescence. Gel represents 1 of 4 Western blots. b: Level of GSH in PC-3 cells was assessed using a colorimetric DTNB assay.  $P < 0.05$ ,  $P = 0.016$  vs. 0 min, statistical analysis by Student's *t*-test,  $n = 5$  individual experiments carried out in duplicate.



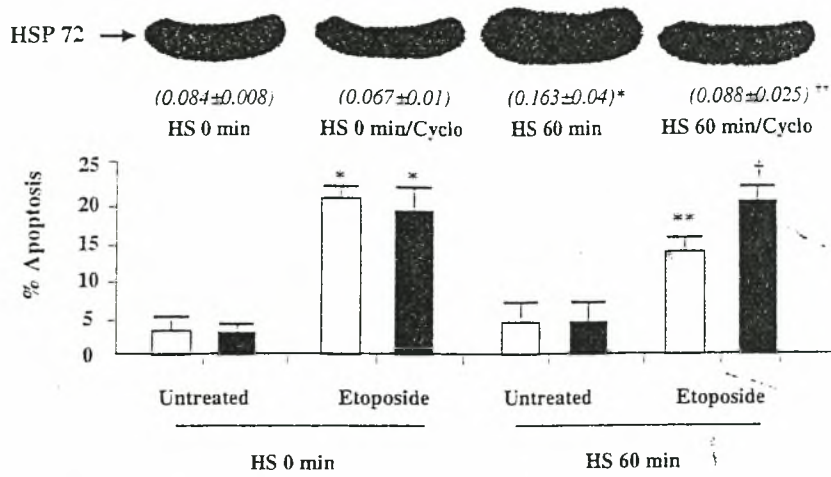


Fig. 6. Effects of cycloheximide treatment on heat-shock protein expression and chemically induced apoptosis. PC-3 cells were cultured to confluence, treated with (solid bars) or without (open bars) cycloheximide (1 μg/ml) for 1 hr. Cells were then washed with RPMI-1640 culture medium and heated to 42°C for 0 (HS 0 min) and 60 (HS 60 min) min. After 6 hr at 37°C, total protein was extracted from  $10 \times 10^6$  cells, and the remaining cells were treated with etoposide (60 μM). Western blotting was carried out and membranes were stained for HSP 72. Gel insert represents HSP 72 expression with from 1 of 3 blots. Numbers in parentheses represent density of expression. Percent apoptosis was assessed on day 3 by propidium iodide DNA incorporation. \* $P < 0.05$  vs. untreated HS (0 min). \*\* $P < 0.05$  vs. HS 0 min, cycloheximide-negative, etoposide. † $P < 0.05$  vs. HS 60 min, cycloheximide-negative, etoposide. †† $P < 0.05$  vs. HS 60 min, cycloheximide-negative. Data represent mean ± standard deviation,  $n = 3$  separate experiments carried out in duplicate.

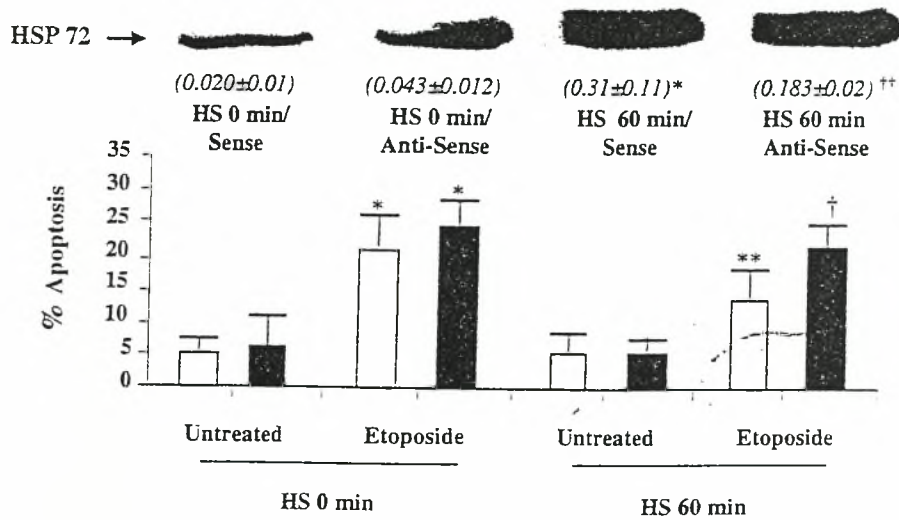


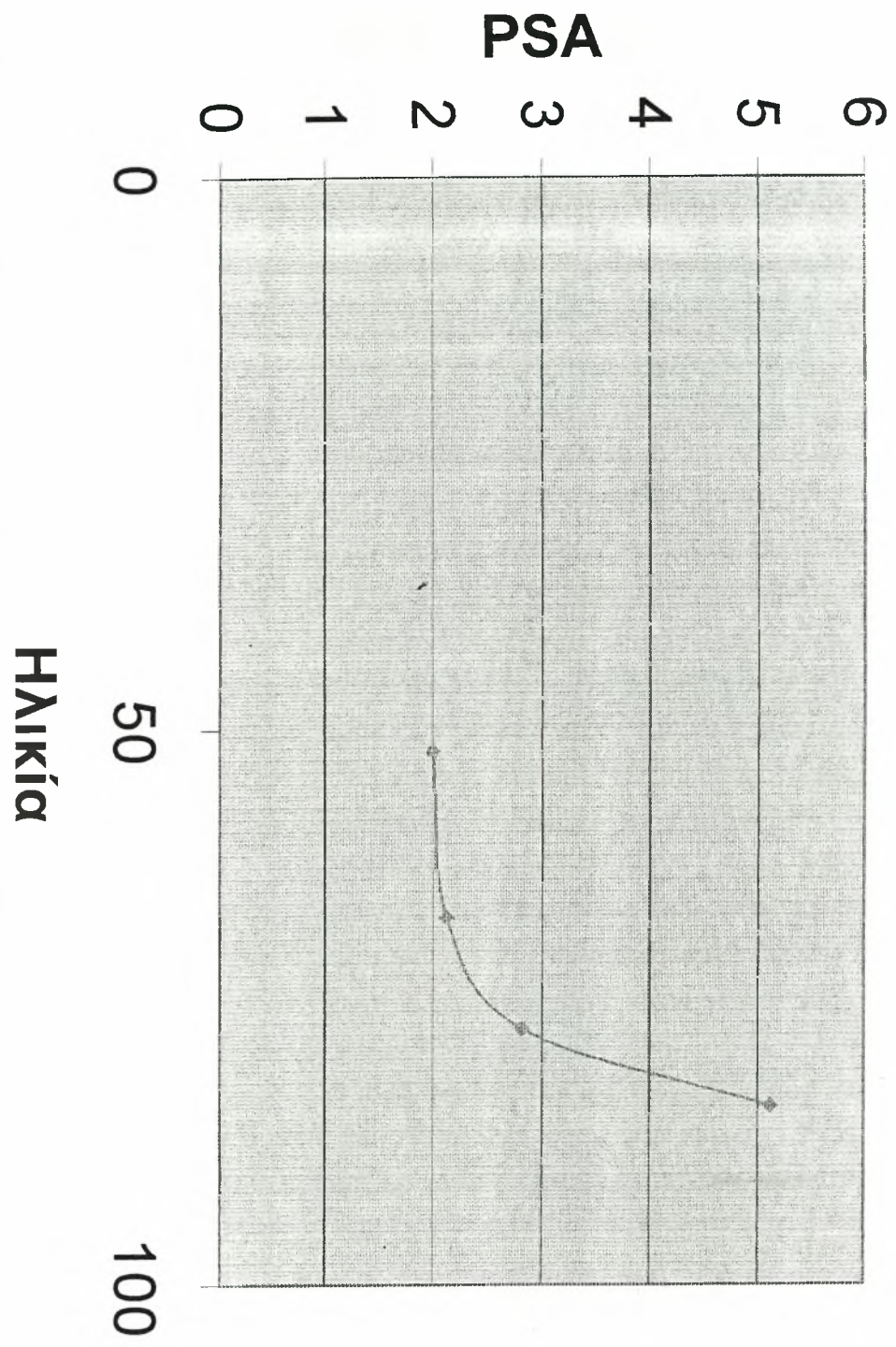
Fig. 7. Effects of antisense oligonucleotide 72 treatment on heat-shock protein expression and chemically induced apoptosis. PC-3 cells were cultured to confluence and then pretreated for 24 hr with antisense oligonucleotide (5'-TCGGCATCGACCTG-3', 40 μM) (solid bars) or sense oligonucleotide (40 mM) (open bars). Cells were then heated to 42°C for 0 (HS 0 min) or 60 (HS 60 min) min. Total protein was extracted from  $10 \times 10^6$  cells at 6 hr, with the remaining cells treated with etoposide (60 μM). Western blotting was carried out and membranes were stained for HSP 72. Gel insert represents HSP 72 expression from 1 of 3 blots. Numbers in parentheses represent density of expression. Percent apoptosis was assessed after 3 days, by propidium iodide DNA incorporation using flow cytometry. \* $P < 0.05$  vs. untreated HS (0 min). \*\* $P < 0.05$  vs. HS 0 min, sense, etoposide. † $P < 0.05$  vs. HS 60 min, sense, etoposide. †† $P < 0.05$  vs. HS 60 min, sense. Data represent mean ± standard deviation,  $n = 3$  separate experiments carried out in duplicate.

#### Αποτελέσματα 4 στατιστικής μελέτης

Τα στατιστικά αποτελέσματα από το τυχαίο δείγμα 30 ατόμων, που συλλέχθηκε από ασθενείς του νομού Λάρισας, παρίσταται γραφικά σε δύο καμπύλες. Η πρώτη καμπύλη 1 παριστά τη συσχέτιση του Μ.Ο των τιμών PSA και του σκορ που πιστοποιήθηκε παθολογοανατομικά με την κλίμακα Gleason, ενώ η δεύτερη παριστά τη συσχέτιση του Μ.Ο ηλικίας και του PSA. Παρακάτω απεικονίζονται οι δύο προαναφερθείσες καμπύλες 1 και 2.



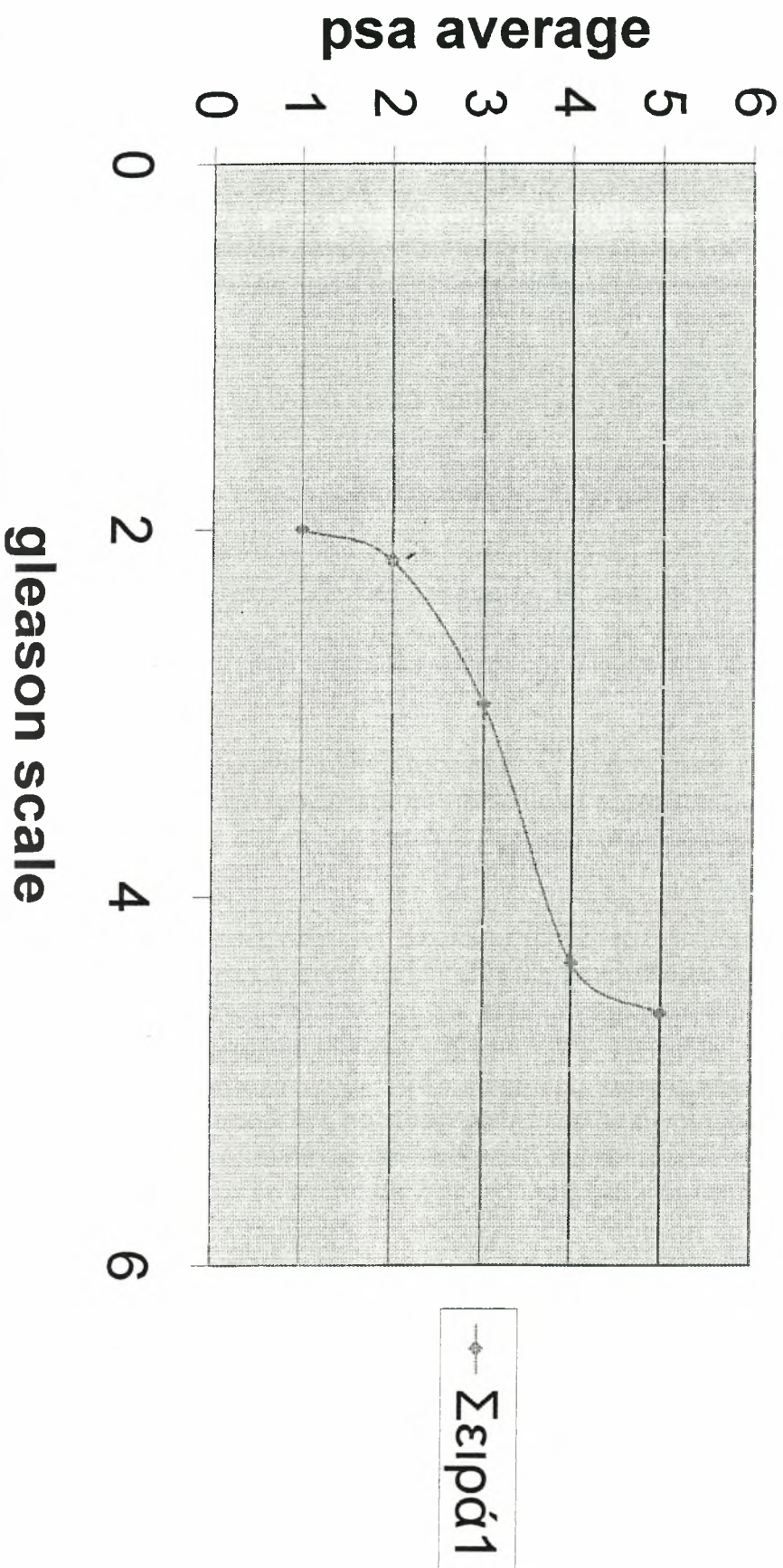
# Συσχέτιση ηλικίας-PSA



◆ Σειρά 1



# Συσχέτιση M.O PSA- Κλίμακας Gleason



Με τη συγκομιδή των αποτελεσμάτων προχωράμε στη συζήτηση και την επεξεργασία αυτών.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ 1

Μετά την ένεση με την ετικέτα τεστοστερόνη σε αρουραίους, η ραδιοακτινοβολία συγκεντρώθηκε στους πυρήνες και στις μικρές κύστες που περιέχουν σπέρμα υποδηλώνει πυρηνική συγκέντρωση των αποδεκτών ανδρογόνου και ligand bound [13]. Παρόμοια αποτελέσματα πάρθηκαν από καλοήθεις και κακοήθεις προστατικούς ιστούς μετά την επώαση με την ετικέτα dihydrotestosterone ή R 1881 σε vitro (14, 15).

Πυρήνες με ετικέτα στον υπερπλαστικό ανθρώπινο προστάτη, κυρίως εντοπίστηκαν στον αδενικό επιθήλιο και λιγότερο στο στρώμα [16, 17].

Μιας και η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για να παρατηρήσουμε συγκέντρωση αποδέκτη ανδρογόνου ήταν βασισμένη στην συγκέντρωση του ραδιοενεργού στεροειδούς, υποτίμηση των αποδεκτών μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα από παρέμβαση της δέσμευσης με ενδογενή ανδρογόνα.

Από το 1984, μονοκλωνικά αντισώματα ενάντια στους αποδέκτες οιστρογόνου έχουν χρησιμοποιηθεί για να εξεταστεί η εντόπιση αποδεκτών σε καλοήθεις και κακοήθεις ιστούς-οργάνων υπεύθυνα για τις ορμόνες. [18].

Πολλές αναφορές δείχνουν αποκλειστική εντόπιση του αποδέκτη οιστρογόνου στους πυρήνες [19-22]. Σε κανονικά θηλυκά σεξουαλικά όργανα από τον άνθρωπο και τον πίθηκο αποκαλύφθηκε ότι οι πυρήνες και των επιθηλιακών και των στρωματικών κυττάρων περιέχουν τον αποδέκτη οιστρογόνου [23, 24]. Αργότερα, μονοκλωνιακό αντίσωμα ενάντια στον αποδέκτη προτεστερόνης έδειξε την παρουσία του αποδέκτη στους πυρήνες των ενδο- και μυο-μετρικών κυττάρων του ανθρώπου [25]. Το αντίσωμα χρησιμοποιείται στην παρούσα αναφορά αποκλειστικά κηλιδωμένους πυρήνες καλοηθών και κακοηθών ανθρώπινων προστατών. Έτσι αυτό σημαίνει ότι είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό του αποδέκτη στεροειδών ορμονών. Το περιεχόμενο του αποδέκτη ανδρογόνου στο επιθήλιο και στους στρωματικούς ιστούς από τον υπέρ-πλαστικό ανθρώπινο προστάτη ήταν παρόμοιο με τις βιοχημικές αναλύσεις [26-29] και την παρούσα μελέτη που επίσης έδειξε σχεδόν παρόμοια κατανομή της κηλίδωσης σε αυτούς τους δύο ιστούς. Τα αδενικά κύτταρα που «βλέπουν» προς τα lumen περιέχουν περισσότερους αποδέκτες ανδρογόνου παρά τα βασικά κύτταρα και

αυτές οι παρατηρήσεις είχαν κιάλας γίνει χρησιμοποιώντας ετικέτα R 1881 [30]. Αν και είχε αναφερθεί ότι η ταξινόμηση του προστατικού καρκίνου δεν συσχετιζόταν με το ποσό του αποδέκτη ανδρογόνου [31, 32], τα παρόντα πειράματα αποκάλυψαν κάποια σχέση ανάμεσα στην ταξινόμηση και τον πληθυσμό του αποδέκτη ανδρογόνου θετικών κυττάρων και αυτό είναι συνεπές με την αναφορά του Brendler et al. [33], Lubann et al [34]. Χρησιμοποίησε ένα πολυκλωνικό αντίσωμα ενάντια σε 15 αμινοξέα του συνηθισμένου πεπτιδίου που απορρέει από αποδέκτη ανδρογόνου αρουραίου και ανθρώπου και έδειξε μία πυρηνική εντόπιση του αποδέκτη των αδενικών επιθηλιακών κυττάρων.

Του υπερπλαστικού ανθρώπινου προστάτη. Αυτοί οι συγγραφείς ανέφεραν μικρή κηλίδωση στους πυρήνες των στρωματικών κυττάρων.

Ο Chang et al. [35] αναφέρει ότι οι πυρήνες του αδενικού επιθηλίου ήταν περισσότερο κηλιδωμένοι από εκείνους των στρωματικών κυττάρων στον ανθρώπινο προστάτη. Η κηλίδωση των πυρήνων στα στρωματικά κύτταρα είναι σε αντίθεση με την παρατήρηση της παρούσας μελέτης. Οι λόγοι γι' αυτές τις διαφορετικές παρατηρήσεις δεν είναι καθαρές προς το παρόν αλλά οφείλονται σε διαφορές των ινο-μυών ενάντια στα συστατικά μέρη των αδένων της καλοήθους υπερπλασίας ή σε διαφορές στα αντισώματα. Στο γκρουπ του R 3327 Dunning, στο αδενοκαρκίνωμα του προστάτη του αρουραίου ο μη ευαίσθητος σε ανδρογόνο όγκος δεν δείχνει θετικά κύτταρα αποδέκτη ανδρογόνου που εξετάζονται από ανοσο-κυτο-χημική μέθοδο [36]. Στην παρούσα μελέτη, υποτροπιασμένος καρκίνος που ανθίσταται στην χρήση του ανδρογόνου, ο οποίος ακόμα περιέχει μερικά θετικά κύτταρα, κι αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την ετερογένεια των κυττάρων στον ανθρώπινο καρκίνο του προστάτη. Προηγούμενη κυτοπλασμική εντόπιση του R 1881 συνδέσμου πρωτεΐνης καλοηθών και κακοηθών ανθρώπινων προστατών αποδείχθηκε χρησιμοποιώντας φθορίζων R 1881 [37-39]. Μιας και ο δεσμός R 1881 του κυτοπλάσματος των κυττάρων του προστάτη είναι κυρίως αποδοτέος στην πρωτεΐνη με προγενετικό δεσμό [40] που είναι ένα είδος με διαφορετικά μόρια από τον αποδέκτη προτζεστερόνης [41] είναι λογικό ότι τα κηλιδωμένα μέρη ήταν διαφορετικά από εκείνα που είχαν αποδέκτη ανδρογόνο. Demura et al [42] κηλίδωσε αποδέκτη ανδρογόνου και στο κυτόπλασμα και στους πυρήνες των καλοηθών και μερικών κακοηθών ανθρώπινων προστατών χρησιμοποιώντας ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ενάντια στους αποδέκτες ανθρωπίνων ανδρογόνων. Μιας και το αντιγόνο που χρησιμοποιείται για την προετοιμασία του αντισώματος ήταν σχετικώς ακατέργαστο και η ειδικότητα του αντισώματος δεν αναφέρθηκε σ' αυτήν την αναφορά [43],

φαίνεται αβέβαιο αν η κηλίδωση αναγνώρισε τον αποδέκτη ανδρογόνου αποκλειστικά ή μη-ειδικούς ερίτορες επιπροσθέτως [44].

Φθορίζων dihydrotestosterone επίσης έδειξε κηλίδωση του κυττοπλάσματος και πυρήνες στα επιθήλια και στρωματικά κύτταρα των ανθρωπίνων προστατών [45, 46].

Έχει δειχθεί ότι άλλες πρωτεΐνες που δένονται στα ανδρογόνα σε ένα υψηλά-οργανικής σχέσης τρόπο είναι παρούσες στον ανθρώπινο προστάτη [47, 48]. Γι' αυτό το λόγο για κηλίδωση του αποδέκτη ανδρογόνου απαιτείται ένα αντίσωμα με υψηλή ειδικότητα για τον αποδέκτη.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ 2

Οι πρωτεΐνες που απορροφούν την θερμότητα είναι μία υψηλά διατηρημένο γκρουπ πρωτεϊνών ταξινομημένες σύμφωνα με το μοριακό βάρος τους, το οποίο προκαλείται από την έκθεση των κυττάρων τους σε θερμοκρασίες λίγων βαθμών πάνω από την φυσιολογική τους διακύμανση. Αυξημένη HSP σύνθεση και η απόκτηση της κυτταρικής αντοχής θερμότητας συσχετίζονται δυνατά υποστηρίζοντας την ιδέα ότι οι HSPS παίζουν έναν προστατευτικό ρόλο ενάντια στην κυτταρική εισβολή. Αυτό το φαινόμενο, όμως δεν είναι σε συγκεκριμένη θερμοκρασία. Τα κύτταρα εκτίθενται στην αιθανόλη, σε ανάλογα αμινοξέα – σε στέρηση γλυκόζης – σε επανατροφοδοτημένους κύκλους και σε επανα-οξυγόνωση ακολουθούμενη από κυτταρική έκθεση σε περιβάλλον χωρίς αέρα. Όλα αυτά προκαλούν επαγωγή [5].

Υποσημειώσεις φωτογραφιών:

Εικόνα 1: Τομέας κηλιδωμένος για HSP 27: καλοήθης υπερπλασία προστάτη X 9.

Εικόνα 2: Τομέας κηλιδωμένος για HSP 90: καλοήθης υπερπλασία προστάτη X 9.

Εικόνα 3: Τομέας κηλιδωμένος για HSP 27: εσωτερική – επιθήλια νεοπλασία προστάτη (Βαθμίδα 2) X 16.

Εικόνα 4: Τομέας κηλιδωμένος για HSP 27: καρκίνωμα προστάτη (Γκλίσον – Βαθμίδα 5) X 25.

Εικόνα 5: Τομέας κηλιδωμένος για HSP 27: καρκίνωμα προστάτη (Γκλίσον – Βαθμίδα 8) X 16.

Εικόνα 6: Τομέας κηλιδωμένος για HSP 90: καρκίνωμα προστάτη (Γκλίσον – Βαθμίδα 6) X 25.

Σε απουσία οποιουδήποτε σφοδρού παράγοντα, όλα τα κύτταρα εκδηλώνουν άφθονη έκφραση HSPS η οποία λαμβάνει μέρος σε ποικίλες λειτουργίες απαραίτητες για την βιωσιμότητα των κυττάρων κάτω από κανονικές συνθήκες ανάπτυξης.

Αυτές οι πρωτεΐνες λειτουργούν σαν «μοριακοί συνοδοί» μεσολαβούν για την συγκέντρωση και την πτύχωση άλλων πολυπεπτιδών διευκολύνοντας τον εσωτερικό-κυτταρικό εντοπισμό και εμπόδιση της μη κατάλληλης ενεργητικότητάς τους. Οι HSPS δεν προβάλλουν

δραστήρια την πληροφορία για πύκνωση των πρωτεϊνών ή την συγκέντρωση, ούτε ενοποιούνται για την τελική λειτουργική τους δομή [6].

Η HSP 90 περιλαμβάνει 1-2% της ολοκληρωτικής κυτοπλασμικής πρωτεΐνης κάτω από μη σφοδρές καταστάσεις, με κάποια επανεντόπιση στους πυρήνες κατά την διάρκεια απορρόφησης θερμότητας [7].

Η HSP 90 συσχετίζεται με ποικίλη κλίμακα κυτταρικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου γένεσης όγκου, πρωτεΐνες με δραστηριότητα, tyrosine kinase, κυτταρικές πρωτεϊνικές συγγένειες, F-actin, σωληνοειδείς και στεροειδείς αποδέκτες, (δες παρακάτω) [8]. Οι HSPS γενικώς εμπλέκονται στην συμμετοχή της ανοσοποιητικής αντίδρασης: *virally* και χημικώς παρακινούμενα κύτταρα όγκου εκφράζουν αυξημένα επίπεδα των HSPS και αυτές μπορεί να βοηθούν στην ασφαλή αναγνώριση και μεταγενέστερη απόρριψη των παραμορφωμένων κυττάρων [9].

Απότομη κλίση της σουκρόζης στη φυγοκέντριση μπορεί να θεραπεύσει δύο είδη στεροειδούς αποδέκτη από τα κύτταρα, έναν 95 unliganded ετερομετρικό σύμπλεγμα και ένα 45 σύμπλεγμα αποδέκτη ορμόνης, το οποίο μπορεί να αρχίσει αντιγραφή γονιδίων από μία υψηλή οργανική ομοιότητα δεσμευμένη στα στοιχεία αντίδρασης της ορμόνης (HRE) του D.N.A. Ο σύνδεσμος της HSP 90 συσχετίζεται με μία μη κατάσταση δεσμού του DNA και την παρουσία της ορμόνης που προωθεί την απόσπαση ενός HSP 90 / αποδέκτη. Η δέσμευση της θέσης της HSP 90 συμβαίνει μέσα στην επικράτεια της ορμονικής δέσμευσης του αποδέκτη, πιθανώς σε πολλές θέσεις επαφής. Ακολουθώντας την κυττοπλασμική σύνθεση του ανδρογενούς αποδέκτη, ο αποδέκτης επανατοποθετείται μέσα στον πυρήνα, όπου κρατείται σε ένα μη «ενεργοποιημένο» συγκρότημα «αποβάθρα». Αυτό το συγκρότημα περιέχει έναν αριθμό HSP 90 μορίων ανά αποδέκτη, επιπροσθέτως και μονών HSP 70, HSP 56-59 και μία πρωτεΐνη περίου 23 kDa.

Στην περίπτωση ενεργοποίησης ενός αποδέκτη, από δεσμό στεροειδούς, όλα αποσπώνται από τον αποδέκτη εκτός των HSP 70. Όμως, η HSP 70 δεν λαμβάνει μέρος στον δεσμό του αποδέκτη με το HRE (10). Η έκφραση του HSP 27 αυξάνεται μετά την απορρόφηση θερμότητας και την επαγωγή στενά συνδεδεμένων παραλλήλων, την αύξηση της κυτταρικής ανεκτικότητας στη θερμοκρασία. Ακολουθώντας την έκθεση στη θερμότητα, υπάρχει μία εσωτερική κυτταρική ινδο-μεταβίβαση από το κυτόπλασμα στα πυρηνικά τμήματα [11]. Η HSP 27 είναι ποιοτικά και ποσοτικά συσχετιζόμενη με τον αποδέκτη οιστρογόνου (ER) και ανάλυση της διακύμανσης των ανθρωπίνων ER-θετικών και αρνητικών

γραμμών των κυττάρων υποστηρίζει αυτήν την θετική σχέση [12]. Η HSP 27 αυξάνεται με οιστρογόνο σε ενδομετρικό επιθήλιο και επαναρυθμίζεται στα καρκινώματα του μαστού. Στον καρκίνο του μαστού η HSP 27 είναι ένας θετικός προβλεπόμενος παράγοντας αντίδρασης στην ενδοκρινική θεραπεία σε προχωρημένη αρρώστια [3]. Θετική κατάσταση ER προβλέπει καλό αποτέλεσμα για επιβίωση χωρίς την αρρώστια (DFs) και επιβίωση από τον πρώτο υποτροπιασμό (SR). Όμως η θετικότητα της HSP 27, παραδόξως προβλέπει παρατεταμένη SR αλλά μικρή DFS (13).

Ο δείκτης πρόγνωσης της HSP 27 έχει ερευνηθεί σε άλλες κακοήθειες, με αντικρουόμενα συμπεράσματα. Σε μερικούς ενδομετρικούς καρκίνους η θετικότητα συσχετίζεται με υψηλή διαφοροποίηση, μερικές μιτώσεις και ένα χαμηλό βαθμό πυρηνικού πλεομορφισμού [14]. Η HSP 27 αναφέρεται σαν έναν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη στο γαστρικό καρκίνωμα, αρνητική έκφραση που δείχνει αξιοσημείωτο πλεονέκτημα επιβίωσης πάνω σε θετικούς όγκους [15]. Αυξημένη έκφραση παρατηρείται σε υπατώματα (hepatomas) και καλά διαφοροποιούμενα υπατο-κυτταρικά καρκινώματα, αλλά φτωχά διαφοροποιούμενα υπατο-κυτταρικά καρκινώματα έχουν παρόμοιο περιεχόμενο HSP 27 που προβάλλει το κανονικό ιστό του συκωτιού [16]. Στην παιδική ηλικία λεμφο-πλαστική λευχαιμία, αξιοσημείωτα μείωσε λεμφοκυτταρικά HSP 27 επίπεδα που παρατηρήθηκαν σε νήπια συγκρινόμενα με επίπεδα άλλων παιδιών που γενικά είχαν μία πολύ πιο ευνοϊκή πρόγνωση και οι αναλογίες υποτροπιασμού ήταν υψηλότερες σε εκείνα στα οποία η έκφραση HSP 27 ήταν απύσα [17].

Την έκφραση μπορούμε να την δούμε σε όγκους πρώιμων σταδίων στους εγκεφάλους [18] και μηνιγγιώματα [19] αλλά η προγνωστική αξία των ανοσοποιημένων σχεδίων κηλίδων παραμένει αβέβαιη. Σε καρκίνωμα χολής, η κηλίδωση της HSP 27 δεν έδειξε καμία σχέση με βαθμίδα όγκου, στάδιο, τοπική επανεμφάνιση ή κατάσταση επιβίωσης. Στην ίδια μελέτη, η κηλίδωση της HSP 27 δεν φαίνεται σε κανονικούς ή καρκινικούς με φτιαγμένο σχήμα, σε σφηνωμένους σε παραφίνη ιστούς προστάτη, χρησιμοποιώντας το μονοκλωνιακό αντίσωμα G.3.1. [20]. Οι λειτουργίες της HSP 27 παραμένουν κατά μεγάλο μέρος άγνωστες και αυτές που αναφέρονται υποδηλώνουν μία έκδηλη ποικιλία. Αυτές περιλαμβάνουν μία αντίστροφη σχέση έκφρασης και τη γένεση του όγκου των ιών-αδένων των παραμορφωμένων κυττάρων [21], ο κατώτερος κανονισμός διάκριση και η έναρξη του G1 κύκλου κυττάρων συλλαμβάνουν τα B – λεμφοκύτταρα, τα κύτταρα των λεμφωμάτων, τους μακροφάγους [22], platelet δραστηριότητα με θρομβίνη [23] και απαλή σύσπαση μυών [24].



Η συσχέτιση με τον φώσφορο της HSP 27 συμβαίνει πάνω στη διέγερση των κυττάρων με παράγοντα ανάπτυξης που απορρέει από platelet, οξεία ανάπτυξη, ινώδης παράγοντας (fibroblast), μπραντικίνη [25] και παράγοντα αύξησης όγκου – β1 [26].

Το Interleukin 1 (ενδολευχαιμία) και η νέκρωση του όγκου παράγοντας διεγείρουν phosphorylation (συσχέτιση με φώσφορο), ως εκ τούτου εμπλέκουν την HSP 27 σε ένδειξη κυτταροκινητικής μεσολάβησης [27]. Όπως στις μεγαλύτερες οικογένειες των HSPS η απόδειξη υποδηλώνει ότι η HSP 27 λειτουργεί σαν μοριακός συνοδός. Υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές που συσχετίζονται με την HSP 27 σε ευαισθησία των κυττάρων στα ναρκωτικά. Και οι δύο αυξάνουν [28] και μειώνουν [12] αντίσταση στο doxorubicin έχουν δειχθεί σε κυτταρικές γραμμές καρκίνου στο μαστό. Η HSP 27 καταπνίγει την προκλεινόμενη θερμότητα συνολικά της b1-κρυσταλίνης και μαγιάσα-γλυκοσιντάσης, είναι ένας ικανός αναχαιτιστής της ελαστάσης και λειτουργεί σαν ένας δότης amine για διασταύρωση-σύνδεση πρωτεΐνης-τρανσγκλιουταμινάσης. Αυτό το τελευταίο ένζυμο εμπλέκεται στον έλεγχο θνησιμότητας κυττάρων, πρόοδο και αποδέκτης για μελετημένη ενδοκύττωση [29]. Επίσης η HSP 27 έχει συνδεθεί για σταθεροποίηση με μικρό λεπτό νήμα. Ακίντα (actin) ντεπολιμερισμού απαγορεύτηκε όταν ακολουθήθηκε από υποθερμία και οξεία έκθεση σε cytochalasin D [11]. Περιληπτικά, συσσωρευμένες αποδείξεις υποδηλώνουν ότι οι HSPS λαμβάνουν μέρος σε πολλές ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες κάτω και από κανονικές φυσιολογικές και υπό έντονες καταστάσεις.

Αυτές οι πανταχού παρόντες πρωτεΐνες εμπλέκονται σε πολυάριθμα στάδια κυτταρικού μεταβολισμού, σε πρωτεϊνικές βιοσυνθέσεις, κινήσεις και λειτουργίες, στο να μινιμοποιούν καταστροφές κυττάρων που προκαλούνται από περιβαντολογική αντιζοότητα και σκοπεύουν τα μικρομόρια για υποβιβασμό.

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ 3

Πολλαπλοί γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες έχουν εμπλακεί στην γένεση όγκου του καρκίνου του προστάτη [15, 16] αλλά οι μοριακοί μηχανισμοί υπογραμμίζουν την αρρώστια που παραμένει γενικώς άγνωστη. Καλύτερα γνωρίζουμε το προοδευτικό χάσιμο της αιμοστατικής ισορροπίας ανάμεσα στον υπολογισμό του κυττάρου και την απόπτωση. Πρόσφατα δεν είναι διαθέσιμος κανένας ανεξάρτητος δείκτης με τον οποίο να προβλέψουμε την συμπεριφορά κανενός ατομικού καρκίνου του προστάτη ή να αποφασίσουμε για την απόκριση του «οικοδεσπότη» στην κακοήθεια [16].

Είναι τώρα γενικά αποδεχόμενο ότι το δείκτη αύξησης του όγκου και η πρόοδος του κανονίζονται από το οριζόντιο ισοζύγισμα ανάμεσα στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την απόπτωση. Πρόσφατα, πολύ προσοχή συγκεντρώθηκε στον μοριακό έλεγχο της απόπτωσης και στις μεθόδους για να τροποποιηθεί το ισοζύγισμα ανάμεσα στον αυξανόμενο θάνατο του κυττάρου στον όγκο στην θεραπεία του κυττάρου. Αναλογίες απόπτωσης έχουν τροποποιηθεί κατά την διάρκεια προόδου προς το μέρος του μεταστατικού καρκίνου του ανθρώπινου προστάτη [2, 17, 18]. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι απόσυρση του ανδρογόνου από τον κανονικό ιστό του προστάτη έχει σαν αποτέλεσμα μαζικών θανάτων κυττάρου του επιθηλίου [18]. Η διαδικασία περιλαμβάνει μία γρήγορη αύξηση στην αντιγραφή των πολλαπλών γονιδίων που κανονικά καταπνίχθηκαν από την τεστοστερόνη [19] συμπεριλαμβανομένου *c-fos*, *c-myc* και TGF- $\beta$ . Αν και πολλοί ασθενείς με καρκίνο του προστάτη θεραπεύτηκαν με θεραπεία αντι-ανδρογόνου η μάζα των κυττάρων περιλαμβάνει οποιοδήποτε ατομικό καρκίνο είναι μία ετερογενής συλλογή, κάποιες από τις οποίες δεν βασίζονται στο ανδρογόνο για επιβίωση. Τα κύτταρα που είναι ανεξάρτητα από το ανδρογόνο γίνονται ανθεκτικά σε αποπτωτική επαγωγή, η οποία μπορεί να οφείλεται στην έκφραση των παραγόντων επιβίωσης. Μεταλλαγές της p53, παραπάνω έκφρασης του IGF, και Bcl-2 [3, 4, 16] όλες συσχετίζονται με πρόοδο προστατικού όγκου και επιβίωση.

Άλλες πρωτο-ογκογεννέσεις όπως *ras*, *c-myc* και *c-jun* δείχνουν ότι είναι αυξανόμενες σε PC-3 κύτταρα παραλλαγής, που απορρέουν σε αντίσταση σε χημιοθεραπεία πευτικές αποπτώσεις προκαλούμενες από φάρμακα [5]. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι αρκετοί ευδιάκριτοι μηχανισμοί μπορούν να προκαλέσουν ή να καταπνιχθούν για να επιφέρουν προγραμματιζόμενο θάνατο κυττάρων στον προστατικό καρκίνο.

Οι HSP, που παράγονται κάτω από συνθήκες κυτταρικού στρες, λειτουργούν σαν μοριακοί συνοδοί σε όλα τα κύτταρα σε φυσιολογικές θερμοκρασίες [6] και έχει δειχθεί ότι ρυθμίζουν κυτταρικές διαδικασίες θανάτου των κυττάρων. Παρά την ανίχνευση μερικών HSP στους όγκους καρκίνου του προστάτη [11] ο ρόλος τους σαν παράγοντας πιθανής επιβίωσης είναι άγνωστος. Στην παρούσα μελέτη, δείξαμε ότι οι γραμμές κυττάρων του προστάτη του καρκίνου που είναι ευαίσθητες (LNCaP) ή όχι στο ανδρογόνο (PC-3) εκφράζουν βασικά επίπεδα των HSP 27 και 72 στα PC-3 κύτταρα συγκρινόμενη με τα LNCaP κύτταρα. Αυτό μπορεί να συνεισφέρει στην αυξανόμενη αντίσταση στο etoposide και DEM που επιφέρει απόπτωση που φαίνεται στα PC-3 κύτταρα στην εικόνα 2. Το να ζεσταίνεις αυτά τα κύτταρα αυξάνει την έκφραση των HSP 27 και 72 σε έναν τρόπο ανεξαρτήτως χρόνου ου ήταν επομένως προστατευτικά ενάντια στην επαγωγή της απόπτωσης από χημικά και ακτινοβολία. Στον καρκίνο του μαστού έχει δειχθεί ότι η αυξανόμενη έκφραση των HSP 27 και 70 επίσης συσχετίζεται με μία αντίσταση στην χημειοθεραπεία και φτωχή πρόγνωση [20]. Η HSP 70 έχει επίσης δειχτεί να παρέχει αντίσταση στην ακτινοβολία και στην υπερ-θερμική θεραπεία για τον επαναλαμβανόμενο καρκίνο του μαστού (21). Το φαινόμενο της θερμο-άνεξης επίσης προμηθεύει με δυνατή απόδειξη ότι η HSP συνεισφέρει στην κυτταρική προστασία ενάντια σε βιολογικές προσβολές (6). Τα κύτταρα που ανέχονται την θερμοκρασία δείχνουν μία καλύτερη επιβίωση όταν επωάζονται με χημειοθεραπευτικά αντιδραστήρια. Αυτή η αυξημένη επιβίωση συσχετιζόταν με τη συσσώρευση παρακινούμενης HSP 70 (22). Η μελέτη μας επιβεβαιώνει ότι το προστατευτικό αποτέλεσμα είναι HSP – μελετημένη, καθώς μπλοκάροντας την σύνθεση της HSP 72, είτε μη-ειδική με cycloheximide ή ειδικότερα με την βοήθεια αντί-αίσθησης ολίγο-νουκλεοτιδίων, αναχαιτίζει αυτήν την αντίσταση.

Εικ. 4. Οι επιδράσεις της απορροφούμενης θερμότητας πάνω στο Bcl-2/Bcl-XI έκφραση των PC-3 κυττάρων. Τα PC-3 κύτταρα καλλιεργήθηκαν για να συμβάλλουν και να θερμανθούν στους 42°C για 0 και 60 λεπτά. Τα κύτταρα μετά επωάστηκαν στους 37°C και ολόκληρη η πρωτεΐνη αποσπάστηκε στις 2 και 6 ώρες. SDS-Page δυτική κηλίδωση διεξάχθηκε για να προσδιορίσει Mcl-1 (a) Bcl-2 (b) και BCL-XL (c) έκφραση. Τα τζελ αναπτύχθηκαν χρησιμοποιώντας αυξημένα chemiluminescence. Οι κηλιδώσεις αντιπροσωπεύουν μία από τις δύο κηλίδες.

Εικ. 5. Επιδράσεις απορρόφησης θερμότητας πάνω στην έκφραση γκλουταδιόνης σε PC-3 κύτταρα. Τα PC-3 κύτταρα καλλιεργήθηκαν για να συμβάλλουν και να θερμάνουν στους 42°C για 0 και 60 λεπτά. Τα

κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C για 6 ώρες, μετά από την οποία η πρωτεΐνη αποσπάστηκε. α) SDS-Page δυτική κηλίδωση διεξάχθηκε να προσδιορίσει έκφραση GST.

Τα τζελ αναπτύχθηκαν χρησιμοποιώντας αυξημένη chemiluminescence. Το τζελ αντιπροσωπεύει μία στις 4 δυτικές κηλίδες, β) επίπεδο της GSH σε PE 3 κύτταρα προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας Golorimetric DTNB πείραμα.  $P < 0,05$ ,  $p = 0,016$  vs. 0 λεπτά στατιστική ανάλυση από το μαθητικό t-τεστ, h=ατομικά πειράματα διεξαγμένα εις διπλούν.

Εικ. 6. Επιδράσεις της θεραπείας cycloheximide πάκοστων έκφραση πρωτεϊνών που απορροφούν θερμότητα και χημικά προκαλούμενη απόπτωση. Τα PC-3 κύτταρα καλλιεργήθηκαν να συμβάλλουν, επεξεργάστηκαν με (συμπαγείς ράβδοι) ή χωρίς (ανοικτές μπάρες) cycloheximide (1 μg/ml) για 1 ώρα. Τα κύτταρα δεν πλύθηκαν με RPMI-1640 με μέτρια καλλιέργεια και θερμαινόμενα στους 42°C για 0 (HS 0 λεπτά) και 60 (HS 60 λεπτά) λεπτά. Μετά 6 ώρες στους 37°C, η ολοκληρωμένη πρωτεΐνη αποσπάστηκε από  $10 \times 10^4$  κύτταρα και τα υπόλοιπα κύτταρα επεξεργάστηκαν με etoposide (60 μM). Η δυτική κηλίδωση διεξάχθηκε και οι μεμβράνες κηλιδώθηκαν για HSP 72.

Η προσθήκη του τζελ αντιπροσωπεύει HSP 72 έκφραση με μια στις 3 κηλίδες. Τα νούμερα στις παρενθέσεις αντιπροσωπεύουν πυκνότητα έκφρασης. Ποσοστιαία απόπτωση-προσδιορίζεται την τρίτη μέρα με συγχώνευση διαμέσου propidium iodide DNA \* $p < 0,05$  vs μη επεξεργαζόμενα HS (0 λεπτά) 88  $p < 0,05$  vs HS 0 λεπτά, cycloheximide-αρνητικό etoposide +  $p < 0,05$  vs HS 60 λεπτά, cycloheximide-αρνητικό etoposide ++  $p < 0,05$  vs HS 60 λεπτά, cycloheximide-αρνητικό. Οι πληροφορίες αναπαριστούν μέση  $\pm$  στάνταρ απόκλιση  $n=3$  ξεχωριστά πειράματα που διεξάγονται εις διπλούν.

Εικ. 7. Επηρεασμοί αντι-αίσθησης ολιγονουκλεοτίδων 72 επεξεργασίας πάνω στην έκφραση πρωτεΐνης απορρόφησης θερμότητας και χημικά προκαλούμενη απόπτωση. Τα PC-3 κύτταρα καλλιεργήθηκαν να συμβάλλουν και μετά να προ-επεξεργαστούν για 24 ώρες με αντι-αίσθησης ολίγο-νουκλεοτίδια (5' TCGGCA TCGACCTG – 3', 40 μM) (συμπαγείς ράβδοι) ή αίσθησης ολιγονουκλεοτίδιο (40 μM) (ανοικτές μπάρες). Τα κύτταρα μετά ξαναθερμάνθηκαν στους 42°C για 0 (HS 0 λεπτά) ή 60 (HS 60 λεπτά) λεπτά. Η ολοκληρωτική πρωτεΐνη αποσπάστηκε από  $10 \times 10^6$  κύτταρα σε 6 ώρες, με τα εναπομείναντα κύτταρα να επεξεργάζονται με etoposide (60 μM).

Η δυτική κηλίδωση διεξάχθηκε και οι μεμβράνες κηλιδώθηκαν για HSP 72. Η προσθήκη του τζελ αντιπροσωπεύει HSP 72 έκφραση από μία από

τις 3 κηλίδες. Τα νούμερα στις παρενθέσεις αντιπροσωπεύουν πυκνότητα έκφρασης. Η ποσοστιαία απόπτωση προσδιορίστηκε μετά από 3 μέρες, με propidium iodide DNA συγκώνευση χρησιμοποιώντας υγρή κυτομετρία, \*p < 0,05 vs μη επεξεργαζόμενα HS (0 λεπτά) \*\*p < 0,05 vs HS 0 λεπτά, αίσθηση, etoposide + <0,05 vs HS 60 λεπτά αίσθησης, etoposide ttp < 0,05 vs HS 60 λεπτά αίσθησης. Οι πληροφορίες αντιπροσωπεύουν μέση  $\pm$  στάνταρ απόκλιση, h = 3 ξεχωριστά πειράματα που διεξάγονται εις διπλούν.

#### Συζήτηση στατιστικής μελέτης 4

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αποδεικνύει ότι το PSA (prostate specific antigen) αυξάνεται ακολουθώντας μια σιγμοειδή καμπύλη σε σχέση με την κλίμακα Gleason, όπως παρίσταται στο διάγραμμα 1. Μια σταδιακή αύξηση παρουσιάζεται και στη συσχέτιση της ηλικίας με το PSA. Έτσι σύμφωνα με την καμπύλη παρατηρείται μια αύξηση του PSA σε άτομα που πάσχουν και έχουν μεγαλύτερη ηλικία. Φαίνεται λοιπόν ότι υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας, των τιμών του PSA και την κλίμακα Gleason. Κάτι τέτοιο βέβαια δεν είναι απόλυτο, μιας και ευρέθησαν που διαφωνούν με τα παραπάνω, όπως μεγάλο σκορ στην κλίμακα Gleason με μικρές τιμές PSA. Επομένως συμπεραίνουμε ότι η μέτρηση του PSA είναι μια καλή κλινική συγκατάθεση όσον αφορά την παρουσία Ca προστάτου, αλλά για την απόλυτη πιστοποίηση και παρακολούθηση απαιτούνται και άλλοι παράμετροι όπως ιστολογικές και κλινικές εξετάσεις. Αυτοί είναι οι λόγοι που η μέτρηση του PSA απέτυχε να εκτιμήσει με ακρίβεια την έκταση του καρκίνου του προστάτη. Αποτελεί βέβαια πρώιμη παρατήρηση της νόσου, αλλά καθώς τα επίπεδά του αυξομειώνονται σε άλλες παθήσεις όπως η αδενωματώδης υπερπλασία του προστάτη και σε φλεγμονές τύπου προστατίτιδας δεν είναι ικανό να παρακολουθήσει και να καταγράψει με ευαισθησία και ειδικότητα την πορεία της νόσου.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### **Androgen Receptor Immunohistochemistry**

2. Barrack ER, Tindall DJ: A critical evaluation of the use of androgen receptor assays to predict the androgen responsiveness of prostatic cancer. In Coffey DS, Bruchovsky N, Gardner Jr WA, Resnick MI, Karr JP (eds): "Current Concepts and Approaches to the Study of Prostate Cancer." New York: Alan R. Liss, Inc., / 1987. pp 155-187.
3. Ekman P: The application of steroid assay in human prostate cancer research and clinical management (Review). *Anticancer Res* 2: 163-172. 1982.
4. Renson Jr RC, Gorman PA, O'Brien PC, Holicky EL, Veneziale CM: Relationship between androgen receptor binding activity in human prostate cancer and clinical response to endocrine therapy. *Cancer* 59: 1599-1606. 1987.
5. Gorelic LS, Lamm DL, Ramzy I, Radwin HM, Shain SA: Androgen receptors in biopsy specimens of prostate adenocarcinoma. *Cancer* 60: 211-219. 1987.
6. Barrack ER, Bujnovszky P, Walsh PC: Subcellular distribution of androgen receptors in human normal, benign hyperplastic, and malignant prostatic tissues: Characterization of nuclear salt-resistant receptors. *Cancer Res* 43: 1107-1116. 1983.
7. Kyprianou N, Davies P: Association states of androgen receptors in nuclei of human benign hypertrophic prostate. *Prostate* 8: 363-380. 1986.
8. Greene GL, Sobel NB, King WJ, Jensen EV: Immunochemical studies of estrogen receptors. *J Steroid Biochem* 20: 51-56. 1984.
9. Chang C, Whelan CT, Popovich TC, Kokontiw J, Liao S: Fusion proteins containing androgen receptor sequences and their use in the production of poly- and monoclonal anti-androgen receptor antibodies. *Endocrinology* 123: 1097-1099. 1989.
10. Stefanini M, DeMartino C, Zamboni L: Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216: 173-174. 1967.
11. McClellan M, West NB, Brenner RM: Immunocytochemical localization of estrogen receptors in the Macaque endometrium during the luteal-follicular transition. *Endocrinology* 119: 2467-2475. 1986.
12. Gleason DF: Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 50: 125-136. 1966.
13. Sar M, Liao S, Stumpf WE: Nuclear concentration of androgens in rat seminal vesicles and prostate demonstrated by dry-mount autoradiography. *Endocrinology* 86: 1008-1011. 1970.

14. Beckman Jr WC, Mickey DD, Fried FA: Autoradiographic localization of estrogen and androgen target cells in human and rat prostate carcinoma. *J Urol* 133: 724-728, 1985.
15. Peters CA, Barrack ER: A new method for labeling and autoradiographic localization of androgen receptors. *J Histochem Cytochem* 35: 755-762, 1987.
16. Peters CA, Barrack ER: Androgen receptor localization in the human prostate: Demonstration of heterogeneity using a new method of steroid receptor autoradiography. *J. Steroid Biochem* 27: 533-541, 1987.
17. Barrack ER, Brendler CB, Walsh PC: Steroid receptor and biochemical profiles in prostatic cancer: Correlation with response to hormonal treatment. In Murphy GP, Khoury S, Kuss R, Chatelain C, Denis L (eds): "Prostate Cancer Part A: Research, Endocrine Treatment, and Histopathology." New York: Alan R. Liss, Inc., 1987, pp 79-97.
18. King WJ, Greene GL: Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 307: 745-747, 1984.
19. Press MF, Nousek-Goebel N, King WJ, Herbst AL, Greene GL: Immunohistochemical assessment of estrogen receptor distribution in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Lab Invest* 51: 495-503, 1984.
20. Shitaku IP, Said JW: Detection of estrogen receptors with monoclonal antibodies in routinely processed formalin-fixed paraffin sections of breast carcinoma. *J Clin Pathol* 87: 161-167, 1987.
21. Andersen J, Qrntoft T, Poulsen HS: Semiquantitative oestrogen receptor assay in formalin-fixed paraffin sections of human breast cancer using monoclonal antibodies. *Br J Cancer* 53: 691-694, 1986.
22. DeGoeij TFFM, Bosman FT: Determination of steroid hormone-dependency of tumours utilizing tissue sections. Survey of histochemical techniques and their application in surgical pathology. *J Pathol* 149: 163-172, 1986.
23. Press MF, Nousek-Goebel NA, Greene GL: Immunoelectron microscopic localization of estrogen receptor with monoclonal estrophilin antibodies. *J Histochem Cytochem* 33: 915-924, 1985.
24. McClellan MC, West NB, Tacha DE, Greene GL, Brenner RM: Immunocytochemical localization of estrogen receptors in the Macaque reproductive tract with monoclonal antiestrophilins. *Endocrinology* 114: 2002-2014, 1984.
25. Press MF, Udove JA, Greene GL: Progesterone receptor distribution in the human endometrium. *Am J Pathol* 131: 112-124, 1988.
26. Krieg M, Klotzl G, Kaufmann J, Voigt KD: Stroma of human benign prostatic hyperplasia: Preferential tissue for androgen metabolism and oestrogen binding. *Acta Endocrinol* 96: 422-432, 1981.



27. Bruner-Lorand J, Mechaber D, Zwick A, Hechter O, Eychenne B, Baulieu EE, Robel P: Characteristics of separated epithelial and stromal subfractions of prostate: I. Rat ventral prostate. *Prostate* 5: 231-254, 1984.
28. Lahtonen R, Bolton NJ, Konturi M, Vihko R: Nuclear androgen receptors in the epithelium and stroma of human benign prostatic hypertrophic glands. *Prostate* 4: 129-139, 1983.
29. Tilley WD, Horsfall DJ, McGee MA, Henderson DW, Marshall VR: Distribution of oestrogen and androgen receptors between the stroma and the epithelium of the guinea-pig prostate. *J Steroid Biochem* 22: 713-719, 1985.
30. Lasnitzki I, Takeda H, Mizuno T: Autoradiographic studies of androgen-binding sites in human benign prostatic hyperplasia in vitro. *J Endocrinol* 120: 167-170, 1989.
31. Habib FK, Odoma S, Busuttil A, Chisholm GD: Androgen receptors in cancer of the prostate. *Cancer* 57: 2351-2356, 1986.
32. Benson RC, Utz DC, Holicky E, Veneziale CM: Androgen receptor binding activity in human prostate cancer. *Cancer* 55: 382-388, 1985.
33. Brendler CB, Isaacs JT, Follansbee AL, Walsh PC: The use of multiple variables to predict response to endocrine therapy in carcinoma of the prostate: A preliminary report. *J Urol* 131: 694-700, 1984.
34. Lubahn DB, Joseph DR, Sar M, Tan J, Higgs HN, Larson RE, French FS, Wilson EM: The human androgen receptor: Complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol Endocrinol* 2: 1265-1275, 1988.
35. Chang C, Chodak C, Sarac E, Takeda H, Liao S: Prostate androgen receptor: Immunohistological localization and mRNA characterization. *J Steroid Biochem* 34: 311-313, 1989.
36. Quarmby VE, Beckman WC, Cooke DB, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS: Expression and localization of androgen receptor in the R-3327 Dunning rat prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 50: 735-739, 1990.
37. Naito H, Ito H, Wakisaka M, Kambegawa A, Shimazaki J: Histochemical observation of R 1881 binding protein in human benign prostatic hypertrophy. *Invest Urol* 18: 337-340, 1981.
38. Matsumura T, Naito H, Yamaguchi K, Ito H, Matsuzaki O, Kambegawa A, Shimazaki J: Histochemical observation of R 1881-binding protein in human prostatic cancer. *Urol Internat* 38: 25-28, 1983.
39. Ito H, Yamaguchi K, Sumiya H, Matsuzaki O, Shimazaki J: Histochemical study of R 1881-binding protein, prostatic acid phosphatase, prostate-specific antigen, and r-seminoprotein in prostatic cancer. *Eur Urol* 12: 49-53, 1986.

40. Yamaguchi K, Sumiya H, Fuse H, Matsuzaki O, Ito H, Shimazaki J : Androphilic protein studied histochemically in stage D2 prostatic cancer. *Cancer* 61: 1425-1429. 1988.
41. Akahura K, Kodama T, Akimoto S, Shimazaki J: Characteristics of progestin binder in hypertrophic human prostate. *Endocrinol Japon* 35: 899-906. 1988.
42. Demura T, Kuzumaki N, Oda A, Fujita H, Ishibashi T, Koyanagi T: Establishment and characterization of monoclonal antibody against androgen receptor. *J Steroid Biochem* 33: 845-851. 1989.
43. Demura T: Characterization and partial purification of androgen binding proteins from human prostates. *Folia Endocrinol* 62: 595-607. 1986 (in Japanese).
44. Liao S, Kokontis J, Sai T, Hiipakka RA: Androgen receptors: Structures, mutations, antibodies and cellular dynamics. *J. Steroid Biochem* 34: 41-51. 1989.
45. Pertschuk LP, Zava DT, Gactjens E, Macchia RJ, Wise GJ, Kim DS, Brigati DJ: Histochemistry of steroid receptors in prostatic diseases. *Ann Clin Lab Sci* 9: 225-229. 1979.
46. Pertschuk LP, Rosenthal HE, Macchia RJ, Eisenberg KB, Feldman JG, Wax SH, Kim DS, Whitmore Jr WF, Abrahams JI, Gaetjens E, Wise GJ, Herr HW, Karr JP, Murphy GP, Sandberg AA : Correlation of histochemical and biochemical analyses of androgen binding in prostatic cancer : Relation to therapeutic response. *Cancer* 49: 984-993. 1982.
47. Steins P, Krieg M, Hollmann HJ, Voigt KD: In vitro studies of testosterone and 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone binding in benign prostatic hypertrophy. *Acta Endocrinol* 75: 773-784. 1974.
48. Cowan RA, Cowan SK, Giles CA, Grant JK: Prostatic distribution of sex hormone-binding globulin and cortisol-binding globulin in benign hyperplasia. *J Endocrinol* 71: 121-131. 1976.

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- 1) Μόλερ Τζένσεν Ο. Στίβ J. Μόλερ Η. Renard Η. Καρκίνος στην Ευρ. Κοινότητα και τα κράτη μέλη της. Ευρωπαϊκός J. Καρκίνος 1990: 26: 1167-256.
- 2) Στατιστικές θνησιμότητας για την Αγγλία και την Ουαλία. Υπηρεσιακές και πληθυσμιακές απογραφές πληθυσμού και γκάλ.οπ 1990: σειρές DH2 NOYMEPO 17.
- 3) Κίνγκ R.J.B. Φίνλεϋ τζούνιορ. Κόφερ Αλ. Μίλις RR. Ρούμπεν SRD. Χαρακτηρισμός και βιολογική συσχέτιση του 29-kDa αποδέκτη οιστρογόνου – που συσχετίζεται με την πρωτεΐνη J. Στεροειδής Βιοχημεία 1987: 27: 471-5.
- 4) Λάϊ Β-Τα. Τσιν NW. Στάνεκ ΑΕ. Κέι W. Αάνκς KW. Ποσότητα και ενδοκυτταρικός εντοπισμός των 85K πρωτεΐνης που απορροφά την θερμότητα χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα. Mol Cells Biol 1984: 4: 2802-10.
- 5) Μπάρντον RH. Απορρόφηση θερμότητας και πρωτεΐνες απορρόφησης θερμότητας. Βιοχημεία J.. 1986: 240: 313-24.
- 6) Γκίδινγκ M-J. Σάμπρουκ J. Η πρωτεΐνη διπλώνεται σε ένα κύτταρο. Φύση 1992: 355: 33-45.
- 7) Κόλιερ WC. Σλέπιγκερ MJ. Η δυναμική κατάσταση των πρωτεϊνών απορρόφησης θερμότητας στους ινο-πλάστες του εμβρύου της κότας. J. Βιολογία κυττάρου 1986: 103: 1495-1507.
- 8) Λιντ-κουιστ Σ. Οι πρωτεΐνες που απορροφούν θερμότητα. Ann Rev. Τζένετ 1988/22: 631-77.
- 9) Κάουφμαν S. Οι πρωτεΐνες που απορροφούν θερμότητα και η αντίδραση της ανοσίας. Η ανοσία σήμερα 1990: 11: 129-36.
- 10) Πράτ WB. Έλεγχος της λειτουργίας του αποδέκτη στεροειδούς και μεταφορά του κυτοπλάσματος του πυρήνα από τις πρωτεΐνες που απορροφούν θερμότητα. Βιολογικές Εκθέσεις 1992: 14: 841-8.
- 11) Λαβουά J.N. Τζίνγκρας Μπρετόν G. Τανγκουέι R.M. Λάντρι J. Εισαγωγή του κινεζικού χάμστερ HSP 27 – έκφραση γονιδίων στα κύτταρα του ποντικίου παρέχει αντίσταση στην απορρόφηση θερμότητας. J. Βιολογική Χημεία 1993: 268: 3420-9.
- 12) Νταν D.K.. Γουέλαν RDH. Χιλ. Β.. Κίνγκ RJB. Σχέση των hsp και αποδέκτη οιστρογόνου σε ευαίσθητες και όχι ορμονικές κυτταρικές γραμμές J. Στεροειδής Βιοχημεία και Μοριακή Βιολογία. 1993: 46: 469-79.

- 13) Λαβ S, Κίνγκ R.J.B. Μια 27Kda πρωτεΐνη που απορροφά θερμότητα που έχει ανώμαλες προγνωστικές δυνάμεις σε πρώιμο και προχωρημένο καρκίνο μαστού. *Br. J. Καρκίνος* 1994; 69: 743-8.
- 14) Σλέτζ G.W., Ράμπη I, Ντρέσλερ L.G., Ντόρ FA, Άνταμς Dj, Μαγκκουαΐρ WL. Παρουσία μιας πρωτεΐνης ρυθμισμένης με οιστρογόνο σε ενδομετρικό καρκίνο. *Ομπστέτ Γυναικολογία* 1985; 66: 423-7.
- 15) Χάρισον JD, Τζόουις JA, Έλις I.D., Μόρις D.L., Αποδέκτης οιστρογόνου αντίσωμα D5 σε μία αρνητικά ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα στον γαστρικό καρκίνο. *Br. J. Χειρουργείο* 1991; 78: 334-6.
- 16) Ντέλχεϊ Μ, Γκάλμπις Β, Γκάλαντ Ρ., Μείρες Ν, Έκφραση 27 kDa, η πρωτεΐνη που απορροφά την θερμότητα ισο-σηματίζεται σε ανθρώπινους νεοπλαστικούς και μη νεοπλαστικούς ιστούς συκωτιού. *Ηπατολογία* 1992; 16: 382-9.
- 17) Στράλερ JR, Κουίκ R, Χάνας SM, Μειωμένη σχέση φωσφόρου της πρωτεΐνης που απορροφά θερμότητα (hsp 27) στην οξεία βρεφική λιμφοπλαστική λειχαιμία. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175: 134-42.
- 18) Καρο Μ, Χερζ F., Καρο S., Χιράνο Α, Έκφραση αντίδρασης στο στρες, πρωτεΐνη 27 που απορροφά θερμότητα σε όγκους ανθρώπινων εγκεφάλων: μία ανοσο-ιστο-χημική μελέτη. *Acta Neuropathol*; 1992; 83: 420-2.
- 19) Γιοκοχάμα Ν., Ιβάκι Τ., Γκόλντμαν JE, Τατεσέι J, Φουκονί Μ, Πρωτεΐνη μικρής απορρόφησης θερμότητας εκφράζεται σε μινιγκιώματα και σε granulo filamentous σιτυπολογισμό σωμάτων. *Aura Neuropathol (Νευροπαθολογία)* 1993; 85: 248-55.
- 20) Στόρμ F.K., Μάβι DM, Γκίλχριστ KW, Hsp 27 δεν έχει καμία διαγνωστική ή προγνωστική σημασία στους καρκίνους προστάτη ή σε καρκίνο κύστης. *Ουρολογία* 1993; 42: 379-82.
- 21) Ζαντέμα Α., Ντε Τζονγκ Ε., Λαρντενόγιε R., Βαν ντερ Eb, Η έκφραση της πρωτεΐνης hsp 27 που απορροφά θερμότητα και μία πολύπλοκη πρωτεΐνη 22 κιλοτονταλόν είναι αντιστρόφως συσχετιζόμενη με γεννητικότητα όγκου των κυττάρων μεταμορφωμένων από ιό αδένων J. *Virol*. 1989; 63: 3368-75.
- 22) Σπέκτορ NI, Ράιαν C., Σάμσον W., Λεβάν Η., Νάντλερ LM., Άριγκο AP, πρωτεΐνη που απορροφά θερμότητα είναι ένας μοναδικός δείκτης αναχαίτισης της αύξησης κατά τη διάρκεια της μακροφαγικής διαφοροποίησης των HL-60 κυττάρων. *J. Φυσιολογία κυττάρων* 1993; 156: 619-25.
- 23) Μέντελσον Mt, Zhu Y, Ο Νύ, S, Οι πρωτεΐνες των 29 kDa που φωσφορίζουν σε ανθρώπινες platelets ενεργεί θρομβώσεις είναι είδη αποδέκτη που συσχετίζεται με οιστρογόνο, 27 kDa πρωτεΐνες που απορροφούν θερμότητα. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1991; 88: 11212-6.
- 24) Μπιτάρ Κ.Ν., Χαμίνις Ms, Χάυατ Ν., Σίζ KB, Στράλερ JR, Hsp 27 είναι ένα ενδιάμεσο μιας σύσπασης ενός μαλακού μυ που στηρίζει. Σε απάντηση του Bombesin *Βιοχημική-Βιοφυσική Res Commun* 1991; 181: 1192-200.

- 25) Σακλατβάλα J., Καούρ P., Γκούντσον F. Συσχέτιση με φώσφορο της πρωτεΐνης με την μικρή απορρόφηση θερμότητας κανονίζεται από interleukin 1. Ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου, παράγοντες αύξησης bradykinin και ATP (ατροπίνη) Βιοχημείας 1991: 277: 63-42.
- 26) Σιμπανούμα M., Κουρόκι Νόουζ Κ. Η συσχέτιση με το φώσφορο που εξαρτάται από τον κύκλο των κυττάρων της Hsp 28 από την TGFβ1 και H2O2 σε κανονικά οστεοβλαστικά κύτταρα ποντικού (MC3T3-E1) αλλά όχι και στις RAS-μεταλλάξεις. Βιοχημεία-Βιοφυσική ReS Commun. 1992: 187: 1418-25.
- 27) Γκουέσντον F., Φρένσνεί N., Γουόλερ RJ, Ρόουλινσον L., Saklarvala J., Η Interleukin 1 και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου διεγείρουν δύο νέες πρωτεΐνες kinases που φωσφορίζουν τις πρωτεΐνες hsp 27 και b-ussein που απορροφούν θερμότητα. J. Βιολογία-Βιοχημεία 1993: 268: 4236-43.
- 28) Όστριτς S., Γουένγκ E.N, Κουί M., Χίλσενμπεκ SG, Όζμπορν CK, Φούκα SAW. Η πρωτεΐνη hsp 27 που απορροφά μικρή ποσότητα θερμότητας συσχετίζεται με την αύξηση και αντίσταση στα φάρμακα στις γραμμές των κυττάρων στον ανθρώπινο καρκίνο του μαστού. Καρκίνος Res 1993: 53: 4443-8.
- 29) Μέρη KB, Γκροένεν ΡΙΤΑ, Βούρτερ CEM et all. Δοκιμές και λειτουργικές ομοιότητες της α-κρυσταλλίνης των βοοειδών και πρωτεΐνης που απορροφά μικρή ποσότητα θερμοκρασίας J. Βιολογία Βιοχημεία 1993: 268: 1046-52.

## ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ

- S.A. Τόμας, MB, BS, FRCS – Ερευνητής Ουρολόγος.
- I.L. Μπράουν, BSc, MB, ChB, FRCPath, Σύμβουλος Παθολόγος.
- G.W. Χόλινς, RGN, BSc, Hons, Βιοχημεία PhD μαθητής.
- Δ. Κέρκ, M.A., D.M., FRCs, Σύμβουλος Ουρολογίας.
- R.J.B. Κίνγκ, BSc, MSc, PhD, DSc, Γκρουπ Κυτταρικής Ογκολογίας.
- R.E. Λικ, M.A., Dphil Οζον, υφηγητής στην Βιοχημεία.
- Αλληλογραφία: Dr. R.E. Λικ, Τμήμα Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Γλασκώβης G12 8QQ, U.S. Ηνωμένο Βασίλειο.



## ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Dr. I. Frazer (Department of Radiation Oncology, Mater Private Hospital, Dublin, Ireland). N.B.G. was a Zeveca / British Urological Foundatin Scholar, 1998-1999.

## REFERENCES

1. Foster CS, Comford P, Forsyth L, Djamgoz MBA, Ke Y. The cellular and molecular basis of prostate cancer. *Br J Urol* 1999; 83: 171-194.
2. Demmeade SR, Lin XS, Isaacs JT. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate* 1996; 28: 251-265.
3. Tenniswood M. Apoptosis, tumour invasion and prostate cancer. *Br J Urol* 1997; 79: 27-34.
4. Colombel M, Symmans F, Gil S, O'Toole KM, Chopin D, Benson M, Olsson CA, Korsmeyer S, Buttyan R. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein Bcl-2 in hormone refractory human prostate cancers. *Am J Pathol* 1993; 143: 390-400.
5. Lipponen P, Vesalainen S. Expression of the apoptosis suppressing protein Bcl-2 in prostatic adenocarcinoma is related to tumor malignancy. *Prostate* 1997; 32: 9-15.
6. Fuller KJ, Issels RD, Slosman DO, Guillet JG, Soussi T, Polla BS. Cancer and the heat shock response. *Eur J Cancer* 1994; 39: 1884-1891.
7. Perdrizet GA. Heat shock and tissue protection. *New Horizons* 1995; 3: 312-320.
8. Samali A, Cotter TG. Heat shock proteins increases resistance to apoptosis. *Exp Cell Res* 1996; 223: 163-170.
9. Galea-Lauri J, Richardson AJ, Latchman DS, Katz DR. Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with TNF-alpha and cycloheximide a possible role in immunopathology. *J Immunol* 1997; 157: 4109-4118.
10. Liossis SN, Ding XZ, Kiang JG, Tsokos GC. Over-expression of HSP 70 enhances the TCR/CD3 and fas / apo-1 / CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells. *J Immunol* 1997; 158: 5668-5675.

11. Thomas SA, Brown IL, Hollins GW, Hocken A, Kirk D, King RJ, Leake RE. Detection and distribution of heat shock proteins 27 and 90 in human benign and malignant prostatic tissue. *Br J Urol* 1996; 77: 367-372.
12. Coffey RNT, Watson RWG, Hegarty NJ, O'Neill A, Gibbons N, Brady HR, Fitzpatrick JM. Thiol mediated apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer* 2000; 88: 2092-2104.
13. Nakano M, Knowlton AA. Tumour necrosis factor- $\alpha$  confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiac myocyte. *Circulation* 1998; 97: 1392-1400.
14. Gordon SA, Hoffman RA, Simmons RL, Ford HR. Induction of heat shock protein 70 protects thymocytes against radiation induced apoptosis. *Arch Surg* 1997; 132: 1277-1282.
15. Tang DG, Porter AT. Target to apoptosis a hopeful weapon for prostate cancer. *Prostate* 1997; 32: 284-293.
16. Foster CS, Abel PD. Clinical and molecular techniques for diagnosis and monitoring of prostatic cancer. *Hum Pathol* 1992; 23: 395-401.
17. Issacs JT. Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. *Prostate* 1984; 5: 547-557.
18. Isaacs JT, Lumdmoo PI, Berges R, Martikainen P, Kyprianou N, English HF. Androgen regulation of programmed death of normal and malignant prostatic cells. *J Androl* 1992; 13: 457-464.
19. Montpetit ML, Lawless KR, Tenniswood M. Androgen repressed messages in the rat ventral prostate. *Prostate* 1986; 8: 25-36.
20. Fuqua Sa, Oesterreich S, Hilsenbeck SG, Von Hoff DD, Eckardt J, Osborne CK. Heat shock proteins and drug resistance. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 32: 67-71.
21. Liu FF, Miller N, Levin W, Zanke B, Cooper B, Henry M, Sherar MD, Pintilie M, Hunt JW, Hill RP. The potential role of HSP 70 as an indicator of response to radiation and hyperthermia treatments for recurrent breast cancer. *Int J Hyperthermia* 1996; 12: 197-208.
22. Roigas J, Wallen ES, Loening SA, Moseley PL. Effects of combined treatment of chemotherapeutics and hyperthermia on survival and the regulation of heat shock proteins in Dunning R3327 prostate carcinoma cells. *Prostate* 1998; 34: 195-202.
23. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124: 1-6.
24. Moul JW, Bettencourt MC, Sesterhenn IA, Mostofi FK, McLeod DG, Stivastava S, Bauer JJ. Protein expression of p53, Bcl-2 and Ki-67 (MIB-1)

- aw prognostic biomarkers in patients with surgically treated, clinically localized prostate cancer. *Surgery* 1996; 120: 159-167.
25. McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LW, Hsieh JT, Tu Sm. Expression of the protooncogene Bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 6940-6944.
  26. Berchem GJ, Bosseler M, Sugars LY, Voeller HJ, Zeitlin S, Gelmann EP. Androgens induce resistance to Bcl-2 mediated apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 1995; 55: 735-738.
  27. Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS, Buttyan R. Overexpression of Bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res* 1995; 55: 4438-4445.
  28. Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, Kitada S, Reed JC. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bax, Bcl-X, and Mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 1996; 148: 1567-1576.
  29. Watson RWG, Rotstein OD, Nathens AB, Dackiw APB, Marshall JC. Thiol-mediated redox regulation of neutrophil apoptosis. *Surgery* 1996; 120: 150-158.
  30. Li GC, Webb Z. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 3218-3222.
  31. Mitchell JB, Russo A. Thiols, thiol depletion, and thermosensitivity. *Radiat Res* 1983; 95: 471-485.
  32. Mirkovic N, Voehringer DW, Story MD, McConkey DJ, McDonnell TJ, Meyn RE. Resistance to radiation-induced apoptosis in Bcl-2-expressing cells is reversed by depleting thiols. *Oncogene* 1997; 15: 1461-1470.





## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Αρβανίτη καθηγητή ανατομικής, εμβρυολογίας ,ιστολογίας του πανεπιστημίου ιατρικής Λάρισας για την ευγενική του προσφορά όσο αφορά τα περιστατικά που εντάχθηκαν στη στατιστική μελέτη του νομού καθώς και για την καθοδήγηση σε θέματα που αφορούσαν την παρούσα εργασία.. ..

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Τηλ.: 74.760-61 ΛΑΡΙΣΑ

2410-565077

565078



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057241