ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Νέων Φαρμακευτικών Προϊόντων»

Κατεύθυνση: «Φαρμακολογία»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΓΕΝΩΣ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΟΥ ΥΔΡΟΘΕΙΟΥ ΣΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ»

Δαμοπούλου Γεωργία

Φαρμακοποιός

ΑΘΗΝΑ 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια απόκτησης Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στην ειδίκευση: «Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Νέων Φαρμακευτικών Προϊόντων», κατεύθυνση: «Φαρμακολογία», υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ανδρέα Παπαπετρόπουλου.

Έχοντας ολοκληρώσει έναν ακόμα κύκλο των φοιτητικών μου χρόνων θα ήθελα να αφιερώσω κάποιες σελίδες στο να ευχαριστήσω ξεχωριστά ανθρώπους που διαδραμάτισαν το δικό τους ρόλο στη μέχρι τώρα πορεία μου, πανεπιστημιακή και μη. Απολογούμαι εκ των προτέρων για την πιθανώς μεγάλη έκταση των συγκεκριμένων ευχαριστιών συγκριτικά με το συνηθισμένο.

Το πρώτο μεγάλο ευχαριστώ θα το απευθύνω στον κύριο Ανδρέα Παπαπετρόπουλο, επιβλέποντα καθηγητή μου τα τελευταία περίπου δυόμιση χρόνια σε προπτυχιακό και μεταπτυχιακό επίπεδο. Τον ευχαριστώ βαθύτατα για τη δυνατότητα που μου έδωσε να κατανοήσω τι σημαίνει εργασία σε ένα ερευνητικό εργαστήριο, καθώς και το έναυσμα να ασχοληθώ με εργαστηριακές μεθόδους και επιστημονικές ιδέες, που μπορεί μεν να μη χρησίμευσαν στη διπλωματική μου, αλλά σίγουρα μου προσέφεραν μεγάλη ευχαρίστηση και με έκαναν να καταλάβω, έστω και σε έναν ανεπαίσθητο βαθμό, την έννοια της έρευνας. Τον ευχαριστώ για το χρόνο που μου αφιέρωσε, τις συμβουλές του τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε επαγγελματικό και «ανθρώπινο» επίπεδο, τις δοκιμασίες στις οποίες με υπέβαλε και τελικά, για τη βοήθειά του να φέρω εις πέρας το πειραματικό κομμάτι της εργασίας μου και να αποκτήσω ένα μεταπτυχιακό δίπλωμα που θα μου είναι παραπάνω από χρήσιμο για τη μετέπειτα πορεία μου. Θαυμάζω τις γνώσεις του και τον ευχαριστώ για τις ευκαιρίες που μου παρείχε.

Συνεχίζοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κυρία Ανδρεάδου Ιωάννα και τον Επίκουρο Καθηγητή κύριο Δρακούλη Νικόλαο, για τις διορθώσεις και τις πολύτιμες συμβουλές τους όσον αφορά στο γραπτό κομμάτι της εργασίας μου.

Ιδιαιτέρως, ένα βαθύτατο ευχαριστώ στην κυρία Ανδρεάδου για τη στήριξή της κατά τη διάρκεια των πρώτων μηνών του μεταπτυχιακού μου προγράμματος και για την προθυμία της να ακούσει τα προβλήματα που αντιμετωπίζαμε ως φοιτητές. Της εκφράζω την εκτίμησή μου για τη δυνατότητά της να επικοινωνεί με τους φοιτητές και να τους καθοδηγεί.

Ένα ευχαριστώ είναι λίγο στην υποψήφια διδάκτορα Παυλίδου Θάνη. Επί ένα χρόνο υπήρξε το άτομο με το οποίο είχα καθημερινή επαφή και χωρίς το οποίο η διεκπεραίωση αυτής της εργασίας θα ήταν σαφώς πιο δύσκολη. Την ευχαριστώ για την καθοδήγησή της, τις επιστημονικές συμβουλές της, τη διαρκή στήριξή της, την εμπιστοσύνη της, τη φιλία της, την υπέροχη ατμόσφαιρα μέσα στην οποία δούλευα για τόσους μήνες και για άλλα τόσα πράγματα που δεν αποτυπώνονται στο χαρτί. Οι εμπειρίες μου μαζί της θα μου μείνουν αξέχαστες.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τον ερευνητή Zongmin Zhou για την ανά πάσα στιγμή διαθεσιμότητά του και προθυμία του να μου καλύψει τις απορίες και να με καθοδηγήσει. Υπέροχος άνθρωπος και επιστήμονας, τον ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου.

Την υποψήφια μεταδιδάκτορα Μπιμπλή Ίριδα ευχαριστώ θερμά για τη βοήθειά της τους πρώτους μήνες του «πειραματισμού» μου. Συνετέλεσε από τη μεριά της στο να μάθω να σκέφτομαι επιστημονικά και μεσολάβησε στο να μάθω τεχνικές που μπορεί να μη χρησιμοποιήσω ποτέ, αλλά σίγουρα με βοήθησαν στο να αποκομίσω κάποια πράγματα. Ευχαριστώ για την επιμονή και τη βοήθειά της προς το άτομό μου, καθώς και την εμπιστοσύνη της σε εμένα.

Την υποψήφια μεταδιδάκτορα Χατζηαναστασίου Νάσα ευχαριστώ πολύ για το χρόνο που μου αφιέρωσε στο να μάθω τεχνικές στα πειραματόζωα, μοντέλο με το οποίο πάντοτε ήθελα να έρθω σε επαφή.

Κλείνοντας με το πρώτο αυτό κομμάτι, ένα μεγάλο ευχαριστώ (αλφαβητικά) στα μέλη λοιπών εργαστηριακών ομάδων Αγιουτάντη Παναγιώτη, Μαγκούτα Σοφία, Μανιτσόπουλο Νίκολας και Νικητοπούλου Ιωάννα. Σε ανθρώπους που δημιουργούσαν ένα ευχάριστο καθημερινό κλίμα και ήταν εκεί για να προσφέρουν απλόχερα τη δική τους βοήθεια δεν είναι δίκαιο να μην αναφερθώ ονομαστικά. Τους ευχαριστώ και πάλι.

Πριν προχωρήσω στο επόμενο κομμάτι, αυτό της οικογένειας και των φίλων μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω δύο ξεχωριστά για εμένα άτομα που εμπλέκονται και στο πρώτο και στο δεύτερο κομμάτι των ευχαριστιών, γι' αυτό και τους τοποθετώ ανάμεσα. Αφενός, την υποψήφια μεταπτυχιακή φοιτήτρια και αδελφική μου φίλη Κουτσιλιέρη Στεφανία την ευχαριστώ για όλα. Είχα την τύχη να διανύσω μαζί της όλα μου τα προπτυχιακά και μεταπτυχιακά χρόνια και αν επεκτεινόμουν πολύ οι ευχαριστίες προς το πρόσωπό της θα ξεπερνούσαν το υπόλοιπο κομμάτι της εργασίας μου. Ευχαριστώ για τη φιλία της, την αμέριστη ψυχολογική της στήριξη, την πίστη της σε εμένα, τις υποδείξεις της, τη βοήθειά της σε κάθε επίπεδο και τις στιγμές που έχω χτίσει μαζί της, εντός και εκτός πανεπιστημιακού χώρου. Ό,τι έχω καταφέρει το έχω μοιραστεί μαζί

της, φέρει κομμάτι της επιτυχίας μου και την ευχαριστώ ολόψυχα για το ότι έκανε αυτά μου τα χρόνια να κυλήσουν τόσο ευχάριστα.

Αφετέρου, τον «αιώνιο» καθηγητή μου Εφεντάκη Δημήτρη ευχαριστώ για οτιδήποτε έχω πετύχει μέχρι πρότινος. Ήταν ο πρώτος καθηγητής που με ενέπνευσε, με έκανε να πιστέψω στον εαυτό μου και να με θεωρήσω ικανή να πετύχω τον κάθε μου στόχο, όσο ψηλά και αν βρίσκεται. Ένας εξαίρετος άνθρωπος και καθηγητής που είχα την ευκαιρία να γνωρίσω και που δε θα ξεχάσω ποτέ. Τον ευχαριστώ για τη δική του συμβολή στο να γίνω η φοιτήτρια και ο άνθρωπος που είμαι.

Φτάνοντας προς το τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, τους γονείς, τους παππούδες και τον αδερφό μου. Τους ευχαριστώ που δεν έπαψαν να πιστεύουν σε εμένα, που με αφήνουν να παίρνω τις δικές μου αποφάσεις και που με στηρίζουν σε όποιο επόμενο βήμα και αν επιλέξω. Ευχαριστώ για τις αρχές μέσα στις οποίες με μεγάλωσαν, τη διαρκή τους βοήθεια σε κάθε τομέα και, κυρίως, για όλα αυτά που έχουν ανεχτεί και την ψυχολογική τους στήριξη σε περιόδους άγχους και δυσκολιών.

Τέλος…Θα ήταν άδικο εάν δεν απηύθυνα προσωπικά ένα από τα μεγαλύτερα, εάν όχι το μεγαλύτερο, ευχαριστώ σε όλους μου τους φίλους και ειδικά σε αγαπημένα μου πρόσωπα που με ανέχτηκαν, με στήριξαν, με διασκέδασαν, με βοήθησαν, με διαμόρφωσαν σαν άνθρωπο, συνετέλεσαν στη μέχρι τώρα πορεία μου και, με το δικό του τρόπο ο καθένας, με έκαναν να πιστέψω στον εαυτό μου, να αντεπεξέλθω σε κάθε δυσκολία που μου προέκυψε και να καταφέρω να φτάσω στο σημείο όπου βρίσκομαι. Είμαι παραπάνω από τυχερή που έχω βρει μια δεύτερη οικογένεια, χωρίς την οποία δε θα είχα καταφέρει ούτε τα μισά. Ένα ευχαριστώ από τα βάθη της ψυχής μου (αλφαβητικά) στον Αλέξανδρο, τη Βάσια, τον Ερρίκο, την Καίτη, τη Μαρίνα και διάφορα ακόμα πρόσωπα για όλα αυτά που μου έχουν προσφέρει, τις εμπειρίες και στιγμές που έχω μοιραστεί μαζί τους και τη δύναμη που μου δίνουν καθημερινά.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 1
ABSTRACT 3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 5
1.1. Καρκίνος των ωοθηκών 5
1.2. Καρκίνος του προστάτη 9
1.3. H_2S: ο τρίτος αέριος διαβιβαστής 17
1.3.1. Ενδογενής βιοσύνθεση και καταβολισμός του H_2S 18
1.3.2. Βασικότερα σηματοδοτικά μονοπάτια του H_2S 21
1.4. H_2S και καρκίνος 23
1.4.1. Αλλαγές στην έκφραση των ενζύμων βιοσύνθεσης H_2S στον καρκίνο 24
1.4.2. Ο ρόλος του ενδογενούς H_2S στον καρκίνο 24
1.4.2.1. Μηχανισμοί προκαρκινικής δράσης 24
1.4.2.2. In vitro και in vivo μελέτες για το ρόλο του ενδογενούς H_2S στον καρκίνο 26
1.4.2.3. Φαρμακολογικό προφίλ των αναστολέων AOAA και PAG 29
1.4.3. Ο ρόλος του εξωγενούς H_2S στον καρκίνο 34
1.4.3.1. Μηχανισμοί αντικαρκινικής δράσης 35
1.4.3.2. Φαρμακολογικό προφίλ των δοτών H_2S 36
1.4.3.3. In vitro και in vivo μελέτες για το ρόλο του εξωγενούς H_2S στον καρκίνο 41
2. ΣΚΟΠΟΣ 47
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 48
3.1. Διαδικασίες κυτταροκαλλιέργειας 48
3.2. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot analysis) 50
3.3. Χορήγηση ουσιών στα καρκινικά κύτταρα 59
3.4. Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού (μέθοδος MTT) 61
3.5. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων 65
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 66
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ 78
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 84

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες ενδελεχής έρευνα έχει πραγματοποιηθεί στο πεδίο που αφορά στους αέριους διαβιβαστές. Πέραν του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και του μονοξειδίου του άνθρακα (CO), το ενδιαφέρον έχει στραφεί προς το υδρόθειο (H_2S), τον τρίτο αέριο διαβιβαστή. Στα θηλαστικά παράγεται ενδογενώς από τα ένζυμα β-συνθάση της κυσταθειονίνης (CBS), γ-λυάση της κυσταθειονίνης (CSE) και 3-μερκαπτοπυροσταφυλική θειοτρανσφεράση (3-MST), καθώς και μέσω μη ενζυματικών οδών. Αντικείμενο πολυάριθμων μελετών έχει αποτελέσει ο βιολογικός ρόλος και οι σηματοδοτικές οδοί στις οποίες εμπλέκεται το H_2S τόσο σε φυσιολογικό, όσο και σε παθοφυσιολογικό επίπεδο.

Πρόσφατες έρευνες έχουν εστιάσει την προσοχή στους μηχανισμούς που συσχετίζουν τον αέριο αυτό διαβιβαστή με τη βιολογία του καρκίνου. Στα πλαίσια αυτού, το H_2S παρουσιάζει διφασικό χαρακτήρα, καθώς τόσο η αναστολή της ενδογενούς βιοσύνθεσής του όσο και η αύξηση των επιπέδων του πέρα από συγκεκριμένα όρια φαίνεται να ασκούν αντικαρκινική δράση. Πολλαπλοί είναι οι μηχανισμοί που συντελούν σε αυτήν, μεταξύ των οποίων σηματοδοτικά μονοπάτια που αφορούν στην καταστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας, στην αναστολή της αγγειογένεσης, στη διακοπή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και στην επαγωγή της απόπτωσης. Φαρμακολογικά εργαλεία, όπως αναστολείς των ενζύμων παραγωγής H_2S όσο και δότες αυτού, χρησιμοποιούνται σε in vitro και in vivo μελέτες προς διερεύνηση του ρόλου του αέριου διαβιβαστή σε διαφόρους τύπους καρκίνου και της επίδρασής του στον πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό και την ανάπτυξη των κυττάρων του όγκου.

Στην παρούσα εργασία μελετάται ο ρόλος του ενδογενώς παραγόμενου H_2S σε καρκινικές σειρές των ωοθηκών (TOV-21G και ES-2) και του προστάτη (PC-3 και LNCaP). Αρχικά, ελέγχθηκε η έκφραση των τριών ενζύμων παραγωγής H_2S στις υπό έλεγχο κυτταρικές σειρές και προσδιορίστηκαν οι καταλληλότερες συνθήκες διεξαγωγής της χρωματομετρικής μεθόδου MTT προς έλεγχο του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Εν συνεχεία, χορηγήθηκαν στα κύτταρα οι αναστολείς των CBS, CSE και 3-MST σε διάφορες συγκεντρώσεις για 48 ώρες και διερευνήθηκε η επίδρασή τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με την προαναφερθείσα μέθοδο. Σε όλες τις καρκινικές σειρές τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα είχε ο αναστολέας των CBS/CSE, AOAA, καθώς η επίδρασή του στη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ήταν σημαντικότερη συγκριτικά με τους άλλους δύο αναστολείς. Ωστόσο, ανάμεσα στους δύο τύπους καρκίνου, το AOAA είχε ισχυρότερη δράση έναντι του καρκίνου των ωοθηκών (IC_{50}:684,7uM και 906,3uM για τις καρκινικές σειρές TOV-21G και ES-2 αντίστοιχα) σε σχέση με τον καρκίνο του προστάτη (IC_{50}>>1mM).

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η δράση του AOAA οφείλεται στην αναστολή της βιοσύνθεσης του H_2S και όχι σε κάποια άλλη μη ειδική του δράση, έγινε ταυτόχρονη χορήγηση του GYY4137, ενός δότη H_2S, ο οποίος και ανέστρεψε σημαντικά την ανασταλτική, επί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, δράση του AOAA. Συνεπώς, η αναστολή του ενδογενώς παραγόμενου H_2S φαίνεται να αποτελεί έναν πιθανό νέο θεραπευτικό στόχο στον καρκίνο των ωοθηκών.

ABSTRACT

Over the last decades, thorough research has been carried out in the field of gasotransmitters. In addition to nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO), another focal point has been hydrogen sulfide (H_2S), the third gasotransmitter. In mammals, H_2S is endogenously produced by three enzymes: cystathionine β-synthase (CBS), cystathionine γ-lyase (CSE) and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST) or by non-enzymatic pathways. The biological role and signaling pathways in which H_2S is involved have been the subject of various studies, both at a physiological and a pathophysiological level. Recent research has focused on the underlying mechanisms that correlate hydrogen sulfide to the biology of cancer.

In this context, hydrogen sulfide presents a bipolar character, as it can display anticancer effects not only by the inhibition of its intrinsic biosynthesis but also by the elevation of its levels beyond a certain point. Multiple mechanisms contribute to these effects, including signaling pathways that involve suppression of mitochondrial function, inhibition of angiogenesis, cell cycle arrest and induction of apoptosis. Pharmacological tools, such as inhibitors of H_2S biosynthesis as well as H_2S donors, are used to investigate the role of the gaseous transmitter in various types of cancer together with its effect on the tumour proliferation, metabolism and growth in both in vitro and in vivo experiments.

The aim of the present study is to elucidate the role of endogenous H_2S regarding in vitro models of ovarian cancer (TOV-21G and ES-2) and prostate cancer (PC-3 and LNCaP). In the first place, we tested whether CBS, CSE and 3-MST are expressed in the cancer cell lines at subject or not. After verifying their expression, we established the optimal conditions (number of cells, MTT incubation time) for performing the MTT colorimetric assay to determine cell proliferation afterwards. Inhibitors of the three enzymes were then administered to the cancer cells at various concentrations for 48 hours and their effect on cell proliferation was investigated by the aforementioned method. In all cancer cell lines, the most potent was CBS/CSE inhibitor, AOAA, considering that its ability to reduce cell proliferation rate was the greatest among the three. However, between the two types of cancer, AOAA had greater efficacy against ovarian cancer (IC_{50} estimated at 684,7uM and 906,3uM for TOV-21G and ES-2 respectively) rather than prostate cancer (IC_{50}>>1mM). Taking into account the complex pharmacological profile of AOAA, we further determined whether AOAA anticancer effects were due to the inhibition of H_2S biosynthesis. Indeed, by administrating simultaneously a hydrogen sulfide donor, GYY4137, the observed inhibition over cell proliferation caused by AOAA was significantly reversed. In

conclusion, future efforts should focus on the inhibition of endogenously produced H_2S as a new therapeutic approach as regards ovarian cancer.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αναρίθμητες χαρακτηρίζονται οι μελέτες γύρω από την προσπάθεια του ανθρώπου να κατανοήσει τη βιολογία του καρκίνου, προκειμένου να αναπτύξει αποτελεσματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις που θα συμβάλουν στην αντιμετώπιση της εν λόγω ασθένειας. Μία από τις ποικίλες παραμέτρους που έχουν εμποδίσει την επίτευξη αυτού του στόχου είναι οι πολλοί και διαφορετικοί τύποι καρκίνου, με τον καθένα να αναπτύσσει τις δικές του σηματοδοτικές οδούς και τους δικούς του τρόπους άμυνας, έχοντας ξεχωριστό γενετικό προφίλ. Ωστόσο, είναι ευρέως αποδεκτό πως όλοι οι τύποι καρκίνου, σα σύνολο, έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα που αποκτούν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και επέκτασής τους. Αυτά αφορούν στη δυνατότητά τους να διατηρούν διαρκώς ενεργοποιημένες τις σηματοδοτικές οδούς που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό τους, να παρακάμπτουν ενδογενή μονοπάτια που ασκούν αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση σε αυτόν και σχετίζονται με τις δράσεις ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, να μην υποπίπτουν στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, να αναπτύσσονται διαρκώς (αθανατοποίηση), να επάγουν αγγειογένεση και να μπορούν να εισβάλλουν και να μεταναστεύουν σε απομακρυσμένους ιστούς. Σε αυτά τα χαρακτηριστικά έρχονται να προστεθούν ο επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού τους, παράλληλα με την αντίσταση που επιδεικνύουν έναντι του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού. Πέραν των προαναφερθέντων, πρέπει να επισημανθεί και ο ρόλος που διαδραματίζουν τα φαινομενικά φυσιολογικά κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου στην περαιτέρω ανάπτυξή του[1]. Ακολουθεί μία σύντομη αναφορά σε δύο συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, των ωοθηκών και του προστάτη, και τις σηματοδοτικές οδούς που εμπλέκονται στον προγραμματισμό τους.

1.1. Καρκίνος των ωοθηκών

Ο καρκίνος των ωοθηκών έχει την υψηλότερη θνησιμότητα μεταξύ των καρκίνων που εμφανίζονται στο γυναικείο φύλο και υπολογίζεται να αντιπροσωπεύει στις Η.Π.Α. περίπου το 5% του συνόλου των θανάτων που σχετίζονται με οποιοδήποτε τύπο καρκίνου στις γυναίκες το 2017[2]. Όπως και στους περισσότερους τύπους καρκίνου, ομοίως και σε αυτόν, διακρίνονται διάφοροι ιστολογικοί τύποι, με βασικότερο τον επιθηλιακό. Υπότυποι αυτού είναι το ορώδες αδενοκαρκίνωμα (SAC), το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα (CCC), το ενδομητριοειδές καρκίνωμα και το βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα. Ο καρκίνος εκ διαυγών κυττάρων πρόκειται για έναν ιδιαίτερα επιθετικό και κακοήθη τύπο καρκίνου, που δύσκολα ανταποκρίνεται στη συμβατική

χημειοθεραπευτική αγωγή[3]. Αναγνωρίστηκε σαν ξεχωριστός υπότυπος από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) το 1973[4]. Ο επιπολασμός της ασθένειας υπολογίζεται στο 1-12% για την Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική και στο 15-25% για την Ιαπωνία[5].

Υπάρχει μια πληθώρα μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του CCC. Αφενός, μία από τις αιτιολογίες του είναι γενετικές αλλαγές σε γονίδια που σχετίζονται με μονοπάτια κυτταρικού πολλαπλασιασμού, επιβίωσης και απόπτωσης[6]. Παραδείγματος χάριν, συχνά έχουν καταγραφεί μεταλλάξεις του γονιδίου της κινάσης της 3-φωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης[7]. Αναφέρεται πως η συγκεκριμένη κινάση εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR που διαδραματίζει καίριο ρόλο σε επίπεδο κυτταρικής ανάπτυξης και αγγειογένεσης, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια. Άλλες μεταλλάξεις αφορούν σε γονίδια που κωδικοποιούν ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, όπως η φωσφατάση PTEN[8] ή η BRCA1/2[9].

Αφετέρου, έχει διαπιστωθεί πως αλλαγές στο επίπεδο έκφρασης διαφόρων πρωτεϊνών ευθύνονται για την ανάπτυξη του CCC. Οι πρωτεΐνες αυτές, που είτε υπερεκφράζονται είτε είναι διαρκώς ενεργοποιημένες, συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία έχουν μελετηθεί εκτενώς και αναλύονται στις επόμενες παραγράφους. Είναι επόμενο πως η εύρεση φαρμακολογικά δραστικών παραγόντων που επεμβαίνουν στη σηματοδότηση αυτή αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο στόχο για επιτυχημένες θεραπευτικές προσεγγίσεις και αύξηση της επιβίωσης των ασθενών[6].

Αρχικά, εξέχουσας σημασίας στο CCC είναι το μονοπάτι της ιντερλευκίνης-6/μεταγραφικού παράγοντα-3 (IL-6/STAT3). Η IL-6 είναι μια πλειοτροπική προφλεγμονώδης πρωτεΐνη που δρα ως μεσολαβητής σε καίριες διαδικασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η αγγειογένεση, ενώ φαίνεται να εμπλέκεται και στην ανάπτυξη αντίστασης έναντι της χημειοθεραπείας, όταν βρίσκεται στο μικροπεριβάλλον του όγκου[6]. Συγκεκριμένα, η σύνδεση της IL-6 στον υποδοχέα της συνεπάγεται ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3, ύστερα από φωσφορυλίωσή του από την οικογένεια κινασών JNK. Υπό κανονική βάση ο παράγοντας STAT-3 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Φωσφορυλίωσή του έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό διμερών, τα οποία μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου προσδένονται σε συγκεκριμένα στοιχεία απόκρισης του DNA στον υποκινητή γονιδίων-στόχων, προάγοντας τη μεταγραφή τους[10]. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες που επάγουν τον πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση και την κυτταρική επιβίωση, όπως είναι η κυκλίνη D1 ή η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2. Ως αποτέλεσμα, ο STAT-3 συγκαταλέγεται μεταξύ των ογκογονικών μεταγραφικών παραγόντων, που μπορεί να οδηγήσουν σε υπερέκφραση υποσυνόλου πρωτεϊνών εξέχουσας σημασίας στην ανάπτυξη του καρκίνου[11]. Γίνεται, λοιπόν, σαφές πως

αναστολή της ιντερλευκίνης-6 και καταστολή της σηματοδότησής της θα μπορούσε να αποτελέσει αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση στον καρκίνο των ωοθηκών.

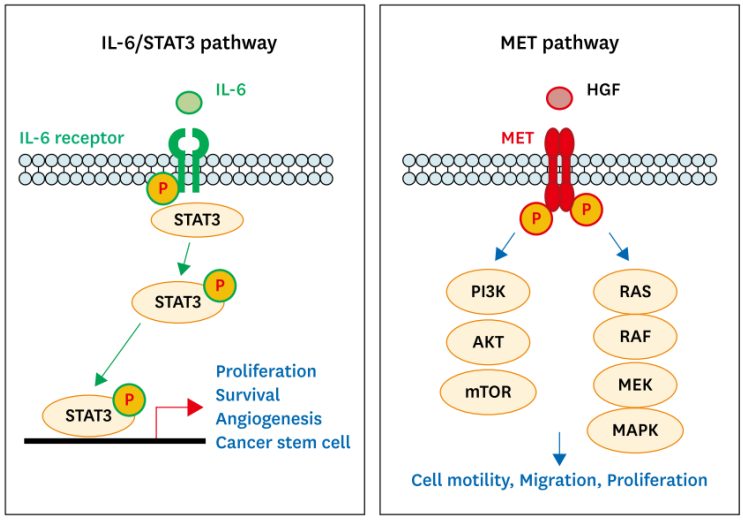
Ένα επόμενο μονοπάτι στο οποίο πρέπει να γίνει αναφορά είναι αυτό του υποδοχέα τυροσινικής κινάσης MET (ή διαφορετικά υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα ηπατοκυττάρων, HGFR), που εμφανίζει υπερέκφραση στο CCC. Κατόπιν σύνδεσής του με τον προσδέτη του, HGF, ο MET ενεργοποιεί τα μονοπάτια Ras/Raf/MAPK και PI3K/Akt/mTOR, με επακόλουθο την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στον καρκίνο, τη μετανάστευση και την ενίσχυση της επιθετικότητάς του[6]. Πιο αναλυτικά, ενεργοποιείται η κινάση της 3-φωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K), η οποία φωσφορυλιώνει την 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP2) προς σχηματισμό της 3,4,5 τριφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIP3), με τελικό αποτέλεσμα τη μεταφορά της αντιαποπτωτικής κινάσης Akt στην πλασματική μεμβράνη, όπου φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται. Αυτή με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και αναστέλλει τη λειτουργία της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bad, οδηγώντας σε καταστολή της ενεργοποίησης κασπασών. Παράλληλα, προκαλεί ενεργοποίηση της eNOS μέσω φωσφορυλίωσης, μη-εξαρτώμενης από το ασβέστιο[12].

Η κινάση Akt, ωστόσο, συμμετέχει και σε ένα δεύτερο μονοπάτι, το οποίο παρουσιάζει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο των ωοθηκών[6]. Πιο συγκεκριμένα, η σηματοδοτική οδός PI3K/Akt/mTOR έχει συσχετιστεί με τον κακοήθη μετασχηματισμό ανθρώπινων όγκων και την επακόλουθη ανάπτυξη, πολλαπλασιασμό, και μετάστασή τους. Μελέτες έχουν δείξει ότι σε ασθενείς με CCC εμφανίζονται γενετικές μεταβολές σε ένα ή περισσότερα σημεία του εν λόγω μονοπατιού, οδηγώντας σε παρατεταμένη ενεργοποίησή του[6]. Όπως προαναφέρθηκε, ενεργοποίηση της PI3K συνεπάγεται μετατόπιση της Akt στη μεμβράνη, όπου και ενεργοποιείται. Αρνητικοί ρυθμιστές της όλης διαδικασίας είναι οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες PTEN και INPP4B, οι οποίες μέσω αποφωσφορυλιώσεων εμποδίζουν την ενεργοποίηση της Akt, οπότε απουσία τους λαμβάνει χώρα παρατεταμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού. Η φωσφορυλιωμένη Akt, με τη σειρά της, ενεργοποιεί είτε άμεσα (μέσω φωσφορυλίωσης στη σερίνη 2448) είτε έμμεσα (με την εμπλοκή άλλων μονοπατιών) το σύμπλεγμα 1 του μηχανιστικού στόχου της ραπαμυκίνης (mTORC1). Όταν αυτό συμβεί, το mTORC1 φωσφορυλιώνει τη ριβοσωμική S6 κινάση-1 (RSK-1), η οποία ρυθμίζει τη μετάφραση mRNA ριβοσωμικών πρωτεϊνών, παραγόντων επιμήκυνσης και άλλων μορίων που απαιτούνται για τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Αφετέρου, από το mTORC1 φωσφορυλιώνεται και η πρωτεΐνη δέσμευσης 4EBP-1 που επίσης ενισχύει τη μετάφραση mRNA που κωδικοποιεί την κυκλίνη D1, διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, αλλά και τον επαγόμενο από την υποξία

παράγοντα-1α (HIF-1α), μόρια που συνεισφέρουν στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και την αγγειογένεση[7].

Αναφέρεται πως το άλλο σύμπλεγμα του mTOR (mTORC2), αποτελείται από έξι πρωτεΐνες και ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ενεργοποιείται παραμένει ασαφής, με έρευνες να δείχνουν πως για την ενεργοποίησή του απαραίτητη είναι η PI3K[13]. Το ενεργοποιημένο mTORC2 φωσφορυλιώνει κινάσες, όπως την Akt και την πρωτεϊνική κινάση C-α (PKC-α) και ασκεί έλεγχο στην κυτταρική ανάπτυξη, ρυθμίζοντας τη λιπογένεση, το μεταβολισμό της γλυκόζης, την απόπτωση, κ.ά.[7].

Λαμβάνοντας υπόψιν τα ανωτέρω, οι ερευνητές έχουν οδηγηθεί στην ανάπτυξη παραγόντων που στοχεύουν στην αναστολή του MET και που βρίσκονται υπό κλινική αξιολόγηση για τη χρήση τους έναντι του καρκίνου των ωοθηκών[6]. Διερευνώνται, επίσης, ανασταλτικά μόρια που έχουν στόχο την PI3K, την Akt, το mTORC1 ή εμφανίζουν διπλή δράση (αναστολείς mTORC1/2 ή αναστολείς PI3K/mTOR), τα οποία βρίσκονται σε διάφορα στάδια κλινικών μελετών, ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με άλλους αντικαρκινικούς παράγοντες για την αντιμετώπιση του καρκίνου των ωοθηκών[6].



Εικόνα 1: Μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παθογένεση του CCC[6]

Εξαιρουμένων των προαναφερθέντων μονοπατιών, επόμενος, δυνητικά πολλά υποσχόμενος, από θεραπευτικής άποψης, στόχος είναι το ένζυμο πολυμεράση της πολυ-αδενοφωσφορικής ριβόζης (PARP), το οποίο συμβάλλει στην επισκευή βλαβών του DNA. Συγκεκριμένα, έχει τη δυνατότητα να επιδιορθώνει «σπασίματα» που παρατηρούνται στη μονή αλυσίδα του DNA. Όταν η δράση της PARP αναστέλλεται, τα μη επιδιορθωμένα μονά τμήματα μπορούν να μετατραπούν σε διπλής αλυσίδας «σπασίματα», τα οποία επιδιορθώνονται μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού. Όταν

όμως αυτός εκλείπει, οδηγούμαστε σε θανατηφόρες βλάβες του DNA που σχετίζονται με το CCC, όπως παραδείγματος χάριν μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA 1/2[6]. Έχουν εντοπιστεί αρκετοί μηχανισμοί που επάγουν δυσλειτουργία του ομόλογου ανασυνδυασμού, όπως η μεθυλίωση του προαγωγέα του BRCA 1[14] ή απώλεια/μείωση πρωτεϊνών, αναγκαίων στον ομόλογο ανασυνδυασμό, όπως η PTEN[15].

Τέλος, αξίζει να γίνει σύντομη αναφορά στο ρόλο του πυρηνικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HNF)-1β, ένα μεταγραφικό παράγοντα που εκφράζεται σε ποσοστό >95% στον καρκίνο των ωοθηκών. Ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων και πρωτεϊνών που σχετίζονται με την εξέλιξη του καρκίνου, όπως η αννεξίνη Α4, η οστεοποντίνη και η δεσμευτική πρωτεΐνη-1 του αυξητικού παράγοντα της ινσουλίνης (IGFBP-1)[6]. Λόγω του υψηλού ποσοστού έκφρασής του σε ασθενείς με CCC, ο HNF-1β χρησιμοποιείται πλέον ως διαγνωστικός δείκτης[16].

Λαμβάνοντας υπόψιν τόσο την κακή πρόγνωση όσον αφορά στο CCC, όσο και τη μη ανταπόκριση των ασθενών στα κλασσικά χημειοθεραπευτικά σχήματα (όπως ταξάνες και παράγωγα πλατίνας), κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω διευκρίνηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεση της ασθένειας, ούτως ώστε η θεραπεία να επικεντρωθεί σε συγκεκριμένους μοριακούς στόχους και σηματοδοτήσεις. Τέλος, βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν σε αντίσταση στη χημειοθεραπεία, έλεγχος των οφελών της συνδυαστικής θεραπείας, καθώς και αξιολόγηση των ανοσοθεραπευτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται σε ποικίλες μορφές καρκίνου, θα μπορούσε να βελτιώσει σημαντικά το προσδόκιμο ζωής των ασθενών.

1.2. Καρκίνος του προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη (PC) αποτελεί την πλέον κοινή κακοήθεια στους άνδρες και τη δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο σε αυτό το φύλο[2]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, κατά την ανάπτυξη του προστάτη, λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις μεταξύ των στρωματικών και των επιθηλιακών κυττάρων. Το φυσιολογικό του επιθήλιο περιέχει κύτταρα του αυλού, βασικά κύτταρα και ένα μικρό ποσοστό από νευροενδοκρινικά κύτταρα που είναι διάσπαρτα σε όλο τον προστάτη[17]. Οι περισσότεροι τύποι καρκίνου του προστάτη ταξινομούνται ως αδενοκαρκινώματα και χαρακτηρίζονται από απουσία βασικών κυττάρων, που συνοδεύεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κακοήθων κυττάρων του όγκου, αδενικό σχηματισμό και έκφραση του υποδοχέα ανδρογόνων (AR) και του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως σε κάθε περίπτωση αδενοκαρκινώματος συναντάται ένας μικρός πληθυσμός (περίπου 1%)

νευροενδοκρινικών καρκινικών κυττάρων[17,18]. Τα κύτταρα αυτά, τα οποία παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά με εκείνα στην καλοήθη υπερπλασία του προστάτη, δεν εκφράζουν τον υποδοχέα ανδρογόνων, ούτε και το ειδικό προστατικό αντιγόνο[19].

Άλλοι τύποι προστατικού επιθηλιακού καρκίνου, που εμφανίζονται σε πολύ μικρότερα ποσοστά, αφορούν σε διάφορες παραλλαγές αδενοκαρκινώματος, όπως το αδενοκαρκίνωμα πορώδους τύπου, το βλεννώδες (κολλοειδές) καρκίνωμα, το καρκίνωμα με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου («signet ring cells»), καθώς και το μικροκυτταρικό νευροενδοκρινές καρκίνωμα (SCNC)[20]. Το τελευταίο αντιπροσωπεύει το 1% των καρκινωμάτων του προστάτη και θεωρείται άκρως επιθετικός όγκος, ο οποίος εμφανίζεται σε ασθενείς είτε με ιστορικό κλασσικού προστατικού αδενοκαρκινώματος που έχουν υποβληθεί σε ορμονική θεραπεία είτε με άλλη μετάσταση[21]. Όπως και με τα νευροενδοκρινικά κύτταρα στους άλλους τύπους καρκίνου του προστάτη, ομοίως και σε αυτήν την κατηγορία, τα καρκινικά αυτά κύτταρα χαρακτηρίζονται από έλλειψη έκφρασης του υποδοχέα ανδρογόνων και του ειδικού προστατικού αντιγόνου[22]. Το γεγονός αυτό εξηγεί την κλινική παρατήρηση ότι τέτοιοι όγκοι, σε αντίθεση με τα αδενοκαρκινώματα, δεν ανταποκρίνονται στην ορμονοθεραπεία που αναστέλλει τη λειτουργία του ανδρογονικού υποδοχέα και διακόπτει την παραγωγή ανδρογόνων[23].

Δεδομένου πως ο καρκίνος του προστάτη είναι μια αρκετά διαδεδομένη ασθένεια, έχει υπάρξει το κέντρο σημαντικών ερευνητικών μελετών επί χρόνια. Για την κατανόηση της μοριακής παθογένεσης της νόσου, έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά βοηθητικά πειραματικά μοντέλα, μεταξύ των οποίων μοντέλα ξενομοσχεύματος, γενετικά τροποποιημένα πειραματόζωα, καθώς και κυτταρικές καρκινικές σειρές. Μεταξύ αυτών, οι πιο κοινές είναι οι LNCaP και PC-3 που προέρχονται από μεταστάσεις του λεμφαδένα και των οστών αντίστοιχα[24,25]. Δεδομένου πως η σειρά LNCaP εκφράζει τον υποδοχέα ανδρογόνων, το ειδικό προστατικό αντιγόνο και είναι ορμονοεξαρτώμενη, ενώ η σειρά PC-3 δεν εκφράζει τα προαναφερθέντα και δεν εξαρτάται από την παρουσία ανδρογόνων, η πρώτη σειρά χρησιμοποιείται ως μοντέλο προστατικού αδενοκαρκινώματος, ενώ τα χαρακτηριστικά της δεύτερης παραπέμπουν κυρίως σε προστατικό μικροκυτταρικό νευροενδοκρινές καρκίνωμα[18].

Η αιτιολογία του καρκίνου του προστάτη αποτελεί περίπλοκο ζήτημα και περιλαμβάνει πολλές πτυχές. Έρευνες που έχουν διεξαχθεί έχουν συσχετίσει τη συγκεκριμένη ασθένεια με την ηλικία, το οικογενειακό ιστορικό, τη φυλή και διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η διατροφή και το κάπνισμα. Παράλληλα, παράγοντες κινδύνου φαίνεται να είναι τόσο σεξουαλικώς μεταδιδόμενα νοσήματα, όσο και φλεγμονώδεις νόσοι[26].

Για πολλές δεκαετίες η έρευνα γύρω από τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, σε ασθενείς όπου η χειρουργική επέμβαση ή η ραδιοθεραπεία δεν ήταν αποτελεσματικές, είχε εστιάσει στη χημειοθεραπεία και στους ορμονικούς παράγοντες που ανταγωνίζονται τη δράση των ανδρογόνων, καθώς ο καρκίνος του προστάτη εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα ανδρογόνα στα αρχικά του στάδια[27]. Η διυδροτεστοστερόνη, ένα προϊόν της τεστοστερόνης μετά από τη δράση 5α-αναγωγασών, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη του προστάτη, αλλά και στην εξέλιξη του καρκίνου αυτού. Τα επίπεδα της 5α-αναγωγάσης, ιδιαίτερα τύπου 1, φαίνεται να αυξάνονται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου. Ως εκ τούτου, η αναστολή αυτής θα μπορούσε δυνητικά να μειώσει τον κίνδυνο της ανάπτυξης προστατικού καρκίνου, την εξέλιξη της νόσου και να συμβάλει στη θεραπεία[28].

Δυστυχώς, η απόσυρση από τη θεραπεία με αντιανδρογονικούς παράγοντες δεν έχει τα επιθυμητά αποτελέσματα, καθώς σχεδόν πάντοτε ο καρκίνος επανεμφανίζεται ακόμα πιο επιθετικός, με τα καρκινικά κύτταρα να μην εξαρτώνται πλέον από τα ανδρογόνα. Με τη θεραπευτική αυτή προσέγγιση η επίδραση στη συνολική επιβίωση είναι στην καλύτερη περίπτωση μέτρια, ακόμη και με σύγχρονα φάρμακα που στοχεύουν σε υποδοχείς στον υποθάλαμο ή συγκεκριμένα στους ανδρογονικούς υποδοχείς των καρκινικών κυττάρων[29].

Υπάρχουν διάφοροι λόγοι για την αποτυχία της θεραπείας αυτής. Αρχικά, ορισμένα καρκινώματα του προστάτη παύουν να εκφράζουν τον υποδοχέα ανδρογόνων, παραδείγματος χάριν λόγω σίγασης του γονιδίου που τον κωδικοποιεί μετά από υπερμεθυλίωση του προαγωγέα[30]. Σε δεύτερο στάδιο, αρκετοί πεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες, όπως ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών 7 (FGF7), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), μπορούν να ενεργοποιήσουν τον AR είτε ανεξάρτητα είτε συνεργιστικά με κάποιο στεροειδή προσδέτη[31,32]. Τρίτον, σε ορισμένα καρκινώματα, σωματικές μεταλλάξεις του υποδοχέα μεταβάλλουν την ειδικότητά του, με αποτέλεσμα να ανταποκρίνεται σε οιστρογόνα, προγεστερόνη, δεϋδροεπιανδροστερόνη ή ακόμη και συνθετικά αντιανδρογόνα[33]. Τέταρτον, στο 30% των καρκινωμάτων, υπό παρατεταμένη έλλειψη υποστρώματος (ανδρογόνου), μπορεί να συμβεί πολλαπλασιασμός του γονιδίου που κωδικοποιεί τον ανδρογονικό υποδοχέα, οδηγώντας σε ανάπτυξη αυξημένης ευαισθησίας αυτού ακόμα και σε ελάχιστα επίπεδα ανδρογόνων, αλλά και άλλα σήματα ενεργοποίησης[34]. Πέμπτον, όπως θα αναλυθεί παρακάτω, έχουν ταυτοποιηθεί πολυάριθμες πρωτεΐνες-συνενεργοποιητές, οι οποίες μεσολαβούν τις δράσεις του ανδρογονικού υποδοχέα επί της δομής της χρωματίνης και της έναρξης της γονιδιακής μεταγραφής, όπως και την αλληλεπίδρασή του με άλλες οδούς σηματοδότησης. Αλλαγές στο επίπεδο έκφρασης και ίσως στη δομή αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να

συνεργούν με άλλους μηχανισμούς για να καταστήσουν τα καρκινικά κύτταρα ανεξάρτητα από την ύπαρξη ανδρογόνου[35,36].

Λαμβάνοντας, επομένως, υπόψιν τα όχι και τόσο ενθαρρυντικά αποτελέσματα της ορμονικής θεραπείας, τα τελευταία χρόνια άρχισε να στρέφεται το ενδιαφέρον και προς άλλους παράγοντες που διαδραματίζουν ρόλο και σε άλλα είδη καρκίνου, όπως ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες και διάφορα πρωτοογκογονίδια. Οι τρέχουσες προσεγγίσεις περιλαμβάνουν την αναζήτηση γονίδιων που υφίστανται συχνά μεταλλάξεις στον εν λόγω τύπο καρκίνου, την ταυτοποίηση των επαναλαμβανόμενων χρωμοσωμικών ανωμαλιών που παρατηρούνται και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια με τα οποία σχετίζονται, τον προσδιορισμό του προφίλ γονιδιακής έκφρασης στα διάφορα στάδια του όγκου και τη διαλεύκανση της σημασίας των επιγενετικών αλλαγών[29]. Πέραν όμως αυτών, αξιόλογες προσπάθειες γίνονται στη διερεύνηση των μονοπατιών των ανδρογονο-ανεξάρτητων σηματοδοτικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του καρκίνου του προστάτη μέσω της δράσης του AR.

Εστιάζοντας την προσοχή σε πιο μοριακό επίπεδο, είναι δυνατή η ενεργοποίηση του AR μετά συνδέσεως κάποιου ανδρογονικού τύπου προσδέτη σε αυτόν, όπως ήδη αναφέρθηκε. Η σύνδεση αυτή συνεπάγεται αλλαγές στη δομή του υποδοχέα, ο οποίος βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένος με σύμπλεγμα πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSPs). Κατόπιν ενεργοποίησής του ακολουθεί απελευθέρωσή του από τις HSPs, διμερισμός, φωσφορυλίωση και μετατόπισή του στον πυρήνα. Εκεί δεσμεύεται με ειδικές αλληλουχίες του DNA, γνωστές ως «στοιχεία απόκρισης σε ανδρογόνα» (AREs), στις περιοχές του προαγωγέα και ενισχυτή γονιδίων-στόχων, ρυθμίζοντας έτσι τη μεταγραφή τους[37].

Εξαιρουμένου, όμως, του σηματοδοτικού μονοπατιού που ενεργοποιείται μετά την απευθείας σύνδεση κάποιου τέτοιου είδους προσδέτη στον ανδρογονικό υποδοχέα, υπάρχει μια πληθώρα άλλων μονοπατιών που εμπλέκονται στην κυτταρική σηματοδότηση, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική επιβίωση και την αγγειογένεση στον καρκίνο του προστάτη και τα οποία δυνητικά θα μπορούσαν να αποτελέσουν σημαντικούς θεραπευτικούς στόχους. Όταν αυτά ενεργοποιηθούν μπορεί να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση ή αναστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του ανδρογονικού υποδοχέα. Η ενεργοποίηση αυτής μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη του καρκίνου, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων παρουσία χαμηλών ποσοστών ανδρογόνων[28]. Στη συνέχεια, αναφέρονται συνοπτικά τα σημαντικότερα μονοπάτια που εμπλέκονται στον καρκίνο του προστάτη και αφορούν στη σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων, μέσω των MAPK, διαφόρων κυτοκινών, καθώς και των πρωτεϊνών Wnt[38].

Διάφοροι παράγοντες ανάπτυξης, όπως ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης (IGF)-1, ο αυξητικός παράγοντας κερατινοκυττάρων (KGF) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), βρέθηκαν να αυξάνουν την πιθανότητα ενεργοποίησης του AR[31]. Στο 40-80% των καρκινικών κυττάρων του προστάτη εμφανίζεται αυξημένη έκφραση του υποδοχέα του EGF που έχει συσχετιστεί με την εξέλιξη του όγκου από ανδρογονοεξαρτώμενο σε ανδρογονοανεξάρτητο[39]. Οι υποδοχείς του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER) (1-4), που ανήκουν στην οικογένεια των EGFR, εκφράζονται επίσης σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη και η διέγερσή τους μέσω του EGF και της ερεγουλίνης ενεργοποιεί τα μονοπάτια των MAPK και PI3K/Akt, όπως θα αναλυθεί στην επόμενη παράγραφο[40]. Πέραν του EGF, ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-α (TGF-α) αποτελεί έναν επιπλέον σημαντικό μεσολαβητή μεταγωγής σήματος μέσω EGFR, που επηρεάζει την ανάπτυξη και τη λειτουργία του προστάτη[41].

Η σύνδεση όλων των προαναφερθέντων στον υποδοχέα τους στην κυτταρική μεμβράνη ενεργοποιεί έναν καταρράκτη σημάτων που δραστηριοποιεί την PI3K η οποία, με τη σειρά της, διεγείρει την κινάση σερίνης/θρεονίνης Akt, επίσης γνωστή ως πρωτεϊνική κινάση B (PKB). Το σηματοδοτικό μονοπάτι που εμπλέκεται από εκεί και πέρα έχει συσχετιστεί με τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, του μεταβολισμού και τελικά της εξέλιξης του καρκίνου[42]. Αξίζει να σημειωθεί πως η φωσφορυλίωση του AR έχει δειχθεί ότι μεσολαβείται άμεσα και από την Akt[43]. Ακόμη, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το μονοπάτι PI3K/Akt αναστέλλει, μέσω φωσφορυλίωσης, τον παράγοντα Foxo1, έναν καταστολέα της δράσης του AR, παρέχοντας έναν άλλο μηχανισμό περαιτέρω ενεργοποίησης του AR μέσω αυτού του μονοπατιού[44]. Επιπροσθέτως, επισημαίνεται ο ρόλος της πρωτεΐνης PTEN ως αρνητικού ρυθμιστή του εν λόγω μονοπατιού, καθώς μελέτες έχουν δείξει πως σε νεοπλασίες του προστάτη παρατηρούνται γενωμικές της αλλαγές και ελλιπής δράση της[45,46].

Ωστόσο, το μονοπάτι PI3K/Akt, εκτός των ευεργετικών δράσεων επί της δραστηριότητας του AR, φαίνεται να ασκεί και ανασταλτικές δράσεις, καθώς in vitro και in vivo πειράματα δείχνουν πως αναστολή του mTOR, ενός από τους στόχους της Akt, αυξάνει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του AR και συνεπώς, προκαλεί αυξορύθμιση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων του σε ανδρογονο-εξαρτώμενα κύτταρα[38].

Προχωρώντας στο επόμενο μονοπάτι, αυτό των MAP κινασών, επισημαίνεται αρχικά πως η οικογένεια αυτή είναι κινάσες σερίνης-θρεονίνης που περιλαμβάνουν τρεις βασικές ομάδες, τις ERKs (extracellular signal regulated kinases), τις JNKs (Jun N-terminal kinases) και τις p38. Μετά την ενεργοποίησή τους, οι κυτοσολικές αυτές πρωτεΐνες μετατοπίζονται στον πυρήνα και ρυθμίζουν τη δραστηριότητα πολλών

πρωτεϊνών και μεταγραφικών παραγόντων, διαδραματίζοντας έτσι ρόλους-κλειδιά σε διαδικασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η κυτταρική μετανάστευση[47].

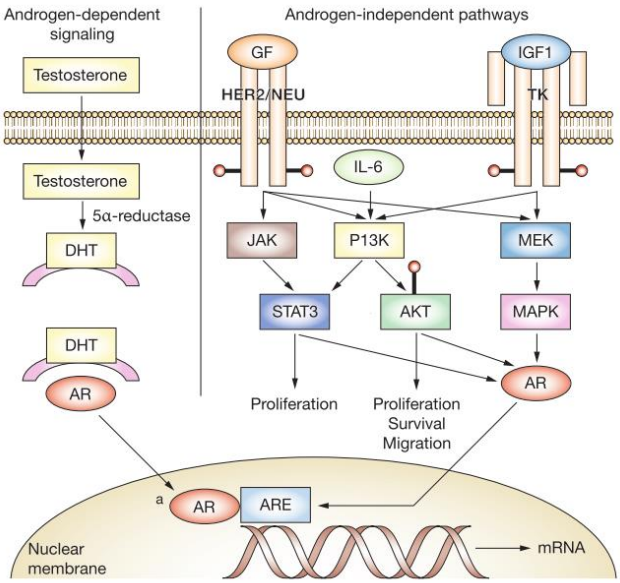
Η πιθανή εμπλοκή των MAPKs στον καρκίνο του προστάτη προτάθηκε για πρώτη φορά το 1997[48], όταν βρέθηκε πως η φωσφατάση MKP-1, που απενεργοποιεί τις MAPKs, υπερεκφράζεται κατά τα πρώτα στάδια της προστατικής καρκινογένεσης, αναστέλλοντας κατά βάση τη δράση των JNKs και τελικά την επαγόμενη απόπτωση[48,49]. Έκτοτε, έχουν γίνει ποικίλες συσχετίσεις του συγκεκριμένου μονοπατιού με την καρκινογένεση. Η υπερέκφραση των αυξητικών παραγόντων που προαναφέρθηκαν στον καρκίνο του προστάτη, έχει συχνά ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της ενδογενούς οδού των Ras/MAPKs[50], που έχει συνδυαστεί με αύξηση της ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων και ενίσχυση της ογκογονικότητας[31]. Έχει δειχθεί πως η σηματοδότηση μέσω των p38 ενεργοποιείται σε μεταγενέστερα στάδια του προστατικού καρκίνου και αυξάνει την έκφραση των ακουαπορινών, πρωτεϊνών που επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να επιβιώσουν σε συνθήκες υποξίας[51]. Όσον αφορά στις κινάσες ERK, συμβάλλουν στην καρκινογένεση είτε προάγοντας τον πολλαπλασιασμό είτε αναστέλλοντας την απόπτωση. Η ενεργοποίησή τους, υπό συνθήκες ανδρογονοανεξάρτητες, μπορεί να συμβάλει στην αύξηση του PSA, μιας πρωτεΐνης-στόχου της ενεργοποίησης του AR και βασικού καρκινικού δείκτη[52]. Τέλος, ο μοριακός μηχανισμός πίσω από την αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών οδών AR-MAPKs μπορεί να είναι ένας συνδυασμός της φωσφορυλίωσης του AR από τις MAPKs για να τον ευαισθητοποιήσουν απέναντι στην 5α-διυδροτεστοστερόνη (DHT), της διευκόλυνσης της εισόδου του AR στον πυρήνα και της φωσφορυλίωσης από τις MAPKs κάποιου συνενεργοποιητή του AR (όπως ο SRC-1), προς αύξηση της μεταγραφικής του δραστηριότητας[38].

Όσον αφορά στο μονοπάτι των κυτοκινών, οι βασικότερες που θα αναφερθούν είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNFα) και η ιντερλευκίνη-6 (IL-6). Ο TNFα έχει κεντρικό ρόλο στη φλεγμονή και την κυτταρική οργάνωση, όπως επίσης και στον έλεγχο της απόπτωσης και της κυτταρικής επιβίωσης. Η πρόσδεσή του στον υποδοχέα του στην κυτταρική επιφάνεια (TNFR) οδηγεί στην ενεργοποίηση του παράγοντα IKK, που φωσφορυλιώνει και αποδομεί τον παράγοντα IκB, έναν αναστολέα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Επακολούθως, ο NF-κB μετατοπίζεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων, σχετικών με ποικίλες λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός και η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου[53]. Ο TNFα συναντάται σε υπερέκφραση στον καρκίνο του προστάτη, κάτι που συνεπάγεται αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επιβίωση, αγγειογένεση, μετάσταση και αντίσταση σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες[54]. Η υπερέκφραση αυτή είναι επόμενο να έχει

συσχετιστεί με αυξημένη ενεργοποίηση του NF-κB[55]. Ο παράγοντας αυτός, εκτός των άλλων, ενεργοποιεί επίσης ένα ρυθμιστικό μεταγραφικό στοιχείο του γονιδίου που κωδικοποιεί το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA), ενός ζωτικής σημασίας δείκτη για την ανάπτυξη και την εξέλιξη του προστατικού καρκίνου, αυξάνοντας τελικά τα επίπεδά του[56]. Στον καρκίνο του προστάτη η σηματοδότηση μέσω του NF-κB έχει συσχετιστεί με την αντίστοιχη του ανδρογονικού υποδοχέα, με την έκφραση του παράγοντα να συνεπάγεται αυξημένη έκφραση και δραστηριότητα του AR[57]. Να σημειωθεί, τέλος, πως το μονοπάτι PI3K/Akt μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση του IKK, υποδεικνύοντας αλληλεπίδραση και μεταξύ των δύο αυτών μονοπατιών[58].

Η IL-6, που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο-στόχο του NF-κB, είναι μία κυτοκίνη που εμπλέκεται στη ρύθμιση ανοσολογικών και φλεγμονωδών αποκρίσεων, καθώς και στην ανάπτυξη όγκων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του προστάτη. Κατά την πρόσδεση της IL-6 στον υποδοχέα της (IL-6R), ενδοκυττάριοι τροποποιητές σήματος, μεταξύ των οποίων οι MAPKs, ενεργοποιούνται για να επάγουν μια ποικιλία κυτταρικών αποκρίσεων. Η αυξημένη παραγωγή IL-6 έχει προταθεί ως προγνωστικός παράγοντας για τον καρκίνο του προστάτη[59]. Ένας αξιοσημείωτος αριθμός μελετών έχει αποδείξει την αλληλεπίδραση μεταξύ της σηματοδότησης στην οποία εμπλέκεται η IL-6 και αυτής του ανδρογονικού υποδοχέα. Η IL-6 ενεργοποιεί τον AR απουσία προσδέτη ή και συνεργιστικά με ανδρογόνα σε μικρές συγκεντρώσεις, δράση που επάγει την έκφραση, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης, του PSA σε ανδρογονοεξαρτώμενα καρκινικά κύτταρα. Αναφέρεται, επιπλέον, πως αναστολή των MAPKs καταστέλλει τις δράσεις της IL-6 επί του AR σε καρκινικά προστατικά κύτταρα, εμπλέκοντας έτσι και τη σηματοδότηση των MAPKs στο εν λόγω μονοπάτι[32,60]. Σε αντίθεση με τα κύτταρα που ανταποκρίνονται στα ανδρογόνα, έχει προταθεί πως στα ανδρογονοανεξάρτητα καρκινικά κύτταρα ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt, ενός από τους στόχους της IL-6, καταστέλλει την επαγωγή της δραστηριότητας του AR από την IL-6, πιθανώς μέσω δράσης του mTOR[60].

Εκτός των κινασών αυτών, ο μεταγραφικός παράγοντας STAT-3 έχει χαρακτηριστεί ως ένα σημαντικό σηματοδοτικό μόριο για την ενεργοποίηση του AR από την IL-6, τόσο σε ανδρογονοεξαρτώμενες, όσο και σε ανδρογονοανεξάρτητες καρκινικές σειρές[60,61]. Συμπερασματικά, αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ότι η IL-6 χρησιμοποιεί πολλαπλά μονοπάτια για τη ρύθμιση του ανδρογονικού υποδοχέα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του καρκίνου.



Εικόνα 2: Ανδρογονο-εξαρτώμενοι και ανδρογονο-ανεξάρτητοι σηματοδοτικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του καρκίνου του προστάτη[62]

Το τελευταίο μονοπάτι που χρήζει αναφοράς στον καρκίνο του προστάτη είναι αυτό των πρωτεϊνών Wnt. Η συγκεκριμένη οδός σηματοδότησης περιλαμβάνει ένα πολύπλοκο δίκτυο πρωτεϊνών. Όταν οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται στους υποδοχείς τους στην επιφάνεια του κυττάρου, ενεργοποιούνται μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών DSH, που με τη σειρά τους ρυθμίζουν την ποσότητα της πρωτεΐνης β-κατενίνης που φτάνει στον πυρήνα. Η β-κατενίνη δημιουργεί σύμπλοκα με τους μεταγραφικούς παράγοντες LEF-1/TCF και με τον τρόπο αυτό επιτρέπει τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων, όπως της c-myc και της κυκλίνης D, που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Όταν η οδός δεν ενεργοποιείται από τις Wnt, η β-κατενίνη αποικοδομείται από το σύμπλεγμα της κινάσης-3β της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK-3β complex)[63,64].

Στα προστατικά καρκινικά κύτταρα υπάρχουν αλληλοπαρεμβολές μεταξύ της σηματοδότησης των Wnt και του AR, οι οποίες προκύπτουν μέσω διαφόρων μηχανισμών. Η β-κατενίνη προάγει την ανδρογονική σηματοδότηση μέσω δέσμευσης στο DNA του AR, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή γονιδίων που ρυθμίζονται από τα ανδρογόνα. Έχει, επίσης, αναφερθεί πως το γονίδιο του AR είναι άμεσος στόχος των μεταγραφικών παραγόντων LEF-1/TCF[64]. Αν και με την ενεργοποίηση του μονοπατιού των Wnt παρατηρείται αύξηση σε επίπεδο mRNA του ανδρογονικού υποδοχέα, προκαλείται μειορύθμιση («downregulation») στα επίπεδα της πρωτεΐνης του AR στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, υποδεικνύοντας την εμπλοκή μεταμεταγραφικών ρυθμιστικών μηχανισμών[64]. Πράγματι, πέραν των παραπάνω δράσεων, το σηματοδοτικό μονοπάτι των Wnt ενεργοποιεί την Akt, η οποία προάγει τη

διαμεσολαβούμενη από τον παράγοντα MDM2 αποικοδόμηση του AR[64]. Λαμβάνοντας όλα αυτά υπόψιν, φαίνεται πως το μονοπάτι σηματοδότησης των Wnt ρυθμίζει τα επίπεδα του AR στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη μέσω αρκετών διαφορετικών οδών.

Συμπερασματικά, δεδομένου πως η ορμονοθεραπεία δεν έχει φέρει την καλύτερη δυνατή λύση στην αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη, κρίνεται παραπάνω από αναγκαίο να συνεχίσουν οι έρευνες για τη διαλεύκανση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της νόσου και να σχεδιαστούν παράγοντες που στοχεύουν εκλεκτικά, σε διάφορα στάδια, τις οδούς μεταγωγής σήματος, τόσο στην περίπτωση ανδρογονοεξαρτώμενων όσο και ανδρογονο-ανεξάρτητων μονοπατιών (όπως, για παράδειγμα, παράγοντες που επεμβαίνουν σε διαδικασίες ρύθμισης της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής επιβίωσης, της απόπτωσης, της αγγειογένεσης, κ.ο.κ.). Η ανάπτυξη αυτών σε κλινικό επίπεδο θα μπορούσε δυνητικά να τους εισάγει στα θεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται έναντι της εν λόγω νόσου, μειώνοντας την επικινδυνότητα και τη θνησιμότητά της. Παράλληλα, απαραίτητη είναι η εύρεση βιολογικών δεικτών, τόσο για την πρώιμη πρόληψη της νόσου, όσο και για τη διασφάλιση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας.

1.3. H_2S: ο τρίτος αέριος διαβιβαστής

Ως επί το πλείστον, τα διάφορα μόρια σηματοδοτήσεως, όπως είναι οι νευροδιαβιβαστές και οι ορμόνες, αποθηκεύονται σε κυστίδια, που περιέχουν σε αφθονία ποσότητες αυτών, από τα οποία απελευθερώνονται με ελεγχόμενο τρόπο και σε μικρά ποσοστά ανά διαστήματα. Αντιθέτως, οι αέριοι διαβιβαστές είναι μόρια που δεν αποθηκεύονται τοιουτοτρόπως, αλλά συντίθενται με βάση τις εκάστοτε ανάγκες, με τα ένζυμα βιοσύνθεσής τους να ρυθμίζονται αναλόγως σε επίπεδο έκφρασης και δραστικότητας[65]. Όταν αναφερόμαστε στους αέριους διαβιβαστές, κάνουμε λόγο για μικρού μεγέθους αέρια μόρια που διαπερνούν εύκολα τις μεμβράνες και επομένως, η δράση τους δεν εξαρτάται από τη σύνδεσή τους σε μεμβρανικούς υποδοχείς[66].

Για πολλές δεκαετίες, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) ήταν γνωστό ως τοξικό αέριο, οικείο μόνο στους επιστήμονες που ενδιαφέρονταν για τη φυσική του περιβάλλοντος ή την τοξικολογία που σχετίζεται με τις εξατμίσεις του κινητήρα των αυτοκινήτων και το νέφος. Η ανακάλυψη στα τέλη της δεκαετίας του 1980 ότι το NO παράγεται και στα κύτταρα των θηλαστικών[67], σηματοδότησε μια πραγματική επανάσταση στο πεδίο των αέριων διαβιβαστών. Το NO συντίθεται ενδογενώς από μια οικογένεια ενζύμων (NO

συνθάσες), με πρόδρομη ουσία το αμινοξύ L-αργινίνη, ενώ πολλές θεμελιώδεις ρυθμιστικές λειτουργίες του εντοπίζονται σε συστήματα, όπως το καρδιαγγειακό, το ανοσοποιητικό, το κεντρικό και το περιφερικό νευρικό[68]. Μια δεκαετία αργότερα, το μονοξείδιο του άνθρακα (CO), ένα επιπλέον αέριο γνωστό μέχρι τότε για την τοξικότητά του ως παραπροϊόν της καύσης στους κινητήρες, αναδείχθηκε ως ο δεύτερος αέριος διαβιβαστής και ρυθμιστής συστημάτων, όπως το καρδιαγγειακό και το ανοσοποιητικό. Το CO παράγεται ως αποτέλεσμα μεταβολισμού της αίμης, μέσω μιας οικογένειας ενζύμων που ονομάζονται αιμοξυγενάσες[69].

Ακόμα πιο πρόσφατα, στην οικογένεια των αέριων διαβιβαστών ήρθε να προστεθεί το υδρόθειο (H_2S). Δεν είναι πολλά τα χρόνια που έχουν περάσει από τότε που το συγκεκριμένο αέριο ήταν γνωστό από την παραγωγή του στα βακτήρια[70] και αναγνωριζόταν κατά βάση ως τοξικό αέριο και βλαβερός για το περιβάλλον παράγοντας, που συναντάται σε ηφαιστειακά αέρια, έλη και διάφορες βιομηχανικές πηγές (ορυχεία, διυλιστήρια πετρελαίου, κ.ά.)[71]. Ήταν αποδεδειγμένο πως σε υψηλές συγκεντρώσεις το H_2S είναι τοξικό στα μιτοχόνδρια, καθώς αναστέλλει το σύμπλοκο IV (Complex IV) της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και εμποδίζει την αερόβια αναπνοή[72]. Ως εκ τούτου, κανείς δεν υπέθετε πως το H_2S θα μπορούσε ενδεχομένως να διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στον άνθρωπο. Η πρώτη φυσιολογική λειτουργία του που ταυτοποιήθηκε σε θηλαστικά ήταν ο ρόλος του ως νευροτροποποιητής στον εγκέφαλο[73]. Σύντομα, το H_2S βρέθηκε να συμμετέχει συνεργιστικά με το NO στη χάλαση των λείων μυών[74]. Μέχρι σήμερα, οι κύριες δράσεις του H_2S αφορούν στο κεντρικό νευρικό[75] και το καρδιαγγειακό σύστημα[76,77], αν και πρόσθετες λειτουργίες του έχουν εντοπιστεί στο πεπτικό[78], το μυοσκελετικό[79], το ενδοκρινικό[80,81] το νεφρικό[82], το αναπνευστικό[83] και το αναπαραγωγικό σύστημα[84]. Το ενδογενές υδρόθειο έχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης των συστημάτων αυτών, ενώ διατάραξη της φυσιολογικής του παραγωγής έχει ταυτοποιηθεί σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως η υπέρταση, το Alzheimer, ο σακχαρώδης διαβήτης, η ελκώδης κολίτιδα και η νεφρική νόσος τελικού σταδίου[71,85,86].

1.3.1. Ενδογενής βιοσύνθεση και καταβολισμός του H_2S

Στα θηλαστικά, η ενδογενής ενζυματική παραγωγή υδροθείου προέρχεται κυρίως από το μεταβολισμό της L-κυστεΐνης και της ομοκυστεΐνης, μέσω της δράσης της γ-λυάσης της κυσταθειονίνης (CSE) και της β-συνθάσης της κυσταθειονίνης (CBS), δύο ενζύμων των οποίων η δράση εξαρτάται από τη φωσφορική πυριδοξάλη (PLP)[87]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι δύο αυτές πρωτεΐνες εντοπίζονται κυρίως στο κυτοσόλιο[87]. Ωστόσο, αύξηση στα επίπεδα του ενδοκυττάριου ασβεστίου, παραδείγματος χάριν σε συνθήκες υποξίας, προκαλεί τη μετατόπιση του CSE στα μιτοχόνδρια[88]. Ομοίως,

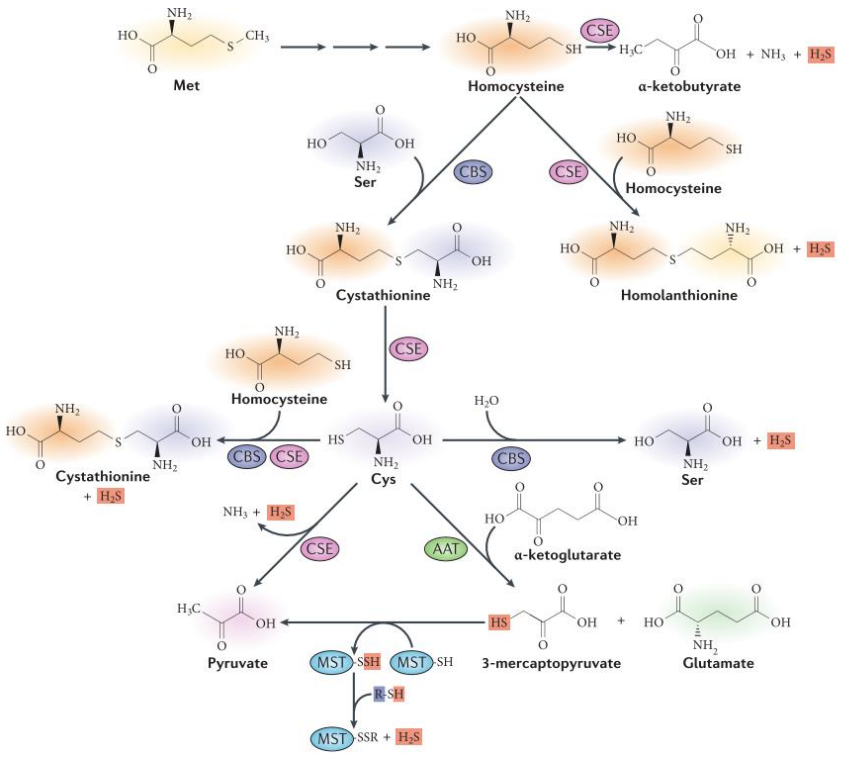
μετατόπιση του CBS στα μιτοχόνδρια έχει αποδειχθεί σε πρόσφατες μελέτες σε ηπατικά κύτταρα υπό συνθήκες ηρεμίας[89], καθώς και σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου[90].

Το CSE είναι κατά βάση υπεύθυνο για την παραγωγή υδροθείου στο καρδιαγγειακό και το αναπνευστικό σύστημα, καθώς και σε περιφερικά όργανα, όπως το ήπαρ, τους νεφρούς, τη μήτρα, τον πλακούντα, τις νησίδες του παγκρέατος και το γαστρεντερικό σωλήνα[87]. Αντιθέτως, το CBS είναι υπεύθυνο για την παραγωγή υδροθείου στο κεντρικό νευρικό σύστημα και τα αστροκύτταρα. Η έκφρασή του έχει εντοπιστεί, επίσης, στο καρδιαγγειακό σύστημα, το αναπνευστικό σύστημα, το ήπαρ, τους νεφρούς, το πάγκρεας και το γαστρεντερικό σωλήνα[87]. Δεδομένου ότι τα δύο αυτά ένζυμα δεν παρουσιάζουν ειδικότητα για ένα μονάχα υπόστρωμα, συμμετέχουν σε παραπάνω από μία αντιδράσεις που καταλήγουν στην παραγωγή υδροθείου («reverse transsulfuration pathway»), όπως φαίνεται στην εικόνα 3.

Το τρίτο ένζυμο παραγωγής H_2S είναι η 3-μερκαπτοπυροσταφυλική θειοτρανσφεράση (3-MST), ένα PLP-ανεξάρτητο ένζυμο που δρα με συμπαράγοντα τον ψευδάργυρο και έχει ως υπόστρωμα το 3-μερκαπτοπυροσταφυλικό οξύ (3-MP). Το 3-MP παράγεται από την L-κυστεΐνη μέσω της αμινοτρανσφεράσης της κυστεΐνης (CAT) υπό την παρουσία α-κετογλουταρικού οξέος. Στη συνέχεια, το 3-MST μεταφέρει το θείο από το 3-MP προς δημιουργία ενώσεων που περιέχουν θείο ή προς σχηματισμό στοιχειακού θείου. Στην πρώτη περίπτωση, μέσω των ενζύμων θειοθειική θειοτρανσφεράση ή θειοθειική αναγωγάση παράγεται H_2S. Στη δεύτερη περίπτωση, από το στοιχειακό θείο, μέσω αναγωγικών παραγόντων, προκύπτει και πάλι ο αέριος διαβιβαστής[91]. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι το 3-MP, εκτός από το ότι δρα ως υπόστρωμα του 3-MST, μπορεί επίσης να παράγει H_2S αυθόρμητα, δηλαδή σε διάλυμα, απουσία οποιωνδήποτε κυτταρικών συστατικών ή ενζύμων[92].

Το 3-MST εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο κεντρικό νευρικό σύστημα και είναι υπεύθυνο για τη μεγαλύτερη παραγωγή H_2S στους νευρώνες[91]. Έχει εντοπιστεί ακόμα στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα, στα καρδιομυοκύτταρα, στους νεφρούς και στο ήπαρ. Τόσο το 3-MST, όσο και το CAT, συναντώνται στο κυτοσόλιο και τα μιτοχόνδρια[87].

Τα CBS, CSE και 3-MST παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης ανάλογα με τον ιστό, τα οποία εμφανίζουν αυξορύθμιση ή μειορύθμιση («upregulation» ή «downregulation») υπό διάφορες συνθήκες. Ως τελικό προϊόν του μεταβολισμού της κυστεΐνης από τα CBS και CSE, το H_2S ασκεί αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση στη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών. Αυξημένα επίπεδα H_2S δείχνουν να αναστέλλουν τη δραστηριότητα του CSE[93] και το ρυθμό γλυκονεογένεσης από την κυστεΐνη[94].



Εικόνα 3: Ενζυματικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του ενδογενούς H_2S[91]

Μία πρόσθετη ενζυματική οδός για την παραγωγή H_2S από την D-κυστεΐνη αναγνωρίσθηκε πρόσφατα στους νεφρούς[95]. Πέραν, όμως, του ενζυματικού τρόπου παραγωγής του διαβιβαστή συναντάται σε μικρότερα ποσοστά και ο μη ενζυματικός. Συγκεκριμένα, υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες και υπεργλυκαιμίας, τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα παράγουν H_2S μέσω αναγωγής στοιχειακού θείου ή ανόργανων πολυσουλφιδίων, με τη βοήθεια αναγωγικών παραγόντων προερχόμενων από την οξείδωση της γλυκόζης. Επιπροσθέτως, παρατηρείται μη ενζυματική οξείδωση των σουλφιδίων (S^{2-}) σε θειοθειικά ιόντα ($S_2O_3^{2-}$), που με τη σειρά τους μετατρέπονται σε θειώδη (SO_3^{2-}). Η τελευταία αυτή διαδικασία διενεργείται είτε μέσω της αναγωγάσης των θειοθειικών στο ήπαρ, τους νεφρούς και τους ιστούς του εγκεφάλου είτε μέσω της σουλφοτρανσφεράσης των θειοθειικών στο ήπαρ. Τέλος, υδρόθειο απελευθερώνεται και από ενδοκυττάριες αποθήκες άλλων μορίων που περιέχουν θείο[91,96].

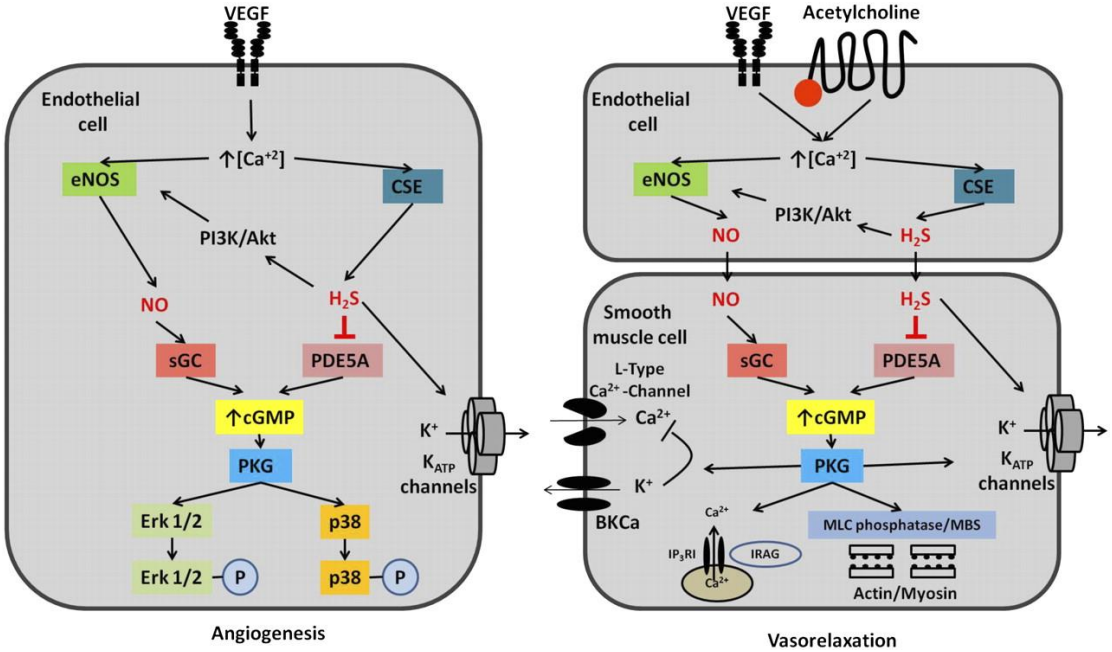
Το H_2S έχει τη δυνατότητα να μεταβολίζεται μέσω διαφόρων μονοπατιών στα φυσιολογικά κύτταρα των θηλαστικών. Η κύρια οδός καταβολισμού του λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια, όπου μετατρέπεται σε θειοθειικό ιόν ($S_2O_3^{2-}$) μέσω διαφόρων ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων της οξειδοαναγωγάσης της κινόνης και της S-τρανσφεράσης. Το προϊόν αυτό μεταβολίζεται περαιτέρω σε θειώδες ιόν (SO_3^{2-}), μέσω του ενζύμου ροδανάση, με το τελικό προϊόν να είναι το θειικό ιόν (SO_4^{2-}). Μία δεύτερη οδός καταβολισμού συναντάται στο κυτοσόλιο, όπου το H_2S υφίσταται μεθυλίωση από

το ένζυμο S-μεθυλοτρανσφεράση θειολών προς μεθανοθειόλη και, τελικά, προς διμεθυλοσουλφίδιο. Η τρίτη οδός καταβολισμού περιλαμβάνει αλληλεπίδραση μεταξύ του H_2S και της μεθαιμοσφαιρίνης, που οδηγεί στην παραγωγή θειοαιμοσφαιρίνης, η οποία θεωρείται ως ένας πιθανός βιοδείκτης του H_2S στο πλάσμα. Παράλληλα, σημειώνονται αλληλεπιδράσεις του με μέταλλα και δισουλφίδια μακρομορίων. Το H_2S απομακρύνεται από τον οργανισμό μέσω της εκπνοής, των ούρων, των αερίων ή των κοπράνων[87,91].

1.3.2. Βασικότερα σηματοδοτικά μονοπάτια του H_2S

Μετά την παραγωγή του, το H_2S υπάρχει σε ισορροπία με την ανιονική μορφή (HS^-), ενώ επίσης σχηματίζει δραστικές δομές, γνωστές ως πολυσουλφίδια, η δράση των οποίων είναι πιθανό να περιορίζεται στα κύτταρα όπου παράγονται. Ένας βασικός μηχανισμός μέσω του οποίου το υδρόθειο ασκεί τις δράσεις του, είναι η μετα-μεταφραστική τροποποίηση της δραστικότητας πρωτεϊνών, δια σουλφυδρυλίωσης καταλοίπων κυστεΐνης. Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας ομάδας σουλφυδρυλίου (R-SSH), που μεταβάλλει την πρωτεϊνική δομή και λειτουργία, οδηγώντας είτε σε αναστολή είτε σε ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής δράσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα πρωτεΐνης, της οποίας η δραστηριότητα αυξάνεται μετά από σουλφυδρυλίωση, είναι η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης (GAPDH), που συμμετέχει τόσο στη γλυκόλυση όσο και σε πυρηνικές διαδικασίες, όπως η μεταγραφή γονιδίων[65].

Η επίδραση του H_2S επεκτείνεται και στη δραστηριότητα καναλιών ιόντων, αλλά και κινασών. Μέσω σουλφυδρυλίωσης των ATP-εξαρτώμενων διαύλων καλίου (K_{ATP} channels) επιτυγχάνεται η ενεργοποίησή τους[97]. Παράλληλα, ο αέριος διαβιβαστής ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K/Akt, προκαλώντας τη μετέπειτα φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της eNOS από την Akt. Οι δράσεις αυτές, σε συνδυασμό με τη δράση του NO και την προκαλούμενη από το H_2S αναστολή του ενζύμου καταβολισμού του cGMP (φωσφοδιεστεράση 5), προάγουν την αγγειοδιαστολή και την αγγειογένεση, ύστερα από ενεργοποίηση του κυκλικού GMP και της πρωτεϊνικής κινάσης G[98]. Εν συντομία, το εν λόγω μονοπάτι ξεκινά με τη σύνδεση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF ή της ακετυλοχολίνης στον υποδοχέα τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων ασβεστίου και τη μετέπειτα ενεργοποίηση της δραστηριότητας τόσο της eNOS όσο και του CSE, ένζυμα που αυξάνουν την παραγωγή NO και H_2S αντίστοιχα. Τελικά, ενεργοποίηση της PKG, μέσω των προαναφερθέντων δράσεων, συνεπάγεται αγγειογένεση στα ενδοθηλιακά κύτταρα και αγγειοδιαστολή στα λεία μυϊκά κύτταρα, όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί[98].



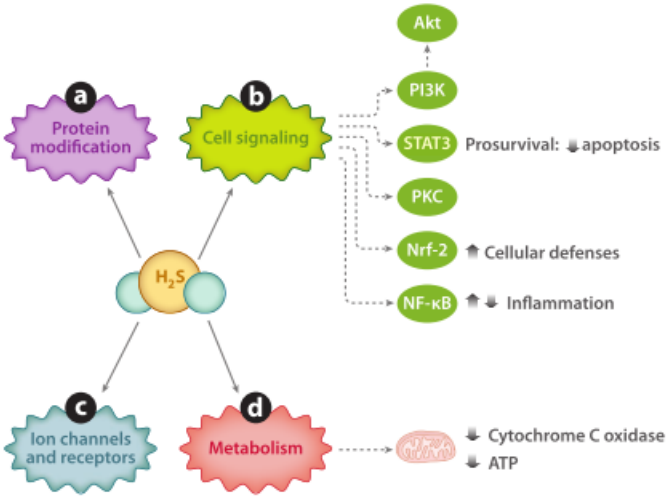
Εικόνα 4: Μηχανισμοί αγγειογένεσης και αγγειοδιαστολής που σχετίζονται με το H_2S[98]

Συνεχίζοντας στα μονοπάτια όπου εμπλέκεται ο αέριος διαβιβαστής, γίνεται αναφορά στη σηματοδοτική οδό του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα NF-κB. Αν και υπάρχουν έρευνες που έχουν συσχετίσει το υδρόθειο με παρεμπόδιση της μετατόπισης του NF-κB στον πυρήνα και άρα αναστολή της δράσης του[99], έχει αποδειχθεί πως, μέσω σουλφυδρυλίωσης της κυστεΐνης 38 της p65 υπομονάδας του NF-κB, το H_2S ενεργοποιεί το αντιαποπτωτικό μονοπάτι που σηματοδοτείται από τον παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (TNF-α)[100]. Με τον τρόπο αυτό, λοιπόν, το H_2S φαίνεται να δρα ως υποκινητής οδών πολλαπλασιασμού και κυτταρικής επιβίωσης. Πράγματι, πειραματικές μελέτες δείχνουν πως έχει την ικανότητα να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό διαφόρων σειρών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων ενδοθηλιακών κυττάρων, ινοβλαστών, ηπατοκυττάρων και καρκινικών κυττάρων[101]. Οι μηχανισμοί σηματοδότησης που εμπλέκονται, πέραν του προαναφερθέντος, περιλαμβάνουν αφενός την ενεργοποίηση συγκεκριμένων μονοπατιών κινασών, με τις βασικότερες να είναι οι p38-MAPK και PI3K/Akt, και αφετέρου την αναστολή φωσφατασών, όπως η PTEN, πιθανώς μέσω σουλφυδρυλίωσης[71,91,102].

Επιπροσθέτως, μέσω ενεργοποίησης κινασών, όπως η ERK 1/2, και παραγόντων, όπως ο Nrf-2 και ο STAT-3, το υδρόθειο παρουσιάζει κυτοπροστατευτική δράση[91,99]. Στην αντιοξειδωτική και κυτοπροστατευτική δράση του υδροθείου συμβάλλει το γεγονός ότι αποτελεί ισχυρό αναγωγικό μέσο, ιδιότητα που του επιτρέπει να αλληλεπιδρά με οξειδωτικούς παράγοντες. Έχει την ικανότητα να ανάγει δισουλφιδικούς δεσμούς και να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, ενισχύοντας έτσι την αντιοξειδωτική

δράση του οργανισμού. Πέραν αυτών, αυξάνει τα επίπεδα γλουταθειόνης μέσω της ενεργοποίησης της συνθετάσης της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης[91,103].

Τέλος, σε επίπεδο μεταβολισμού, σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις το H_2S μπορεί να διεγείρει την κυτταρική βιοενεργειακή λειτουργία, δρώντας ως δότης ηλεκτρονίων προς τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο II (Complex II) και αυξάνοντας τα μιτοχονδριακά επίπεδα του κυκλικού AMP[104]. Ωστόσο, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, αναστέλλει την οξειδάση του κυτοχρώματος c (Complex IV), μειώνοντας έτσι την οξειδωτική φωσφορυλίωση και τη βιοσύνθεση του ATP, ενώ παράλληλα μπορεί να ασκήσει προ-οξειδωτικές δράσεις και να προκαλέσει βλάβες στο DNA[71,104]. Προκύπτει, λοιπόν, πως χαμηλές συγκεντρώσεις του αέριου διαβιβαστή ασκούν κυτταροπροστατευτική και αντιοξειδωτική δράση, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις διεγείρουν προφλεγμονώδη μονοπάτια και οδηγούν σε τοξικότητα και κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα 5: Μοριακοί μηχανισμοί δράσης του H_2S[99]

1.4. H_2S και καρκίνος

Με τις δράσεις του να επεκτείνονται σε μηχανισμούς σχετικούς με την αγγειοδιαστολή, την αγγειογένεση, το μιτοχονδριακό βιοενεργειακό σύστημα, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση, το H_2S αποτελεί τον τρίτο αέριο διαβιβαστή του οποίου η βιολογία έχει αναμειχθεί με εκείνη διαφόρων τύπων καρκίνου. Παρά το γεγονός ότι έχει διεξαχθεί ένα μεγάλο ποσοστό μελετών για να

διαλευκανθεί ο ακριβής ρόλος του στον καρκίνο, το συγκεκριμένο επιστημονικό πεδίο είναι γεμάτο αντικρουόμενα αποτελέσματα και αντιπαραθέσεις, εμποδίζοντας έτσι τη μετάβαση στην κλινική πράξη. Μέχρι σήμερα, εκτιμάται πως το υδρόθειο παρουσιάζει διφασική φαρμακολογική συμπεριφορά (τόσο προκαρκινική όσο και αντικαρκινική), καθώς όχι μόνο η αναστολή της βιοσύνθεσης του, αλλά και η ανύψωση των κυτταρικών του επιπέδων πέρα από ένα όριο μέσω εξωγενούς χορήγησης δοτών (σε επίπεδα mM), καθίσταται επιζήμια για τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων[105].

1.4.1. Αλλαγές στην έκφραση των ενζύμων βιοσύνθεσης H_2S στον καρκίνο

Τα τελευταία χρόνια ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στον έλεγχο της έκφρασης των CBS, CSE και 3-MST σε καρκινικά κύτταρα διαφόρων τύπων, συγκρίνοντας τα με τα αντίστοιχα από ιστούς μη καρκινικούς ή κυτταρικές σειρές ομοίου τύπου που δεν έχουν μετασχηματιστεί σε καρκινικές. Ξεκινώντας με το CBS, αυξημένα επίπεδα έκφρασής του που οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή υδροθείου έχουν εντοπιστεί σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου[90], των ωοθηκών[106], του προστάτη[107] και του μαστού[108], ενώ αυξορύθμιση της έκφρασης του CBS, χωρίς να έχουν μετρηθεί παράλληλα τα επίπεδα του ενδογενούς υδροθείου, έχει συσχετιστεί με τον καρκίνο των χοληφόρων οδών[109], του πνεύμονα[110], των νεφρών[111] και το μυέλωμα[112].

Όσον αφορά στο CSE, λιγότερα είναι τα διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα. Αυξορύθμιση των επιπέδων του έχει αποδειχθεί σε μια σειρά τύπων καρκίνου, που περιλαμβάνουν το μελάνωμα[113], τον καρκίνο του παχέος εντέρου[105,114], του μαστού[115] και του πνεύμονα[110], ενώ αντίστοιχη αυξημένη ρύθμιση των επιπέδων του 3-MST έχει παρατηρηθεί στο αστροκύτωμα[105], τον καρκίνο του πνεύμονα[110], το μελάνωμα[113] και το γλοίωμα[105,116].

Σε αντίθεση με τις περιπτώσεις υπερέκφρασης, έχει διαπιστωθεί μειωμένη έκφραση του CSE σε ανθρώπινο ιστό προστατικού καρκίνου, καθώς και σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη ανθεκτικά στη θεραπεία με αντιανδρογόνα[117].

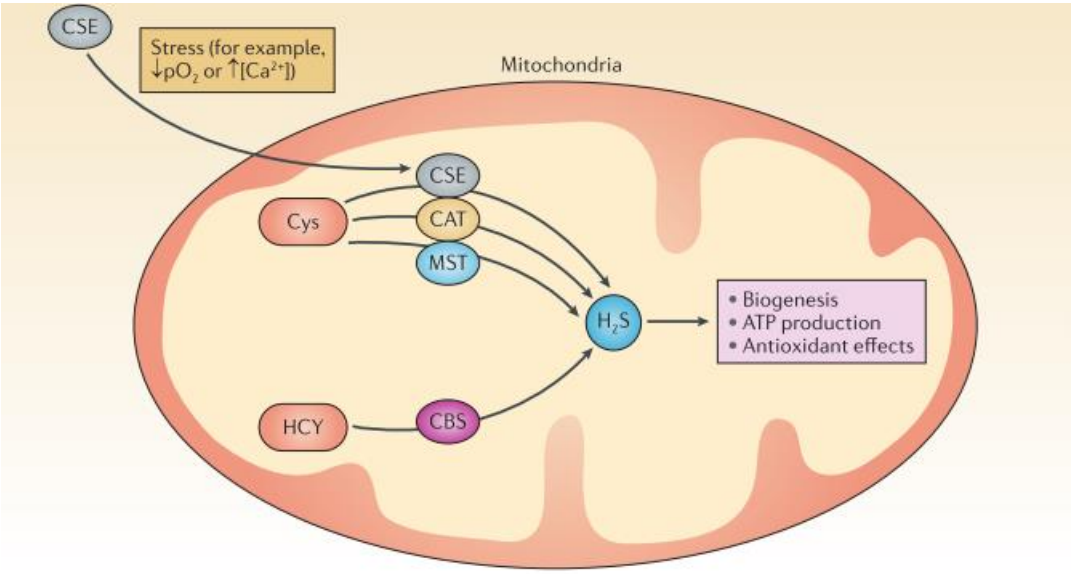
1.4.2. Ο ρόλος του ενδογενούς H_2S στον καρκίνο

1.4.2.1. Μηχανισμοί προκαρκινικής δράσης

Το ενδογενές H_2S μπορεί να ασκήσει δράσεις που επάγουν την καρκινογένεση, μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν 1) ρύθμιση του μιτοχονδριακού βιοενεργειακού

συστήματος, 2) επαγωγή της αγγειογένεσης και 3) ενεργοποίηση αντιαποπτωτικών μονοπατιών εντός των καρκινικών κυττάρων[118].

Όσον αφορά στο πρώτο κομμάτι, όπως έχει ήδη αναφερθεί, στα καρκινικά κύτταρα, λόγω διαφόρων συνθηκών, συμπεριλαμβανομένης της υποξίας, τα ένζυμα παραγωγής υδροθείου CBS και CSE συχνά μετατοπίζονται από το κυτοσόλιο στα μιτοχόνδρια, όπου μαζί με το 3-MST συντελούν στην παραγωγή του αέριου διαβιβαστή[88,90]. Οι ρόλοι του H_2S στο διαμέρισμα αυτό είναι πολλαπλοί. Αρχικά, όσον αφορά στη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το H_2S αφενός δρα σα δότης ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο II και αυξάνει τα επίπεδα του κυκλικού AMP, προάγοντας την οξειδωτική φωσφορυλίωση[119]. Αφετέρου ενεργοποιεί την GAPDH μέσω σουλφυδρυλίωσης, προάγοντας τη γλυκόλυση[65]. Με τον τρόπο αυτό, έχουμε αύξηση των επιπέδων του ATP. Σε δεύτερο στάδιο, ο διαβιβαστής παρουσιάζει αντιοξειδωτικές δράσεις μέσω της εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών οξυγόνου και της αναγωγής της γλουταθειόνης, δημιουργώντας ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων[91,103].

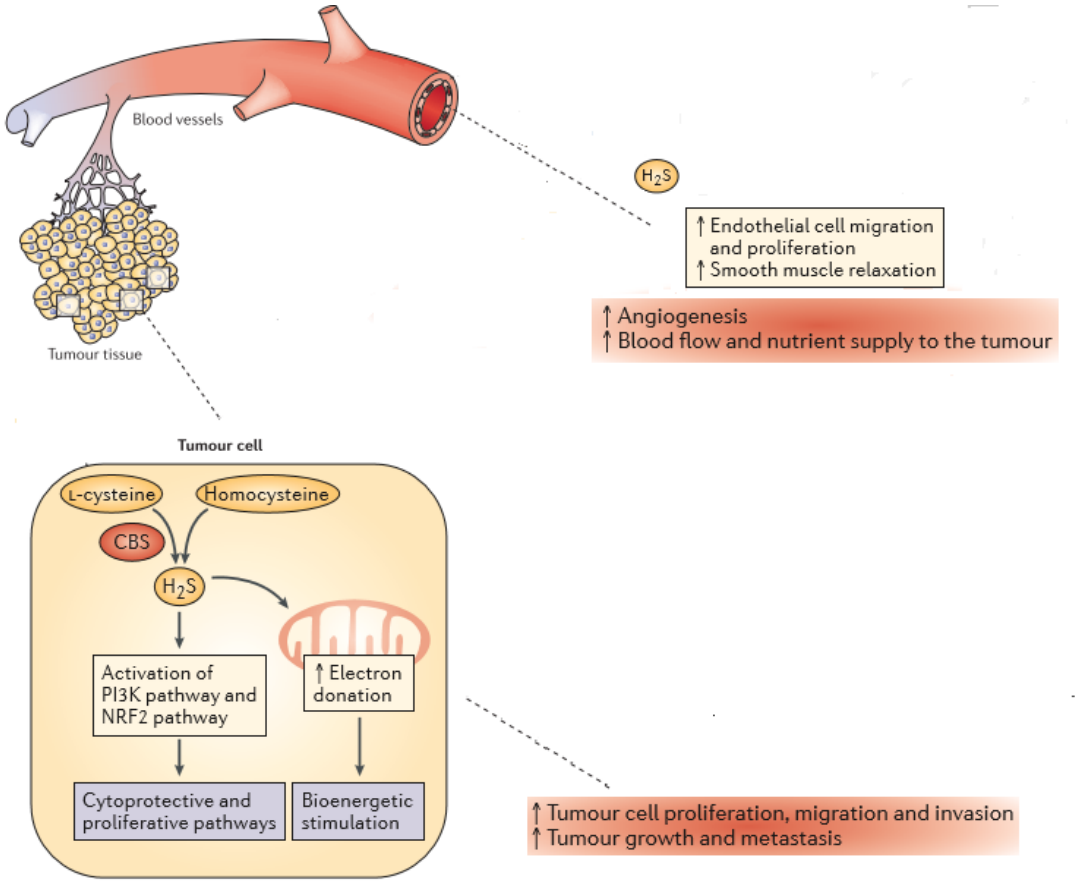


Εικόνα 6: Ευεργετικές δράσεις του H_2S επί των καρκινικών κυττάρων σε μιτοχονδριακό επίπεδο[87]

Όσον αφορά στην επαγωγή της αγγειογένεσης, οι μηχανισμοί στους οποίους συμμετέχει το υδρόθειο, και οι οποίοι περιγράφηκαν σε προηγούμενη ενότητα, έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων αγγείων που παρέχουν οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά στον όγκο, ενώ παράλληλα του επιτρέπουν να απαλλάσσεται από τοξικές γι' αυτόν ουσίες. Επεκτεινόμενοι και πέραν των δράσεων αυτών, το ενδογενώς παραγόμενο υδρόθειο έχει τη δυνατότητα να διαχυθεί εκτός των κυττάρων του όγκου και να διεγείρει την αγγειογένεση και γύρω από τα καρκινικά κύτταρα, μέσω

παρακρινικών δράσεων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, που περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, ενεργοποίηση μονοπατιών, όπως αυτό των cGMP/PKG, Raf/ERKs, κ.ά.. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η διέγερση της αγγειογένεσης και της αγγειοδιαστολής περί του όγκου, με άμεσο επακόλουθο την αύξηση της ροής του αίματος προς αυτόν και άρα, τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών[105,120].

Στις αντιαποπτωτικές και κυτοπροστατευτικές δράσεις που ασκεί το ενδογενές υδρόθειο στο περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων, έρχονται να προστεθούν τα προαναφερθέντα σηματοδοτικά μονοπάτια τόσο του παράγοντα Nrf2, όσο και των PI3K/Akt και NF-κB, τα οποία ενεργοποιούνται από το διαβιβαστή και συντελούν στην κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό.



Εικόνα 7: Ο ρόλος του ενδογενούς H_2S στον καρκίνο[105]

1.4.2.2. In vitro και in vivo μελέτες για το ρόλο του ενδογενούς H_2S στον καρκίνο

Για τη διερεύνηση του ρόλου του ενδογενούς υδροθείου στον καρκίνο έχουν διεξαχθεί τόσο in vitro, όσο και in vivo πειράματα, που σχετίζονται με την αναστολή της βιοσύνθεσής του. Στα πρώτα, κατά κύριο λόγο, γίνεται αποσιώπηση των ενζύμων CBS,

CSE και 3-MST μέσω siRNA ή shRNA τεχνικής ή χορηγούνται φαρμακολογικοί αναστολείς αυτών, με το PAG (προπαργυλογλυκίνη) να είναι ο πλέον χρησιμοποιούμενος στην αναστολή του CSE και το AOAA (αμινο-οξικό οξύ) με την υδροξυλαμίνη στην αναστολή του CBS[121]. Στα in vivo πειράματα γίνεται, επίσης, χρήση αναστολέων σε πειραματόζωα ή αποσιώπηση των ενζύμων παραγωγής H_2S σε καρκινικά κύτταρα και εμφύτευσή τους στα διάφορα μοντέλα ζώων[105].

Πολλές είναι οι ομάδες των ερευνητών που έχουν ελέγξει τη συμβολή του ενδογενούς υδροθείου στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Σε in vitro μοντέλο οι Szabo et al. έδειξαν πως η αποσιώπηση και η φαρμακολογική αναστολή του CBS μέσω του AOAA έχει ως αποτέλεσμα μείωση στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Αποδείχθηκε πως αυτό μεσολαβείται δια καταστολής του μιτοχονδριακού ενεργειακού συστήματος, όπου παρατηρείται μείωση της βασικής κυτταρικής αναπνοής, της κατανάλωσης οξυγόνου, της παραγωγής ATP, καθώς και της γλυκόλυσης, κάτι που ίσως αποδίδεται σε αναστολή της GAPDH. Τα αποτελέσματα αναπαράχθηκαν και με φαρμακολογική αναστολή ή αποσιώπηση του CBS σε in vivo μοντέλο καρκίνου σε ποντίκια, όπου σημειώθηκε ελάττωση της ανάπτυξης του όγκου. Παρατηρήθηκε μείωση τόσο στα αγγεία εντός του όγκου, όσο και στη διακλάδωση και την επέκτασή τους γύρω από τον όγκο, κάτι που επιβεβαιώνει την παρακρινική δράση του υδροθείου, που δρα ως αγγειοδιασταλτικός και αγγειογενετικός παράγοντας[90]. Το γεγονός, όμως, πως η αποτελεσματικότητα του AOAA ήταν μεγαλύτερη έναντι της αποσιωπήσεως του CBS παραπέμπει στο ότι η φαρμακολογική δράση του εν λόγω μορίου επεκτείνεται και πέραν της αναστολής του CBS, όπως θα αναφερθεί και στη συνέχεια. Στα πειράματα αυτά αντίστοιχη χορήγηση PAG ή αποσιώπηση του CSE δεν είχε κάποιο αξιόλογο αποτέλεσμα[90].

Συνεχίζοντας στο ίδιο μοτίβο, μελέτη των Chao et al. σε in vitro μοντέλο καρκίνου του παχέος εντέρου έδειξε πως χορήγηση ενός προφαρμάκου του AOAA έχει τη δυνατότητα να μειώνει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μέσω καταστολής της μιτοχονδριακής αναπνοής, της γλυκολυτικής λειτουργίας, καθώς και διακοπής του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1. Η αντικαρκινική δράση του συγκεκριμένου παραγώγου επιβεβαιώθηκε και in vivo σε καρκίνο παχέος εντέρου σε ποντίκια[122].

Το 2013 οι Bhattacharyya et al. σε in vitro μοντέλο καρκίνου των ωοθηκών απέδειξαν πως η αποσιώπηση του CBS, καθώς και η φαρμακολογική αναστολή του, συνεπάγεται μείωση στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η δράση αυτή συσχετίστηκε με αυξημένη έκφραση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 και μειωμένη έκφραση του παράγοντα NF-κB, με επακόλουθο την ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών, καθώς και την αύξηση της ευαισθησίας των κυττάρων απέναντι στη θεραπεία με cis-

platin[106]. Επιπροσθέτως, οι ερευνητές παρατήρησαν πως χάριν στη μειορύθμιση της δραστηριότητας του CBS, την παρουσία του οποίου ταυτοποίησαν και στα μιτοχόνδρια, υπάρχουν αυξημένα επίπεδα ROS, που αποδίδονται είτε στα μειωμένα επίπεδα γλουταθειόνης ή υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) ή στο λόγο NAD/NADH, η μείωση του οποίου δείχνει κάποια διαταραχή στη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων[106]. In vivo, αποσιώπηση του CBS μείωσε την ανάπτυξη του όγκου και τον αριθμό των αιμοφόρων αγγείων σε αυτόν, ενώ παράλληλα βελτίωσε την ανταπόκρισή του στο χημειοθεραπευτικό παράγοντα[106].

Η προκαλούμενη, από την αναστολή της ενδογενούς βιοσύνθεσης H_2S, καταστολή των ενδογενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών και αύξηση στα επίπεδα των ROS ερμηνεύει και το εύρημα των Sen et al., που διαπίστωσαν πως, μόνο υπό παρουσία ενεργοποιημένων μακροφάγων, η αποσιώπηση του CBS έχει τη δυνατότητα να μειώνει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του μαστού, δράση που αναστρέφεται με τη χορήγηση δότη υδροθείου[108]. Υπενθυμίζεται πως τα μακροφάγα επάγουν οξειδωτικό stress προκειμένου να καταπολεμήσουν τα καρκινικά κύτταρα[123,124]. Ένας από τους κύριους μηχανισμούς με τους οποίους το επιτυγχάνουν αυτό είναι μέσω της παραγωγής οξειδωτικών παραγόντων, οι οποίοι οξειδώνουν τα λιπίδια των μεμβρανών του πλάσματος, παράγοντας δραστικές αλδεΰδες, όπως η μηλονοδιαλδεϋδη (MDA)[124,125]. Τα μόρια αυτά είναι ρίζες οξυγόνου που εν συνεχεία επιδεικνύουν κυτταρική τοξικότητα, μέσω σχηματισμού σταθερών προϊόντων μετά από αλληλεπίδρασή τους με διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών[125]. In vivo, η αποσιώπηση του CBS είχε το ίδιο αντίκτυπο στην ανάπτυξη του όγκου με τα in vitro πειράματα[108].

Το 2015 οι Sonke et al. έδειξαν, σε μοντέλο καρκινώματος των νεφρών, πως αναστολή του ενδογενούς υδροθείου μέσω της υδροξυλαμίνης μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μεταβολισμό και επιβίωση[126].

Προχωρώντας σε επόμενο τύπο καρκίνου, οι Szczesny et al. το 2016 έδειξαν, σε in vitro μοντέλο καρκίνου του πνεύμονα, πως αναστολή του CBS μέσω του AOAA μειώνει τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των κυττάρων, δράσεις που είναι εντονότερες όταν χορηγείται ο αναστολέας σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικό παράγοντα και που διενεργούνται μέσω επαγωγής της απόπτωσης, διαταραχής του μιτοχονδριακού βιοενεργειακού συστήματος και μείωσης της κατανάλωσης οξυγόνου. Τα ίδια αποτελέσματα επέφερε και η φαρμακολογική αναστολή του CBS είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικό παράγοντα in vivo, περιορίζοντας την ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα σε πειραματόζωα.

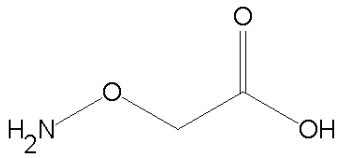
Όσον αφορά στην έρευνα για το ρόλο του ενδογενούς υδροθείου στον καρκίνο από τη σκοπιά των άλλων δύο ενζύμων, η βιβλιογραφία όσον αφορά στο 3-MST είναι ελλιπής. Όσον αφορά στο CSE, σε in vitro μοντέλο καρκίνου του μαστού τόσο η φαρμακολογική αναστολή του ενζύμου με τη χρήση PAG, όσο και η αποσιώπησή του, ανέστειλε την κυτταρική ανάπτυξη, πολλαπλασιασμό και μετανάστευση και προκάλεσε επαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης[115].

Σε αντίθεση με τους Szabo et al., οι Fan et al. το 2014 σε διαφορετικό in vitro μοντέλο αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου έδειξαν πως αποσιώπηση του CSE ή φαρμακολογική αναστολή του μέσω PAG μειώνει τη βιωσιμότητα, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων. Εν αρμονία με προηγούμενη διαπίστωση σχετική με το AOAA, η αναστολή μέσω PAG είχε καλύτερα αποτελέσματα από την αποσιώπηση του CSE[114]. In vivo, η αποσιώπηση του ενζύμου έδειξε επίσης ευεργετική δράση κατά του καρκίνου. Οι ίδιοι ερευνητές, στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, διαπίστωσαν πως το μονοπάτι των πρωτεϊνών Wnt ρυθμίζει σε μεταγραφικό επίπεδο την έκφραση του γονιδίου του CSE[114], δίνοντας έναυσμα για περαιτέρω μελέτες σχετικά με την εμπλοκή της σηματοδοτικής αυτής οδού και σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως του προστάτη.

Τέλος, σε in vitro μοντέλο ηπατοκαρκινώματος οι Yin et al. το 2012, αφότου διαπίστωσαν αυξημένη έκφραση του CSE, απέδειξαν πως αποσιώπησή του συνεπάγεται μείωση της βιωσιμότητας και του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων μέσω διακοπής του κυτταρικού κύκλου[127]. Στο ίδιο είδος καρκίνου, οι Pan et al. το 2014 έδειξαν πως αποσιώπηση του CSE ή αναστολή του μέσω PAG καταστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων, μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών απόπτωσης, παραγωγής ROS, διατάραξης της μιτοχονδριακής λειτουργίας και καταστολής σηματοδοτικών οδών κυτταρικής ανάπτυξης[128].

1.4.2.3. Φαρμακολογικό προφίλ των αναστολέων AOAA και PAG

<u>AOAA</u>



Εικόνα 8: Δομή του AOAA

Οι δράσεις του AOAA, κύριου αναστολέα των CBS/CSE, εκτείνονται σε ένα μεγάλο εύρος και η φαρμακολογία γύρω από το συγκεκριμένο παράγοντα είναι αρκετά περίπλοκη. Βασικό μειονέκτημά του αποτελεί το ότι αναστέλλει πολλά ένζυμα που είναι PLP-εξαρτώμενα, πέραν των CBS και CSE (IC_{50}= 1,1μM για το CSE και IC_{50}=8,5 μM για το CBS)[121]. Σε μοριακό επίπεδο, το ανασταλτικό αποτέλεσμα του AOAA επί της δραστικότητας του CBS, και πιθανότατα και άλλων PLP-εξαρτώμενων ενζύμων, πιστεύεται ότι οφείλεται σε προσβολή της βάσης Schiff που σχηματίζεται κατά τη σύνδεση CBS-PLP προς σχηματισμό συμπλόκων τύπου οξίμης[129].

Συνεχίζοντας με τις φαρμακολογικές του δράσεις, το AOAA μπορεί να αναστείλει την αμινοτρανσφεράση της κυστεΐνης (CAT) και να έχει επιπρόσθετες ανασταλτικές δράσεις στην παραγωγή του H_2S, καθώς μειώνει τα επίπεδα του υποστρώματος του 3-MST, 3-MP, αναστέλλοντας εμμέσως τη δραστηριότητά του[130].

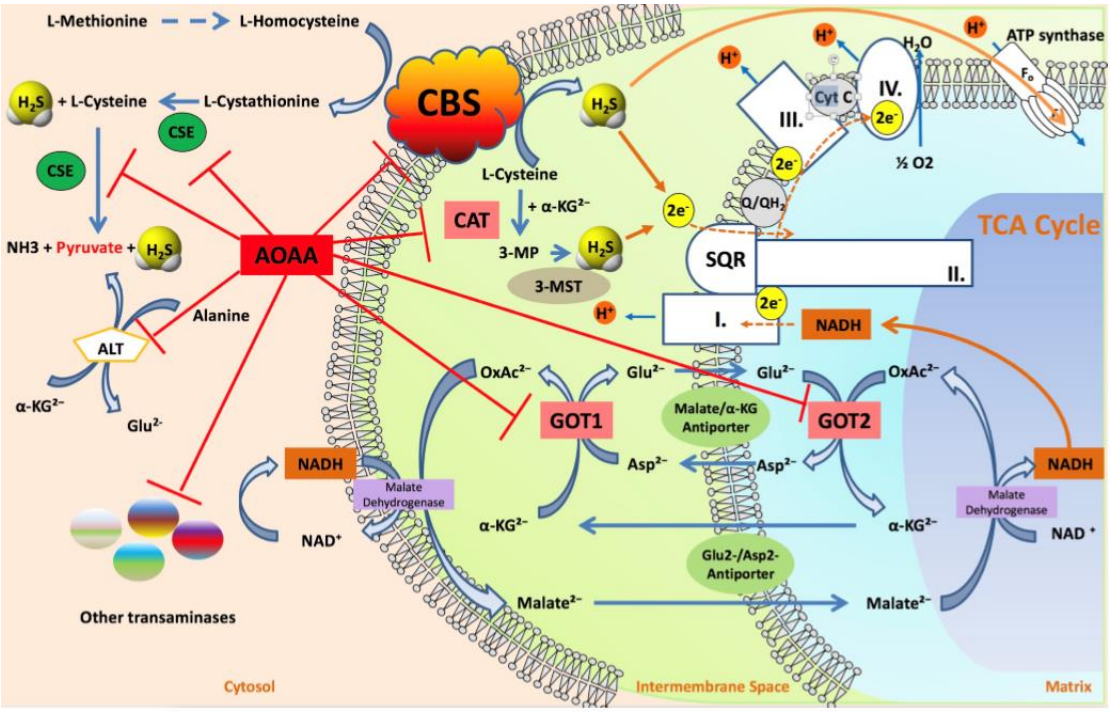
Ακόμα, το AOAA έχει δειχθεί πως αναστέλλει το ένζυμο γλουταμική οξαλοξεϊκή τρανσαμινάση (GOT1), αλλιώς γνωστό και ως ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (ASAT) ή ασπαρτική τρανσαμινάση (AST). Η GOT1 είναι ένα βασικό συστατικό του συστήματος μεταφοράς μηλικού/ασπαρτικού. Το σύστημα αυτό μετατοπίζει ηλεκτρόνια που παράγονται κατά τη γλυκόλυση κατά μήκος της ημιπερατής εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου, προκειμένου να προχωρήσει η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Αυτά τα ηλεκτρόνια εισέρχονται στη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο I (Complex I). Το συγκεκριμένο σύστημα μεταφοράς είναι απαραίτητο, καθώς η μιτοχονδριακή εσωτερική μεμβράνη είναι αδιαπέραστη σε NADH, ένα πρωτεύουσας σημασίας αναγωγικό μόριο της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η κυτοσολική GOT1 καθορίζει τη λειτουργία του εν λόγω συστήματος, καθώς καταλύει την αλληλομετατροπή ασπαρτικού και α-κετογλουταρικού οξέος προς οξαλοξικό και γλουταμικό, χρησιμοποιώντας τη φωσφορική πυριδοξάλη ως συνένζυμο. Με την αναστολή, λοιπόν, της GOT1 από το AOAA μειώνεται η μεταφορά δοτών ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, καταστέλλοντας έτσι το μιτοχονδριακό ενεργειακό σύστημα στα καρκινικά κύτταρα. Λαμβάνοντας υπόψιν πως το υδρόθειο συμμετέχει σε αυτό δίνοντας ηλεκτρόνια στο σύμπλοκο II, με την ταυτόχρονη αναστολή των CBS, CSE, 3-MST και GOT1, το AOAA παρεμβαίνει μέσω διαφορετικών οδών στη μιτοχονδριακή λειτουργία των καρκινικών κυττάρων[130,131].

Χάρη στη δυνατότητά του να αναστέλλει και την τρανσαμινάση του GABA (GABA-T), που επίσης εξαρτάται από το PLP, το AOAA χρησιμοποιήθηκε προς αύξηση του GABA σε αρκετές μη-τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες, στη δεκαετία του 1970 και του 1980, σε ασθενείς με ασθένεια του Huntington ή εμβοές. Οι μελέτες αυτές έδωσαν

χρήσιμες πληροφορίες για την ασφάλεια και την ανοχή του AOAA σε ανθρώπους[105,132,133].

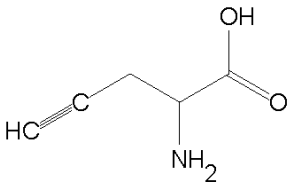
Στο νευρικό σύστημα, πέραν της ενεργοποίησης του GABA, το AOAA έχει συσχετιστεί με νευροτοξικότητα, επιληπτικές κρίσεις σε ποντικούς και απώλεια νευρωνικών κυττάρων στο ραβδωτό σώμα και τον ιππόκαμπο, μέσω αναστολής της μιτοχονδριακής αναπνοής. Εν μέρει, οι δράσεις αυτές ίσως να οφείλονται σε αναστολή της ενδογενούς σύνθεσης του αέριου διαβιβαστή[86].

Αναφέρεται πως το AOAA έχει χαμηλή λιποφιλικότητα, με αποτέλεσμα να καθίσταται δύσκολη η είσοδός του στα κύτταρα, γεγονός που ευθύνεται για τις υψηλές συγκεντρώσεις, επιπέδου mM, που απαιτούνται για τη δράση του σε αυτά[122].



Εικόνα 9: Φαρμακολογικό προφίλ του αναστολέα AOAA[130]

<u>PAG</u>



Εικόνα 10: Δομή του PAG

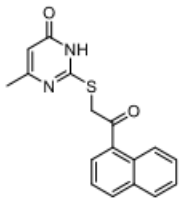
Το PAG είναι ο πλέον διαδεδομένος εκλεκτικός και μη-αντιστρεπτός αναστολέας του CSE. Όπως αναφέρθηκε, το CSE αποτελεί PLP-εξαρτώμενο ένζυμο. Η λυσίνη 212 (Lys212-hCSE) συνδέεται ομοιοπολικά με το συνένζυμο PLP μέσω του σχηματισμού μίας βάσης Schiff, μεταξύ της αμινομάδας της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης και της καρβονυλομάδας του PLP, ενώ η τυροσίνη 114 (Tyr114) εμπλέκεται σε αρωματικές αλληλεπιδράσεις με το PLP[134]. Το PAG αποτελεί στερεοεκλεκτική ένωση, με το L-ισομερές να αναστέλλει το CSE και το R-ισομερές να είναι ανενεργό[135]. Ο αναστολέας δε συνδέεται στο PLP, αλλά μέσω ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει με το CSE, καταλαμβάνει το χώρο της πλευρικής αλυσίδας του υποστρώματος, παρεμποδίζοντας στερικά την προσβασιμότητα μορίων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου[134]. Η τιμή IC_{50} για το PAG, χρησιμοποιώντας απομονωμένο ένζυμο CSE και κυστεΐνη ως υπόστρωμα, έχει υπολογιστεί σε δύο διαφορετικές μελέτες στα 40uM[121] και 200uM[134]. In vitro, ωστόσο, γίνεται χρήση πολύ μεγαλύτερων συγκεντρώσεων προς αναστολή της βιοσύνθεσης υδροθείου, πιθανώς λόγω δυσκολίας στη διαπέραση της κυτταρικής μεμβράνης[131].

Όπως θα ήταν αναμενόμενο, ο αναστολέας δεν είναι εκλεκτικός μόνο για το CSE, αλλά αναστέλλει και άλλα ένζυμα που εξαρτώνται από τη φωσφορική πυριδοξάλη, όπως η τρανσαμινάση της L-αλανίνης (ALAT)[86]. Ωστόσο, αναστέλλει κατά βάση την παραγωγή H_2S από το CSE έναντι αυτής από το CBS[121]. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, το PAG έχει χρησιμοποιηθεί και για την αναστολή διαφόρων μεταβολικών διεργασιών. Για παράδειγμα, αναστέλλει αρκετές αντιδράσεις τρανσαμίνωσης στους μυς και μεταβάλλει το μεταβολισμό αμινοξέων, ενώ το ίδιο μεταβολίζεται σε έναν τοξικό νεφρικό μεταβολίτη, οδηγώντας σε σημαντική πρωτεϊνουρία, γλυκοζουρία και πολυουρία. Είναι, λοιπόν, επόμενο πως πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν πιθανές διουρητικές και νεφρικές επιδράσεις αυτού του μεταβολίτη στην αξιολόγηση των δράσεων του PAG (και περαιτέρω του H_2S) όταν εξετάζονται αγγειακά, ενδοκρινικά και φλεγμονώδη μονοπάτια. Αναφέρεται, επίσης, πως χορήγηση PAG σε αρουραίους αύξησε τα ολικά επίπεδα κυσταθειονίνης στον εγκέφαλο, υποδηλώνοντας ότι το PAG μπορεί να έχει κάποια μικρή επίδραση επί της ενδογενούς σύνθεσης H_2S στον εγκέφαλο, όταν χορηγείται συστηματικά[86].

Είναι εμφανές πως η εύρεση και ο σχεδιασμός νέων ανασταλτικών παραγώγων με μεγαλύτερη ειδικότητα και εκλεκτικότητα απέναντι στο CBS και το CSE είναι εξέχουσας σημασίας. Έως ότου αυτό να επιτευχθεί, η χρήση του AOAA και του PAG, με κατάλληλες ομάδες ελέγχου και ταυτόχρονη μέτρηση των επιπέδων υδροθείου, θα εξακολουθήσει να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με το φαρμακολογικό ρόλο του αέριου διαβιβαστή υπό κανονικές ή παθοφυσιολογικές συνθήκες, όπως ο καρκίνος.

Αναστολέας του 3-MST (2-[(4-hydroxy-6-methylpyrimidin-2-yl)sulfanyl]-1-(naphthalen-1-yl)ethan-1-one, Compound 3)

Όσον αφορά στο τρίτο ένζυμο παραγωγής υδροθείου, το 3-MST, μέχρι πρότινος δεν είχε βρεθεί κάποιος εκλεκτικός αναστολέας του. Πριν λίγους μήνες, ωστόσο, οι Hanaoka et al., μέσω διαλογής υψηλής απόδοσης, χρησιμοποιώντας μια χημική βιβλιοθήκη ενώσεων, ανακάλυψαν ένα νέο παράγωγο που φαίνεται να είναι εκλεκτικός και ισχυρός αναστολέας του 3-MST[136]. Το μόριο αυτό αναστέλλει >80% της δραστηριότητας του ενζύμου με τη χρήση μόλις 10uM και παρουσιάζει IC_{50} στα 2,7μM. Οι ερευνητές ήλεγχαν τα επίπεδα παραγωγής υδροθείου για να διαπιστώσουν πως πράγματι η αναστολή του 3-MST αντικατοπτρίζει μείωση στα επίπεδα του αέριου διαβιβαστή, ενώ παράλληλα επιβεβαίωσαν πως η ανασταλτική δράση του μορίου δε σχετίζεται με άσκηση κάποιας σημαντικής δράσης στα CBS και CSE. Αναφέρεται πως το εν λόγω παράγωγο μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και είναι κατάλληλο για χρήση σε βιολογικές μελέτες. Βάσει κρυσταλλογραφικών αναλύσεων και θεωρητικών υπολογισμών, βρέθηκε πως καίριο ρόλο στη δομή του ενζύμου διαδραματίζει το περσουλφιδιωμένο κατάλοιπο κυστεΐνης 248 (Cys-SSH), το ανιόν του οποίου παρουσιάζει ισχυρή ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με το θετικά φορτισμένο καρβονυλικό άνθρακα της πυριμιδόνης στον αναστολέα[136].



Εικόνα 11: Δομή του αναστολέα του 3-MST[136]

Εν κατακλείδι, η αναστολή των ενζύμων παραγωγής υδροθείου σε ορισμένες μορφές καρκίνου, θα μπορούσε να αποδειχθεί μία πολύ αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση, ειδικά σε συνδυασμό με άλλα θεραπευτικά σχήματα. Υπάρχουν, ωστόσο, βασικοί παράγοντες που πρέπει να συνυπολογίζονται, με πρώτο και κύριο πως επιβάλλεται ο σχεδιασμός εκλεκτικών αναστολέων, δεδομένου ότι οι ήδη υπάρχοντες έχουν ένα περίπλοκο φαρμακολογικό προφίλ, που δεν περιορίζεται μόνο στα ένζυμα βιοσύνθεσης H_2S. Δευτερευόντως, δεν είναι ευεργετική η αναστολή των εν λόγω ενζύμων σε όλους τους τύπους καρκίνου, καθώς, παραδείγματος χάριν, μείωση της έκφρασης του CBS σε μοντέλο γλοιώματος οδήγησε σε περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου παρά σε μείωση[137]. Τέλος, πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν οι συστηματικές συνέπειες

της αναστολής των ενζύμων αυτών στον άνθρωπο. Δεδομένου πως το CSE εκφράζεται κατά κόρον στο καρδιαγγειακό σύστημα, αναστολή του αναμένεται να έχει σοβαρότερες ανεπιθύμητες ενέργειες συγκριτικά με την αναστολή του CBS, του οποίου η έκφραση περιορίζεται σε μικρότερο αριθμό οργάνων[105]. Ωστόσο, δεδομένου πως το CBS επηρεάζει τα κυτταρικά επίπεδα της κυστεΐνης και της ομοκυστεΐνης και ρυθμίζει την οξειδωτική κατάσταση του οργανισμού, αφενός ελλοχεύει ο κίνδυνος πρόκλησης υπερομοκυστεϊναιμίας λόγω μείωσής του και αφετέρου το βιολογικό αντίκτυπο της αναστολής του δεν πρέπει να αποδίδεται αποκλειστικά και μόνο στη φαρμακολογική παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης H_2S[105,130]. Για να είναι εφικτός ο διαχωρισμός των δράσεων που σχετίζονται με την αναστολή της παραγωγής του υδροθείου από αυτές που δε σχετίζονται, πρέπει να γίνονται κατάλληλα πειράματα ελέγχου (control), όπως, για παράδειγμα, φαρμακολογική αντικατάσταση του αέριου διαβιβαστή μετά την αναστολή του ενζύμου παραγωγής του ή σύγκριση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων αναστολής της βιοσύνθεσης με πειράματα που εξετάζουν τα αποτελέσματα που έχουν ενώσεις που δεσμεύουν τον αέριο διαβιβαστή («scavengers»)[105].

1.4.3. Ο ρόλος του εξωγενούς H_2S στον καρκίνο

Σε αντίθεση με την προκαρκινική δράση που ασκεί κατά βάση το ενδογενές υδρόθειο, υψηλές συγκεντρώσεις εξωγενούς H_2S υπό τη μορφή δοτών ή παρατεταμένη έκθεση σε μικρές συγκεντρώσεις αυτών, θα μπορούσαν να καταστείλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η άνοδος στα κυτταρικά επίπεδα του υδροθείου θα πρέπει να ξεπερνά ένα συγκεκριμένο όριο (κάτι που επιτυγχάνεται με τη χρήση συγκέντρωσης δοτών της τάξης των mM), ώστε να μπορέσει να επηρεάσει αρνητικά τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων[105].

Διαφορετικά, σύντομη έκθεση σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις δοτών (της τάξης των uM), μπορεί να επάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, μέσω παραδείγματος χάριν επιτάχυνσης της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου[118]. Στα πλαίσια αυτού, το υδρόθειο έχει τη δυνατότητα να μειώνει τον κυτταρικό πληθυσμό στις φάσεις G0/G1 και να αυξάνει τον πληθυσμό της φάσης S, ενώ παράλληλα επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αυτό συντελείται τόσο μέσω φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης των μονοπατιών των Akt και ERK[138,139], όσο και μέσω μείωσης της έκφρασης πρωτεϊνών, όπως η πρωτεΐνη p21 (ένας ανασταλτικός παράγοντας των κινασών CDK που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου)[138], όπως βρέθηκε σε μοντέλα από του στόματος πλακώδους καρκινώματος και καρκίνου του παχέος εντέρου αντίστοιχα.

1.4.3.1. Μηχανισμοί αντικαρκινικής δράσης

Το εξωγενές H_2S έχει τη δυνατότητα να καταστείλει τον πολλαπλασιασμό και την περαιτέρω ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων 1) μέσω διατάραξης της λειτουργίας των μιτοχονδρίων, 2) μέσω διακοπής της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, 3) μέσω ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών απόπτωσης και 4) μέσω επαγωγής της αυτοφαγίας[118,140].

Όσον αφορά στον πρώτο μηχανισμό, έχει ήδη αναφερθεί πως, ενώ στις φυσιολογικές συγκεντρώσεις το H_2S λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων στη μιτοχονδριακή αλυσίδα, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αναστέλλει την οξειδάση του κυτοχρώματος c (Complex IV), διακόπτοντας έτσι τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και μειώνοντας τα επίπεδα ATP. Ως αποτέλεσμα, παρατηρείται μείωση της πρόσληψης οξυγόνου από τους ιστούς και καταστολή της κυτταρικής αναπνοής, δράσεις στις οποίες πιθανώς να συμβάλλει και η, προκαλούμενη από το υδρόθειο, αναστολή της καρβονικής ανυδράσης. Παράλληλα, ασκεί προοξειδωτική και προφλεγμονώδη δράση μέσω διαφόρων σηματοδοτικών οδών[71,104,141].

Προχωρώντας στο δεύτερο μηχανισμό εμπλοκής του H_2S, που αφορά στον κυτταρικό κύκλο, έχει βρεθεί πως τόσο η μετάβαση από τη φάση G1 στην S, όσο και η μετάβαση από τη G2 στην M φάση του κυτταρικού κύκλου, είναι ζωτική για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των ευκαρυωτικών κυττάρων, καθώς οποιαδήποτε απορρύθμιση μπορεί να οδηγήσει σε ογκογένεση. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο τα σημεία αυτά του κύκλου αποτελούν στόχο πολλών φαρμάκων. Έχει δειχθεί πως το υδρόθειο μπορεί να μειώσει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων με το να επεμβαίνει ανασταλτικά τόσο στη G2/M μετάβαση[142], όσο και στη G1/S[140,143]. Αφενός, αυτό το κατορθώνει μέσω αναστολής της επαγόμενης από την IL-6 φωσφορυλίωσης (και άρα ενεργοποίησης) του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3 (Y705). Η αναστολή αυτή, που προκαλείται από καταστολή της ενεργοποίησης της κινάσης JAK2, συνεπάγεται μειορύθμιση της έκφρασης πρωτεϊνών-στόχων του STAT-3. Μία εξ' αυτών είναι και η κυκλίνη D1, η οποία επάγει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου[140]. Αφετέρου, διακοπή του κύκλου στη φάση G1 επιτυγχάνεται μέσω επαγωγής, από το υδρόθειο, της έκφρασης παραγόντων, όπως είναι ο αναστολέας των CDK p21[Cip143]. Με βάση τα πειραματικά δεδομένα που υπάρχουν, το H_2S εξασκεί τοξική δράση μέσω διακοπής του κυτταρικού κύκλου εκλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα, δεδομένου πως στα μη καρκινικά κύτταρα της ομάδας ελέγχου δε σημειώνεται θάνατος[142].

Όσον αφορά στους μηχανισμούς επαγωγής της απόπτωσης, αξίζει να αναφερθεί πρώτα από όλα πως στους πολυκύτταρους οργανισμούς, ο συνολικός αριθμός των κυττάρων διατηρείται στα φυσιολογικά επίπεδα μέσω της ισορροπίας που υπάρχει μεταξύ των

διαδικασιών της μίτωσης και της απόπτωσης. Η οποιαδήποτε διαταραχή αυτής της ισορροπίας θα μπορούσε να προκαλέσει την ανάπτυξη καρκίνου[144]. Τόσο η στόχευση των μηχανισμών που προσδίδουν αντοχή έναντι της απόπτωσης, όσο και η επανενεργοποίηση των προγραμμάτων κυτταρικού θανάτου στα καρκινικά κύτταρα, θα ήταν αποτελεσματικές στρατηγικές για την αντιμετώπιση του καρκίνου[145]. Ένας από τους μηχανισμούς, μέσω του οποίου το H_2S συμβάλλει στην απόπτωση, έγκειται στην αύξηση στα επίπεδα του ογκοκατασταλτικού παράγοντα p53 και της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax, αλλά και στην παράλληλη μείωση των επιπέδων της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Να σημειωθεί πως η πρωτεΐνη p53 επάγει την απόπτωση, είτε μέσω αύξησης της μεταγραφικής δραστηριότητας προαποπτωτικών γονιδίων (π.χ. Bax), είτε μέσω καταστολής της δραστηριότητας αντιαποπτωτικών γονιδίων (π.χ. Bcl-2)[146]. Κατά την απόπτωση, η ενεργοποίηση της ενδογενούς οδού όπου εμπλέκεται η Bax, συνοδεύεται από μετατόπιση της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια, απελευθέρωση κυτοχρώματος c και ενεργοποίηση της κασπάσης 3[147].

Επιπροσθέτως, υπάρχει και ένας επιπλέον μηχανισμός απόπτωσης που περιλαμβάνει τον αέριο διαβιβαστή. Όπως ήδη αναφέρθηκε, το υδρόθειο στον καρκίνο μπορεί να αναστέλλει την ενεργοποίηση του παράγοντα STAT-3 και, επομένως, να ρυθμίζει προς τα κάτω την έκφραση των γονιδίων που αυτός στοχεύει. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπεύθυνες για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, όπως είναι οι Bcl-2, Mcl-1, survivin και άλλες, χαρακτηριζόμενες ως αντιαποπτωτικές. Εφόσον αυτές δεν ενεργοποιούνται οδηγούμαστε στην απόπτωση[140]. Τα αποπτωτικά αυτά μονοπάτια που επάγονται από τον αέριο διαβιβαστή δε φαίνεται να επηρεάζουν τα φυσιολογικά κύτταρα, γεγονός που ενισχύει τη στρατηγική της ανάπτυξης δοτών H_2S ως αντικαρκινικών παραγόντων που θα στοχεύουν εκλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα[142].

Τέλος, όσον αφορά στον τελευταίο μηχανισμό, έχει βρεθεί πως έκθεση στο υδρόθειο μπορεί να επάγει την αυτοφαγία και να μειώσει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, μέσω ενεργοποίησης δια φωσφορυλίωσης (Thr172) της κινάσης AMPK (AMPK-activated protein kinase), που συνεπάγεται μείωση της φωσφορυλίωσης και, επομένως, απενεργοποίηση του mTOR και της κινάσης p70 S6[143].

1.4.3.2. Φαρμακολογικό προφίλ των δοτών H_2S

Προτού γίνει αναφορά στις έρευνες που έχουν διεξαχθεί στα πλαίσια της μελέτης της αντικαρκινικής δράσης του εξωγενώς χορηγούμενου H_2S, κρίνεται σκόπιμο να παρατεθούν κάποια στοιχεία αναφορικά με τους βασικότερους δότες που έχουν χρησιμοποιηθεί στα διάφορα πειραματικά μοντέλα. Αυτοί περιλαμβάνουν τα άλατα Na_2S και NaSH, που διασπώνται για να δώσουν άμεσα υδρόθειο, και τα παράγωγα που

απελευθερώνουν αργά υδρόθειο, όπως είναι το GYY4137. Μια σειρά από μελέτες αποδεικνύουν πως η ικανότητα του αέριου διαβιβαστή να εξουδετερώνει τα καρκινικά κύτταρα εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό τόσο από τη συγκέντρωση του δότη που χρησιμοποιείται, όσο και από το χρόνο έκθεσης σε αυτόν μαζί με το ρυθμό με τον οποίο έχει τη δυνατότητα να απελευθερώνει υδρόθειο[142,148].

Το H_2S είναι ένα εξαιρετικά λιπόφιλο μόριο, το οποίο έχει την ικανότητα να διεισδύσει ελεύθερα μέσα από τις μεμβράνες των κυττάρων με διάχυση, χωρίς να απαιτούνται ειδικές πρωτεΐνες-μεταφορείς[149]. Σε υδατικό διάλυμα, το H_2S είναι ασθενώς όξινο (pKa=6,76 στους 37°C) και διασπάται για να σχηματίσει HS^- (hydrosulfide anion, pKa=7,04) και S^{2-} (sulfide anion, pKa=11,96), σύμφωνα με τις ακόλουθες διαδοχικές αντιδράσεις:

$$H_2S \rightleftharpoons HS^- + H^+ \rightleftharpoons S^{2-} + 2H^+$$

Σε pH 7,4, περίπου το 18,5% της συνολικής ποσότητας υδροθείου υφίσταται με τη μορφή του αδιάστατου οξέος, ενώ το 81,5% ως HS^-[86]. Επί του παρόντος, δεν είναι πλήρως ξεκαθαρισμένο εάν οι δράσεις του H_2S μεσολαβούνται απευθείας από το αδιάστατο οξύ ή από παράγωγά του που υπάρχουν σε φυσιολογικό pH. Γίνεται, κυρίως, λόγος για το HS^-, καθώς το S^{2-} δε φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, δεδομένου πως είναι παρόν σε αρκετά υψηλό pH. Έχει καθιερωθεί, λοιπόν, με τον όρο H_2S να εννοούμε όλα τα δυνατά παράγωγα που μπορούν να υφίστανται σε φυσιολογικές συνθήκες[86].

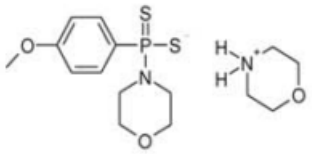
Η χρήση των αλάτων Na_2S και NaSH ως δοτών, συγκριτικά με το GYY4137, έχει δύο κύρια μειονεκτήματα: την ταχεία κινητική αποδέσμευσης του αέριου διαβιβαστή και τις υψηλές, συχνά στο εύρος των mM, ποσότητες υδροθείου που απελευθερώνονται τοπικά και παραμένουν για μικρό χρονικό διάστημα[142,150]. Αφενός, είναι εξαιρετικά δύσκολο, υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι ιστοί ή τα κύτταρα να εκτίθενται υπό τέτοιο ρυθμό και σε τόσο υψηλές τοπικές συγκεντρώσεις H_2S, HS^-, Na^+, δεδομένου ότι η ενδογενής παραγωγή H_2S είναι σχετικά βραδεία, παρατεταμένη και γίνεται με κάποια σταθερή ροή[86]. Επιστημονική παράλειψη αποτελεί το γεγονός πως τα επίπεδα του προστιθέμενου υδροθείου στο αίμα και στους ιστούς έχουν μελετηθεί σε πολύ λίγες περιπτώσεις μετά τη χρήση των δοτών in vivo[150]. Διάφοροι ερευνητές υποστηρίζουν πως, λόγω της σταθεράς pKa του NaSH, η τελική συγκέντρωση του H_2S είναι περίπου το ένα τρίτο της τελικής συγκέντρωσης του δότη που προστίθεται, με τα υπόλοιπα δύο τρίτα να αντιπροσωπεύονται από το HS^-. Ωστόσο αυτό δεν περιορίζει τη χρήση των αλάτων, δεδομένου πως, όπως ήδη αναφέρθηκε, δε γνωρίζουμε ακριβώς αν οι δράσεις του υδροθείου οφείλονται στο αδιάστατο οξύ ή τις λοιπές μορφές. Δεν πρέπει να παραληφθεί όμως το γεγονός πως, εξαιτίας του ότι τα άλατα σουλφιδίου είναι

υγροσκοπικά, προκύπτει κάποιο σφάλμα κατά τον υπολογισμό της ακριβούς συγκέντρωσης που θα εφαρμοστεί στο βιολογικό σύστημα[131].

Αφετέρου, πέραν του ότι τα εν λόγω άλατα δε μιμούνται τον ενδογενή τρόπο έκθεσης των κυττάρων στο H_2S, άλλο ένα ζήτημα που προκύπτει αφορά στο ότι, δεδομένου πως η κυτταρική καλλιέργεια μαζί με τη διάρκεια του πειράματος λαμβάνει χώρα σε χρονικό διάστημα ωρών ή ημερών, η όποια ποσότητα υδροθείου έχει προστεθεί, είναι παρούσα στο θρεπτικό υλικό μονάχα τις πρώτες ώρες μετά τη χορήγηση του άλατος[142]. In vitro, ο χρόνος ημίσειας ζωής του H_2S, που προέρχεται από άλατα, κυμαίνεται μεταξύ 5-30 λεπτών και εξαρτάται τόσο από την ποιότητα του νερού που χρησιμοποιείται για τα πειράματα (η μεταλλική περιεκτικότητα του νερού στο εργαστήριο μπορεί να είναι σημαντική μεταβλητή), όσο και από πολλές άλλες παραμέτρους, που σχετίζονται με την κυτταρική καλλιέργεια, τις συνθήκες θερμοκρασίας, κ.ά.[131].

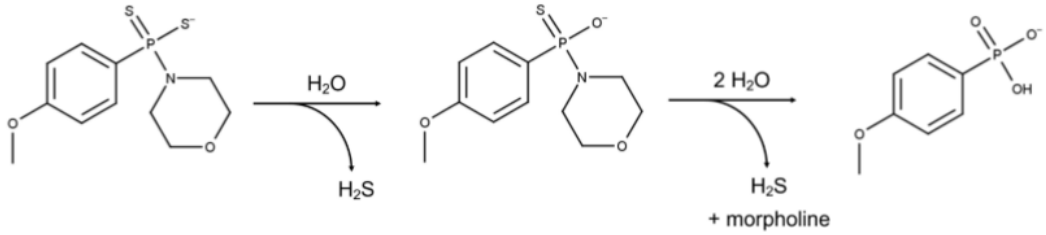
Για την επίλυση των ζητημάτων αυτών, στις εναλλακτικές που υπάρχουν συγκαταλέγεται η χρήση πολύ υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων, της τάξης των mM, καθώς και η έκθεση σε μικρές συγκεντρώσεις αυτών για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, με συχνή όμως ανανέωση της δόσης που χορηγείται[113,148]. Η πρώτη εναλλακτική θα πρέπει να αποφεύγεται εξαιτίας των προαναφερθέντων, αλλά και λόγω του ότι τα αποτελέσματα της μελέτης δε θα είναι αξιόπιστα και ασφαλή. Είναι αναγκαίο ο εκάστοτε ερευνητής να λαμβάνει υπόψιν πως το H_2S σε υψηλές συγκεντρώσεις καθίσταται επιζήμιο για τα κύτταρα, διακόπτοντας τη μιτοχονδριακή λειτουργία, μέσω αναστολής της οξειδάσης του κυτοχρώματος c και μείωσης της παραγωγής ATP. Στις δράσεις αυτές είναι επόμενο να ανταποκριθούν τα κύτταρα μέσω ενεργοποίησης αντιοξειδωτικών και προστατευτικών σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία οφείλει κανείς να αξιολογήσει πριν την εξαγωγή των οποιωνδήποτε συμπερασμάτων αναφορικά με το πείραμά του[104,131].

Τα τελευταία χρόνια έχουν σχεδιασθεί νέοι δότες υδροθείου, ώστε να παρακαμφθούν τα εμπόδια από τη χρησιμοποίηση θειούχων αλάτων. Αναγνωρίζοντας την ανάγκη ανάπτυξης οργανικών μορίων, ικανών να απελευθερώνουν H_2S με σταθερά αργό ρυθμό για παρατεταμένες χρονικές περιόδους, άρχισε να χρησιμοποιείται το παράγωγο morpholin-4-ium-4-methoxyphenyl(morpholino)phosphinodithioate, γνωστό ως GYY4137. Πρόκειται για ένα δότη που απελευθερώνει H_2S σε αργά ποσοστά, τόσο in vitro όσο και in vivo, με κάθε μόριο του να αντιστοιχεί σε δύο μόρια H_2S[86,150]. Η απελευθέρωση H_2S από το GYY4137 είναι εξαρτώμενη από το pH και τη θερμοκρασία, με τη λιγότερη απελευθέρωση να παρατηρείται στους 4°C και τη μεγαλύτερη σε pH 3[150].



Εικόνα 12: Δομή του GYY4137[150]

Όπως σημειώθηκε, οι μεγάλες ποσότητες H_2S που απελευθερώνονται μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα (δευτερόλεπτα) από τα άλατα μπορούν να ενεργοποιήσουν διάφορες οδούς, σε αντίθεση με τις μικρότερες ποσότητες του διαβιβαστή που απελευθερώνονται πιο αργά αλλά παρατεταμένα από το GYY4137. Αν και απαιτούνται περαιτέρω πειράματα για τη διευκρίνιση των χημικών μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα κατά την απελευθέρωση του H_2S, το GYY4137 έχει αναγνωριστεί ως ένα σημαντικό βιολογικό εργαλείο για τον έλεγχο της επίδρασης του υδροθείου σε διάφορα συστήματα[150]. Ομοίως με τα άλατα σουλφιδίου, το GYY4137 απελευθερώνει άμεσα υδρόθειο σε υδατικό περιβάλλον, γι' αυτό και τα διαλύματά του πρέπει να παρασκευάζονται φρέσκα[131]. Ο μηχανισμός διάσπασής του έχει διερευνηθεί λεπτομερώς από τους Alexander et al. και διακρίνεται σε δύο στάδια[151]. Το πρώτο περιλαμβάνει μία άμεση ανταλλαγή θείου-οξυγόνου με το νερό προς δημιουργία ενός αρυλοφωσφοναμιδοθειοϊκού ενδιάμεσου προϊόντος. Ακολουθεί ένα δεύτερο στάδιο αποικοδόμησης που ολοκληρώνει την υδρόλυση σε μία αρυλοφωσφονική ένωση[151].



Εικόνα 13: Μηχανισμός απελευθέρωσης H_2S από το GYY4137[151]

Προς επιβεβαίωση των προαναφερθέντων, οι Lee et al. το 2011 διαπίστωσαν πως χορήγηση 400uM GYY4137 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 10-20uM H_2S σε θρεπτικό υλικό, που παραμένει μέχρι και το πέρας 7 ημερών. Αντιθέτως, προσθήκη 400uM NaSH στο θρεπτικό υλικό κατά τον ίδιο τρόπο οδηγεί σε πολύ υψηλότερες (μέχρι 400uM) συγκεντρώσεις H_2S που παραμένουν μόνο για 1 ώρα μετά την έκθεση[142].

Στα πλαίσια μελετών που αφορούν σε καρκινικά κύτταρα, υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες και δόση, το GYY4137 βρέθηκε να μειώνει σε σημαντικότερο βαθμό τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων in vitro σε χρονικό διάστημα 5 ημερών,

μολονότι απελευθερώνει χαμηλότερα ποσοστά H_2S, σε σύγκριση με το NaSH. Συμπεραίνεται, λοιπόν, πως ο βέλτιστος τρόπος εξουδετέρωσης των καρκινικών κυττάρων περιλαμβάνει έκθεσή τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις μορίων που απελευθερώνουν αργά υδρόθειο, για μια περίοδο αρκετών ημερών[142]. Τα ίδια ευεργετικά αποτελέσματα, όμως, μπορούν να προκληθούν και με έκθεση των κυττάρων σε χαμηλές ποσότητες NaSH για παρατεταμένη περίοδο, με ανανέωση της έκθεσης ανά τακτά διαστήματα, όπως διαπιστώνεται από τους Lee et al. το 2014 σε μοντέλα καρκινικών κυττάρων του μαστού και του ήπατος[148].

Το βασικότερο μειονέκτημα στη χρήση του GYY4137, ως δότη εξωγενούς H_2S, έγκειται στο ότι πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν οι βιολογικές δράσεις του εναπομείναντος μορίου, μετά την απελευθέρωση του υδροθείου, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται υψηλές συγκεντρώσεις του δότη. Εξέχουσας σημασίας κρίνεται η χρήση κατάλληλων ομάδων ελέγχου που θα επιβεβαιώνουν πως οι παρατηρούμενες φαρμακολογικές επιδράσεις οφείλονται στον αέριο διαβιβαστή, και όχι σε δευτερεύουσες δράσεις για τις οποίες ευθύνονται τα υπόλοιπα, ίσως βιολογικώς δραστικά, τμήματα του δότη[131].

Εξαιρουμένων των προαναφερθέντων, σα δότες υδροθείου χρησιμοποιούνται κατά καιρούς πολλά φυσικώς απαντώμενα παράγωγα, όπως το διαλλυλο-σουλφίδιο, το διαλλυλο-δισουλφίδιο και το διαλλυλο-τρισουλφίδιο (DAS, DADS και DATS, αντίστοιχα). Τα μόρια αυτά οδηγούν στην παραγωγή H_2S μέσω διαφόρων αντιδράσεων και μηχανισμών στο κυτταρικό περιβάλλον, μερικοί εκ των οποίων εμπλέκουν ενδογενείς παράγοντες όπως η γλουταθειόνη, συντελώντας στην αύξηση τόσο των ενδοκυττάριων επιπέδων όσο και των επιπέδων H_2S που κυκλοφορούν στο αίμα[105,131]. Παρά το γεγονός ότι τα παράγωγα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί επανειλημμένως σε πειράματα μελέτης στα πλαίσια του καρκίνου, πρέπει να γίνει σαφές πως οι φαρμακολογικές τους δράσεις εκτείνονται πέραν από αυτές που σχετίζονται με το H_2S[131,152], καθιστώντας την ερμηνεία των ευρημάτων από την άποψη της βιολογίας του αέριου διαβιβαστή δύσκολη.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως τα τελευταία χρόνια δίνεται αρκετά μεγάλη έμφαση και στην ανάπτυξη υβριδικών παραγώγων που περιέχουν μια χαρακτηριστική ομάδα-δότη H_2S, συζευγμένη σε ένα προηγουμένως γνωστό φάρμακο, όπως είναι τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη[105]. Η φαρμακολογία όσον αφορά σε αυτές τις ενώσεις είναι πολύπλοκη. Ανάμεσα στα εμπόδια που προκύπτουν συμπεριλαμβάνεται τόσο το γεγονός ότι δεν έχει αναπτυχθεί κάποια ασφαλής, κοινώς αποδεκτή, μέθοδος εντοπισμού και μέτρησης του υδροθείου που απελευθερώνεται, όσο και το ότι είναι δύσκολο να διευκρινιστεί ο τρόπος με τον οποίο το κάθε κομμάτι του μορίου συμβάλλει στη συνολική δράση[105]. Παρόλα αυτά, οι έρευνες γύρω από αυτά τα μόρια

συνεχίζονται, δεδομένου πως κάποια έχουν δείξει σημαντική αντικαρκινική δράση σε in vitro και in vivo μοντέλα[153,154,155].

1.4.3.3. In vitro και in vivo μελέτες για το ρόλο του εξωγενούς H_2S στον καρκίνο

Εξαιτίας των περιορισμών που προαναφέρθηκαν και που σχετίζονται με το είδος των χρησιμοποιούμενων δοτών, το χρόνο έκθεσης σε αυτούς και την καταλληλότερη δόση, διάφορες μελέτες που αφορούν στην εξωγενή χορήγηση του διαβιβαστή, προς έλεγχο της επίδρασής του στα καρκινικά κύτταρα, έχουν φέρει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Έχοντας διαλευκάνει, ως ένα βαθμό, το πεδίο των ιδιοτήτων των δοτών και των μηχανισμών με τους οποίους δίνουν τελικά υδρόθειο, ακολουθεί αναφορά σε έρευνες που επιδεικνύουν την ικανότητα του αέριου διαβιβαστή να επιδρά αρνητικά στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, μετά από εξωγενή χορήγηση δοτών του.

Ξεκινώντας με μελέτες όπου έγινε χρήση αλάτων σουλφιδίου, οι Wu et al. το 2012 έδειξαν πως παρατεταμένη έκθεση καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου σε συγκεντρώσεις NaSH μέχρι 1mM συνεπάγεται σημαντική μείωση στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευσή τους. Οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί αφορούσαν σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου μέσω επαγωγής του αναστολέα των CDK, $p21^{Cip}$, και σε προαγωγή της αυτοφαγίας μέσω του μονοπατιού AMPK/mTOR[143].

Στα ίδια πλαίσια, οι Zhang et al. το 2015 διαπίστωσαν πως η χορήγηση 200-800uM NaSH για 24 ώρες επηρεάζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του στομάχου, τόσο μεταβάλλοντας την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο, όσο και μέσω αυξορύθμισης αποπτωτικών σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν σε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης Bax και μετατόπισή της στα μιτοχόνδρια[147].

Το 2011 οι Lee et al. σε in vitro πειράματα με κυτταρικές σειρές καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, καρκίνου του μαστού, καρκίνου του παχέος εντέρου, ηπατοκαρκινώματος, λευχαιμίας και οστεοσαρκώματος έδειξαν πως παρατεταμένη χορήγηση μικρής δόσης GYY4137 (της τάξης των uM) για 5 ημέρες μειώνει τον πολλαπλασιασμό τους. Διερευνώντας τις εμπλεκόμενες σηματοδοτικές οδούς στα κύτταρα του μαστού, απέδειξαν πως γίνεται επαγωγή προαποπτωτικών μηχανισμών και προκαλείται διακοπή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου στη μετάβαση από τη φάση G2 στην M. Τα in vitro αποτελέσματα υπέρ της αντικαρκινικής δράσης του GYY4137 ήρθαν σε συμφωνία με τα αντίστοιχα από τα in vivo πειράματα που διενεργήθηκαν σε πειραματόζωα, με προκληθείσα λευχαιμία, μετά από θεραπεία με το δότη υδροθείου για 14 ημέρες[142]. Σημειώνεται, πως η χορήγηση του εν λόγω

παραγώγου δεν προκάλεσε το θάνατο σε μη καρκινικά κύτταρα, κάτι που οδηγεί στη διαπίστωση ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εξουδετερωθούν επιλεκτικά όταν εκτίθενται σε σχετικά μικρές ποσότητες H_2S για μεγάλο χρονικό διάστημα. Μένει να διευκρινιστεί, ωστόσο, το αν αυτό συμβαίνει επειδή τα φυσιολογικά κύτταρα μπορούν να διασπάσουν το H_2S με πιο γρήγορο ρυθμό ή λόγω του ότι τα καρκινικά κύτταρα είναι πιο επιρρεπή στις δράσεις του διαβιβαστή[142].

Ο ίδιος ερευνητής, σε συνεργασία και με άλλη ομάδα το 2014, απέδειξε και πάλι πως, σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και ηπατοκαρκινώματος, χαμηλές δόσεις τόσο GYY4137 όσο και NaSH, με ανανέωση της έκθεσης στο τελευταίο ανά τακτά διαστήματα, για παρατεταμένο χρόνο, μπορούν να συντελέσουν σε μείωση της κυτταρικής επιβίωσης. Αποδείχτηκε και πάλι πως οι δότες δεν ασκούν σημαντική δράση επί της επιβίωσης των μη καρκινικών κυττάρων των αντίστοιχων σειρών[148].

Προχωρώντας στο πεδίο των μελετών όσον αφορά στο GYY4137, οι Lu et al. έδειξαν πως σε μοντέλο ηπατοκαρκινώματος in vitro και in vivo, το σκεπτικό της χορήγησης μικρών δόσεων GYY4137 για παρατεταμένο διάστημα είναι ωφέλιμο, καθώς υπήρξε ελάττωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων, εύρημα που συσχετίστηκε με την αναστολή της φωσφορυλίωσης του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3. Εξαιτίας μειορύθμισης του μονοπατιού στο οποίο εμπλέκεται ο εν λόγω παράγοντας διεκόπη η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και υπήρξε επαγωγή της απόπτωσης. Αξίζει να σημειωθεί πως το υδρόθειο βρέθηκε, επιπλέον, να καταστέλλει την έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), όπως και του παράγοντα υποξίας-1α (HIF-1α), μετά από πρόκληση υποξίας στα καρκινικά κύτταρα. Σημειώνεται πως η έλλειψη οξυγόνου είναι χαρακτηριστική στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων, τα οποία ανταποκρίνονται ενεργοποιώντας μηχανισμούς αγγειογένεσης και κυτοπροστασίας[140].

Επικεντρώνοντας στο σημείο αυτό την προσοχή σε μερικές πειραματικές μελέτες, όπου έγινε χρήση και άλλων παραγώγων πέραν των NaSH, Na_2S και GYY4137, αναφέρεται πως οι Ma et al., χορηγώντας ως δότη την S-Propargyl-Cysteine (SPRC), έδειξαν πως σε καρκίνο του στομάχου in vitro η απελευθέρωση υδροθείου έχει ως συνέπεια τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης, ενώ και in vivo μειώνει το μέγεθος του καρκίνου. Πέραν της διακοπής του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1/S, αυτό επιτυγχάνεται με την επαγωγή αποπτωτικών μονοπατιών, μέσω αύξησης της έκφρασης των p53/Bax[146].

Επιπροσθέτως, οι Panza et al. το 2015, χρησιμοποιώντας ως δότη το φυσικό παράγωγο διαλλυλο-τρισουλφίδιο (DATS), έδειξαν πως μετά από παρατεταμένη έκθεση κυττάρων ανθρώπινου μελανώματος στο συγκεκριμένο παράγωγο, παρατηρείται

αναστολή του πολλαπλασιασμού, μέσω διακοπής της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και επαγωγής της απόπτωσης. Προς επιβεβαίωση του ότι τα ευεργετικά αποτελέσματα του DATS σχετίζονται με το υδρόθειο και όχι με κάποια άλλη δράση του, τα πειράματα επαναλήφθηκαν επιτυχώς και με τη χρήση GYY4137. Περαιτέρω, η χορήγηση του DATS in vivo σε μοντέλο πειραματόζωων με μελάνωμα μείωσε την ανάπτυξη του όγκου[113].

Τέλος, να σημειωθεί πως η χρήση φυσικών παραγώγων ως δοτών H_2S έχει γίνει σε πολλά ακόμα in vitro και in vivo πειράματα, τα οποία ενισχύουν την υπόθεση περί αντικαρκινικής δράσης του υδροθείου, όπως σε μοντέλο γλοιοβλαστώματος[156], πνευμονικού καρκινώματος[157], καρκίνου του παχέος εντέρου[158], μελανώματος[159], κ.ά..

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, θεωρείται σκόπιμο να παρατεθούν ορισμένες μελέτες ξεχωριστά, αναφορικά με τον καρκίνο του προστάτη. Οι Zhao et al. το 2014 παρατήρησαν, μετά από παρατεταμένη χορήγηση 30uM NaSH, μείωση της βιωσιμότητας τόσο των ανδρογονοευαίσθητων προστατικών κυττάρων LNCaP, όσο και κυττάρων LNCaP ανθεκτικών σε θεραπεία με αντιανδρογόνα[117]. Μάλιστα, στην τελευταία σειρά, η χορήγηση H_2S επανέφερε την ευαισθησία στην αντιανδρογονική θεραπεία. Επεκτείνοντας τις μελέτες τους, διερεύνησαν το ρόλο του υδροθείου σε σχέση με τον ανδρογονικό υποδοχέα και τη δραστηριότητά του. Ύστερα από παρατεταμένη χορήγηση μικρών δόσεων τόσο NaSH, όσο και GYY4137, διαπίστωσαν μείωση της έκφρασης, σε επίπεδο mRNA αλλά και πρωτεΐνης, γονιδίων-στόχων του ανδρογονικού υποδοχέα, όπως αυτό που κωδικοποιεί το προστατικό αντιγόνο PSA. Αιτία διαπιστώθηκε πως είναι η αναστολή της σύνδεσης του AR στις ειδικές αλληλουχίες αναγνώρισης στο DNA, γνωστές ως «στοιχεία απόκρισης σε ανδρογόνα» (AREs), στις περιοχές του προαγωγέα και ενισχυτή γονιδίων-στόχων, σύνδεση απαραίτητη για τη μεταγραφή τους. Το υδρόθειο προκαλεί σουλφυδρυλίωση των κυστεϊνών 611 και 614 στην περιοχή του ανδρογονικού υποδοχέα που συνδέεται με τα AREs, με αποτέλεσμα μειωμένο διμερισμό και ελαττωμένη σύνδεση του υποδοχέα σε αυτά. Προς μελέτη της ενδεχόμενης συσχέτισης μεταξύ της δράσης του H_2S επί του AR και της αρνητικής επίδρασης του διαβιβαστή στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, έκαναν υπερέκφραση του ανδρογονικού υποδοχέα σε κύτταρα LNCaP και χορήγησαν NaSH (30uM) για 48 ώρες. Στην ομάδα ελέγχου ο δότης ανέστειλε την ανάπτυξη των κυττάρων, ενώ στα κύτταρα με υπερεκφρασμένο υποδοχέα υπήρξε επαγωγή της ανάπτυξης και αναστροφή της ανασταλτικής δράσης του υδροθείου. Συμπεραίνεται λοιπόν πως, μερικώς, η ευεργετική δράση του υδροθείου έναντι του καρκίνου του προστάτη σχετίζεται με τη δράση του επί του ανδρογονικού υποδοχέα[117]. Οι ίδιοι ερευνητές, λαμβάνοντας υπόψιν πως η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου αυξάνεται με την ηλικία, διαπίστωσαν μείωση στην έκφραση του CSE και

στην παραγωγή υδροθείου στον προστατικό ιστό ποντικών προχωρημένης ηλικίας. Σαφώς, θα άξιζε να αναφερθεί πως παρατήρησαν και μεγαλύτερο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε προστατικό ιστό ποντικών μεγάλης ηλικίας όπου είχε αποσιωπηθεί το CSE (CSE knock-out)[117].

Συνεχίζοντας με in vivo μελέτες, οι Duan et al. διερεύνησαν τα ανασταλτικά αποτελέσματα του θείου στην ανάπτυξη του όγκου του προστάτη σε ποντίκια. Διαπίστωσαν πως καθημερινή χορήγηση σκόνης γάλακτος με θείο για 22 μέρες σε ποντίκια, εμβολιασμένα με καρκινικά κύτταρα-μη ευαίσθητα στα ανδρογόνα, οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων H_2S στον ορό και μείωσε σημαντικά το ρυθμό ανάπτυξης του όγκου[160].

Σημαντικά πολλές σε αριθμό είναι οι in vitro και in vivo μελέτες, όπου φυσικά παράγωγα, όπως τα DADS και DATS, φαίνεται να επιδεικνύουν σημαντική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού, της ανάπτυξης και επιβίωσης σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη[161]. Ένας από τους λόγους που δεν αναφέρονται διεξοδικά στη συγκεκριμένη εργασία είναι πως, στην πλειοψηφία τους, οι ερευνητές δεν έχουν αποδείξει αν οι δράσεις των παραγώγων αυτών σχετίζονται με αύξηση των επιπέδων υδροθείου και με τη βιολογία του αέριου αυτού διαβιβαστή. Αξίζει, ωστόσο, να αναφερθεί η μελέτη των Pei at al. που χρησιμοποίησαν ως δότη H_2S τη σουλφοραφάνη, ένα φυσικό προϊόν που απαντάται στο μπρόκολο, και ερεύνησαν την επίδρασή της επί του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων του προστάτη (PC-3)[162]. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ανασταλτική επί του πολλαπλασιασμού δράση του παραγώγου, η οποία παρατηρείται επί 24ωρης χορηγήσεως και μεσολαβείται κατά μεγάλο ποσοστό από το υδρόθειο, εν μέρει μέσω ενεργοποίησης των κινασών p38 MAPK και JNK[162].

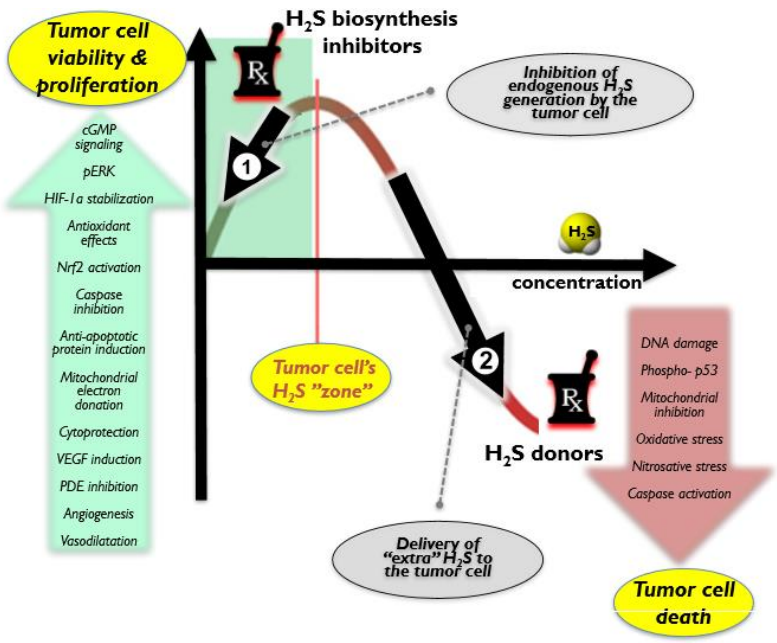
Συμπερασματικά, στα πλαίσια της διερεύνησης των αντικαρκινικών δράσεων του υδροθείου μέσω εξωγενούς χορήγησης δοτών του, είναι εμφανές πως για να προκύψουν ακόμα πιο ασφαλή και αξιόπιστα αποτελέσματα, οι μελλοντικές προσπάθειες των ερευνητών πρέπει να επικεντρωθούν στο να εκμεταλλευτούν το διαφορετικό περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων, προς σχεδιασμό ειδικών δοτών H_2S, που επιλεκτικά θα βιοενεργοποιούνται στους όγκους[105]. Παράλληλα, δε θα πρέπει να παραλείπεται το γεγονός πως ο ρυθμός με τον οποίο εκτίθενται τα κύτταρα στο υδρόθειο, μαζί με τη χρονική διάρκεια έκθεσης και τη συγκέντρωση του δότη που χορηγείται, επηρεάζουν καταλυτικά την εκδήλωση αντικαρκινικών δράσεων εκ μέρους του αέριου διαβιβαστή[142].

Προσοχή πρέπει να δοθεί γύρω από το κατά πόσο η θεραπευτική προσέγγιση που αφορά στον αέριο διαβιβαστή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σα μονοθεραπεία στον καρκίνο. Η αναστολή της ενδογενούς παραγωγής του ναι μεν δημιουργεί ένα λιγότερο

θρεπτικό περιβάλλον για τον όγκο, αλλά δεν μπορεί να προκαλέσει πλήρη καταστολή της ανάπτυξής του. Ομοίως, αν και οι υψηλές τοπικές συγκεντρώσεις του H_2S μπορεί να είναι κυτταροστατικές ή κυτταροτοξικές, η ενδογενής τοξικότητα του μορίου αυτού είναι πολύ μικρότερη από αυτή των περισσότερων εγκεκριμένων χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Ως εκ τούτου, ίσως να αναμένεται μεγαλύτερη επιτυχία μετά από συνδυασμό της θεραπείας που έχει να κάνει με το διαβιβαστή, με χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή άλλες στοχευμένες θεραπείες[105].

Τέλος, πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν πως το H_2S δε δρα μεμονωμένα, αλλά σε συνέργεια με τους άλλους δύο αέριους διαβιβαστές, NO και CO. Μερικές φορές τα μόρια αυτά ενεργοποιούν τα ίδια σηματοδοτικά μονοπάτια (π.χ. ενεργοποίηση του μονοπατιού της γουανυλικής κυκλάσης από τα NO και CO)[163], ενώ άλλες φορές ο ένας διαβιβαστής ενισχύει τη δράση του άλλου (π.χ. το NO διεγείρει άμεσα το μονοπάτι της γουανυλικής κυκλάσης, ενώ ταυτόχρονα το H_2S μπλοκάρει την αποικοδόμηση του cGMP)[98]. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις πρέπει να μελετηθούν ενδελεχώς στο πεδίο του καρκίνου και να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον προς όφελος της θεραπείας των ασθενών[105]. Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας, μία πρόσφατη μελέτη από τους Kodela et al. ανέδειξε σε in vitro πειράματα την αντικαρκινική δράση ενός υβριδικού παραγώγου της ασπιρίνης με ομάδες NO και H_2S συζευγμένες στη δομή του, της NOSH-ασπιρίνης, σε διάφορες κυτταρικές σειρές[164].

Στο επόμενο σχήμα, παρουσιάζονται συνοπτικά οι υπάρχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι του καρκίνου στο πεδίο του υδροθείου-οι οποίες περιλαμβάνουν αναστολή του ενδογενώς παραγόμενου H_2S ή εξωγενή χορήγηση δοτών του εν λόγω διαβιβαστή-, καθώς και οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί.



Εικόνα 14: Μηχανισμοί που εμπλέκονται στις ευεργετικές θεραπευτικές επιδράσεις της χορήγησης αναστολέων της βιοσύνθεσης H_2S (αριστερό σχήμα) και δοτών H_2S (δεξί σχήμα) κατά του καρκίνου[131]

2. ΣΚΟΠΟΣ

Τις τελευταίες δεκαετίες, το πεδίο των «αέριων διαβιβαστών» έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών σε προκλινικό και κλινικό επίπεδο. Η συμμετοχή τους σε ενδογενή σηματοδοτικά μονοπάτια, τόσο υπό φυσιολογικές, όσο και υπό παθοφυσιολογικές συνθήκες, έχει καταστήσει επιτακτική την ανάγκη προσανατολισμού της έρευνας προς τη βιολογία των μορίων αυτών. Το υδρόθειο (H_2S), ο τρίτος αέριος διαβιβαστής, παράγεται στα θηλαστικά με τη μεσολάβηση τριών ενζύμων, της β-συνθάσης της κυσταθειονίνης (CBS), της γ-λυάσης της κυσταθειονίνης (CSE) και της 3-μερκαπτοπυροσταφυλικής θειοτρανσφεράσης (3-MST). Παρόλο που για πολλά χρόνια αναγνωριζόταν απλώς ως ένα τοξικό αέριο, οι ερευνητικές αναζητήσεις γύρω από το υδρόθειο έχουν καταδείξει τη χρησιμότητά του στη διεκπεραίωση βασικών φυσιολογικών λειτουργιών, αλλά και την εμπλοκή του σε διάφορες ασθένειες, όπως είναι ο καρκίνος.

Στα πλαίσια αυτού έχει διαπιστωθεί πως ο αέριος διαβιβαστής παρουσιάζει διφασικό φαρμακολογικό χαρακτήρα. Πράγματι, το ενδογενές υδρόθειο μεσολαβεί στην προαγωγή της καρκινογένεσης, μέσω ενεργοποίησης διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών, δεδομένου πως η αναστολή των ενζύμων βιοσύνθεσής του εμφανίζει αντικαρκινική δράση. Ωστόσο, και η εξωγενής χορήγηση δοτών υδροθείου μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων, εφόσον προκαλείται αύξηση της συγκέντρωσης του H_2S πέραν ορισμένων επιπέδων. Το γεγονός, λοιπόν, πως σε in vitro και in vivo διατάξεις το υδρόθειο έχει τη δυνατότητα να ασκήσει τόσο προκαρκινικές, όσο και αντικαρκινικές δράσεις, καθιστά σημαντική την ενδελεχή μελέτη του ρόλου του στην παθογένεση του καρκίνου και την εξέτασή του ως πιθανή θεραπευτική προσέγγιση, είτε μέσω αναστολέων της ενδογενούς παραγωγής του είτε μέσω δοτών του.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του ρόλου του ενδογενώς παραγόμενου υδροθείου στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών και του προστάτη. Για την επίτευξη αυτού γίνεται αρχικά μελέτη της έκφρασης των ενζύμων παραγωγής H_2S, CBS, CSE και 3-MST, σε πρωτεϊνικό επίπεδο και στη συνέχεια χορήγηση αναστολέων των τριών αυτών μορίων προς έλεγχο της επίδρασής τους στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Διαδικασίες κυτταροκαλλιέργειας

Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές καρκινώματος εκ διαυγών κυττάρων των ωοθηκών TOV-21G (CRL-11730™) και ES-2 (CRL-1978™), καθώς επίσης και οι σειρές προστατικού ανδρογονοανεξάρτητου αδενοκαρκινώματος PC-3 (CRL-1435™) και προστατικού ανδρογονοεξαρτώμενου καρκινώματος LNCaP (CRL-1740™) αγοράστηκαν από την Αμερικάνικη Βιοτράπεζα Συλλογής Ιστών (American Tissue Culture Collection, ATCC). Οι καρκινικές σειρές TOV-21G, PC-3 και LNCaP καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (Biosera, Cat. No: LM-R1639/500), εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοοειδούς (fetal bovine serum, Biosera, Cat. No: FB-1001/500), παρουσία των αντιβιοτικών πενικιλλίνη G/στρεπτομυκίνη 100ug/mL (Biosera, Cat. No: LM-A4118/100), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ενώ η καρκινική σειρά ES-2 καλλιεργείται σε θρεπτικό μέσο McCoy's 5A (Biosera, Cat. No: LM-K1520/500), εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοοειδούς και 100ug/mL πενικιλλίνη G/στρεπτομυκίνη. Οι κυτταρικές καλλιέργειες διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο (Thermo Scientific), σε συνθήκες απόλυτης υγρασίας στους 37°C και σε ατμόσφαιρα με περιεκτικότητα 5% σε CO_2. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα σε θάλαμο νηματικής ροής, ο οποίος είναι εξοπλισμένος με υπεριώδη (UV) λάμπα και φίλτρα αέρος, ώστε να εξασφαλιστούν άσηπτες συνθήκες εργασίας.

Απόψυξη κυτταρικών σειρών

Οι κυτταρικές σειρές αποθηκεύονται στο εργαστήριό μας σε συνθήκες βαθιάς ψύξης μέσα σε υγρό άζωτο (-196°C), σε ειδικά κρυοάντοχα σωληνάρια ψύξης κυττάρων (1,5mL). Για την απόψυξή τους, προστίθενται υπό άσηπτες συνθήκες 10mL προθερμασμένο θρεπτικό υλικό σε αποστειρωμένα τρυβλία, διαμέτρου 90x20mm (Kisker Biotech), και το περιεχόμενο των σωληναρίων μεταφέρεται εκεί. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στον κλίβανο, με ανανέωση του θρεπτικού υλικού ανά δύο μέρες.

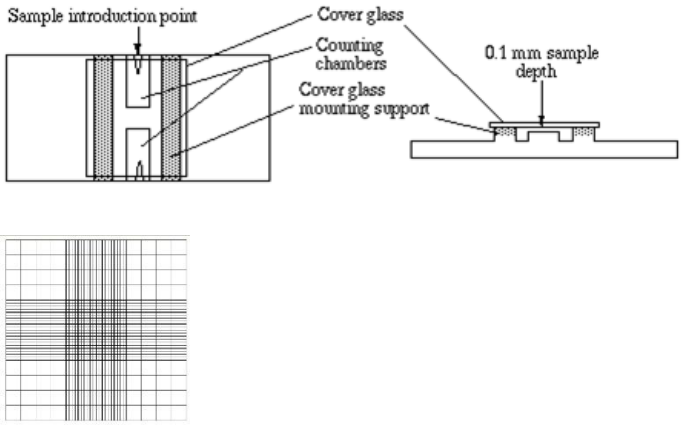
Αραίωση των κυττάρων και συνέχιση της καλλιέργειας

Ύστερα από παρατήρηση στο μικροσκόπιο, όταν τα κύτταρα καλύπτουν το 75-80% της επιφάνειας του τρυβλίου, ανακαλλιεργούνται. Υπό άσηπτες συνθήκες, γίνεται αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού με γυάλινη πιπέττα Pasteur υπό κενό και δύο φορές έκπλυση με ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-χλωριούχων (DPBS, Biosera, Cat. No: LM-S2042/500). Στη συνέχεια προστίθεται 1mL διαλύματος τρυψίνης

(Trypsin-EDTA 1x in PBS, Biosera, Cat. No: LM-T1706/100) και ακολουθεί επώαση στον κλίβανο για 30 δευτερόλεπτα έως 3 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από το τρυβλίο. Εάν καθίσταται αναγκαίο υποβοηθάται και μηχανικά η αποκόλληση, δεδομένου πως παρατεταμένη έκθεση των κυττάρων στην τρυψίνη ενδέχεται να οδηγήσει σε λύση τους. Στη συνέχεια, γίνεται απενεργοποίηση της τρυψίνης με προσθήκη του θρεπτικού υλικού που περιέχει 10% ορό, μεταφορά των κυττάρων σε σωλήνα (falcon) των 50mL και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1200 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας της φυγοκέντρησης, απομακρύνεται το υπερκείμενο και γίνεται καλή επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων με θρεπτικό υλικό, προκειμένου να διαλυθούν τα συσσωματώματα. Ανάλογα με τον εκάστοτε πειραματικό σχεδιασμό, τα κύτταρα μοιράζονται στον επιθυμητό αριθμό τρυβλίων προς συνέχιση της καλλιέργειας ή πραγματοποιείται μέτρησή τους με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου, ώστε να προσδιοριστεί ο αριθμός τους και να μεταφερθούν σε πλακίδια, επίπεδου πυθμένα, 96 μικροφρεατίων (Kisker Biotech), όπου και θα γίνει η μετέπειτα χορήγηση των προς έλεγχο ουσιών.

Προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων μέσω αιματοκυτταρόμετρου

Μετά την επαναιώρηση του ιζήματος, λαμβάνονται με πιπέττα 10uL από τα κύτταρα και τοποθετούνται στην κοίλη επιφάνεια που υπάρχει μεταξύ του αιματοκυτταρόμετρου (Hausser Scientific) και της καλυπτρίδας. Το αιματοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα, που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες επιφάνειες στις δύο απέναντι πλευρές της. Οι επιφάνειες αυτές αποτελούνται από 9 τετράγωνα σε μορφή πλέγματος, με εμβαδόν $1mm^2$, όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα. Λόγω τριχοειδικών φαινομένων, το κυτταρικό εναιώρημα απλώνεται σε όλη την επιφάνεια. Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που καλύπτει καθένα από τα εννέα τετράγωνα είναι 10^{-4}ml. Μετράται στο οπτικό μικροσκόπιο, με αντικειμενικό φακό 10x, ο αριθμός των κυττάρων που καλύπτουν τα τέσσερα ακριανά τετράγωνα διαμερίσματα. Ο αριθμός των συνολικών κυττάρων/mL προκύπτει από το μέσο όρο των μετρούμενων κυττάρων στα τέσσερα τετράγωνα x 10^4, δηλαδή με τον αριθμό των μετρούμενων κυττάρων x 2500. Με βάση αυτή τη μέτρηση και ανάλογα με τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων σε κάθε μικροφρεάτιο της πλάκας των 96 βοθρίων (σε επιλεγμένο τελικό όγκο 100uL), υπολογίζεται ο όγκος των κυττάρων που πρέπει να παραληφθεί από το αρχικό εναιώρημα μετά τη φυγοκέντρηση για τη συνέχιση της καλλιέργειας.



Εικόνα 15: Διάταξη αιματοκυτταρόμετρου Neubauer

3.2. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot analysis)

Προκειμένου να γίνει έλεγχος της έκφρασης των ενζύμων παραγωγής υδροθείου, CBS, CSE και 3-MST στις υπό έλεγχο κυτταρικές σειρές, χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική τεχνική Western blot. Η συγκεκριμένη τεχνική, που αποτελεί μέθοδο ανίχνευσης και ημιποσοτικού προσδιορισμού μιας επιθυμητής πρωτεΐνης σε ένα βιολογικό δείγμα, είναι σχετικά απλή, αλλά δύσκολο να αυτοματοποιηθεί. Εφαρμόζεται σε μίγμα πρωτεϊνών που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου, όπου υπό την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος γίνεται ο διαχωρισμός ανάλογα με το μοριακό βάρος (SDS-PAGE). Οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες, που βρίσκονται με τη μορφή συμπλόκου με το SDS, μεταφέρονται στη συνέχεια σε ειδικές μεμβράνες (νιτροκυτταρίνης ή διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου), μέσω εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου. Η βασική ιδέα της τεχνικής βασίζεται στη χρήση πρωτογενών αντισωμάτων, που συνδέονται εκλεκτικά με το υπό μελέτη αντιγόνο, όταν εμβαπτίζεται σε αυτά η μεμβράνη. Ένα δεύτερο αντίσωμα που είναι συζευγμένο με κάποιο ένζυμο-δείκτη έρχεται να δεσμευτεί στο πρώτο και η εμφάνιση του συμπλόκου επιτυγχάνεται με τη χρήση κατάλληλου υποστρώματος-αντιδραστηρίου ECL (Enhanced ChemiLuminescence Substrate), βασιζόμενη στο φαινόμενο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται αποτυπώνεται σε φωτογραφικό φιλμ και το σήμα που λαμβάνεται αναλύεται με τη χρήση ειδικών προγραμμάτων.

<u>Συλλογή των κυττάρων και αποθήκευση</u>

Πρωταρχικό βήμα για την εφαρμογή της μεθόδου αποτελεί η συλλογή των κυττάρων από τις κυτταροκαλλιέργειες των τεσσάρων σειρών που εξετάζουμε και η αποθήκευσή τους για περαιτέρω χρήση.

Έχοντας ακολουθήσει την ίδια διαδικασία με αυτήν της ανακαλλιέργειας, όπου τα κύτταρα έχουν εκπλυθεί με ρυθμιστικό διάλυμα DPBS, έχουν αποκολληθεί με τη βοήθεια τρυψίνης και έχουν συλλεγεί υπό μορφή ιζήματος (pellet) ύστερα από φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 5 λεπτά, γίνεται αναδιάλυση των ιζημάτων με 1mL DPBS και μεταφορά των κυτταροκαλλιεργειών σε ξεχωριστά eppendorfs, χωρητικότητας 1,5mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 2 λεπτά, αφαίρεση του υπερκειμένου, αναδιάλυση του ιζήματος με DPBS και επανάληψη της διαδικασίας δύο φορές. Τα ιζήματα, που αποτελούν τη συλλογή των κυττάρων, αποθηκεύονται στους -80°C, προς αποφυγή μετουσίωσης των πρωτεϊνών, μέχρις ότου να χρησιμοποιηθούν.

Απομόνωση πρωτεϊνών

Για τη λήψη του μίγματος των πρωτεϊνών από τα ιζήματα των κυττάρων, πραγματοποιείται λύση αυτών με τη χρήση κατάλληλου διαλύματος (lysis buffer). Πιο αναλυτικά, τα κύτταρα παραλαμβάνονται από τους -80°C και τα ιζήματα επαναδιαλύονται με κατάλληλη ποσότητα lysis buffer, ώστε να είναι δυνατή η λύση των κυττάρων αλλά, ταυτόχρονα, να μην είναι μεγάλη η αραίωση. Τα δείγματα τοποθετούνται για μισή ώρα στον πάγο. Η χαμηλή θερμοκρασία, σε συνδυασμό με την ύπαρξη αναστολέων φωσφατασών και πρωτεασών στο διάλυμα, αποτρέπει την αποδιάταξη του κυτταρικού περιεχομένου και την πέψη των πρωτεϊνών.

Με το πέρας των 30 λεπτών, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο, που περιέχει το εκχύλισμα των πρωτεϊνών, μεταφέρεται σε νέα eppendorfs, τα οποία είτε αποθηκεύονται στους -80°C, είτε παραμένουν στον πάγο, ώστε να ακολουθήσει ποσοτικός προσδιορισμός του εκάστοτε πρωτεϊνικού περιεχομένου. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη, ούτως ώστε κάθε δείγμα που θα αναλυθεί στη Western blot να περιέχει ίδια ποσότητα πρωτεϊνών με τα υπόλοιπα, γεγονός που θα οδηγήσει σε σωστή ερμηνεία των σημάτων που θα προκύψουν.

Ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και προετοιμασία των δειγμάτων

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών προσδιορίζεται με το ολοκληρωμένο σύστημα "DC Protein assay kit" της BioRad, το οποίο υπολογίζει την πρωτεϊνική συγκέντρωση των δειγμάτων σε mg/mL, με βάση την απορρόφησή τους στα 750nm. Η απορρόφηση αυτή μεταφράζεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς, που αποτελείται από τιμές απορρόφησης συναρτήσει γνωστών συγκεντρώσεων προτύπου διαλύματος βόειας αλβουμίνης, BSA (0/0,25/0,5/1/2/4mg/mL). Για την ετοιμασία των

δειγμάτων, ίση ποσότητα πρωτεϊνών από όλα τα εκχυλίσματα αναμιγνύεται με κατάλληλη ποσότητα lysis buffer και ρυθμιστικού διαλύματος φορτώσεως 6x, ώστε η τελική συγκέντρωση του τελευταίου να είναι 1x. Το διάλυμα αυτό περιέχει SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), ένα ανιονικό απορρυπαντικό που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, δεσμεύεται σε αυτές και τις φορτίζει αρνητικά, ώστε να μπορούν να ηλεκτροφορηθούν και να διαχωριστούν με βάση το μέγεθός τους, καθώς θα έχουν ομοιόμορφο αρνητικό φορτίο ανά μονάδα μάζας. Εν συνεχεία, η αποδιάταξη επιτυγχάνεται με θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C για 5 λεπτά και ακολουθεί επανατοποθέτηση στον πάγο για λίγα δευτερόλεπτα, γρήγορη φυγοκέντρηση και αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C για το επόμενο βήμα.

Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε γέλη πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

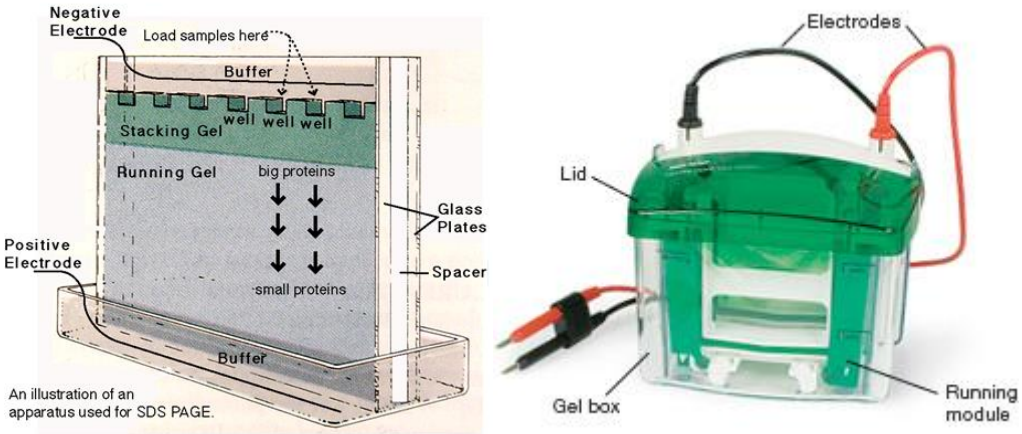
Όπως προαναφέρθηκε, στο εν λόγω είδος ηλεκτροφόρησης, οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες κινούνται στο δημιουργηθέν ηλεκτρικό πεδίο με βάση το μοριακό τους βάρος κι έτσι διαχωρίζονται. Στο διαχωρισμό αυτό κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζει το ακρυλαμίδιο, τα μονομερή του οποίου πολυμερίζονται, με αποτέλεσμα τη δημιουργία αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου. Η γέλη προκύπτει από συμπολυμερισμό αυτών με μόρια N,N-μεθυλεν-bis-ακρυλαμιδίου (bis), τα οποία ενσωματώνονται στις αλυσίδες και δημιουργείται πλέγμα. Στη διαδικασία του πολυμερισμού συμμετέχει αφενός το υπερθειικό αμμώνιο (APS) που συμβάλλει στη δημιουργία ελευθέρων ριζών από τα μονομερή του ακρυλαμιδίου, οι οποίες αντιδρούν με μονομερή για να ξεκινήσει η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού και, αφετέρου, η τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) που επιταχύνει το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών.

Σε πρώτο βήμα, λοιπόν, παρασκευάζεται το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου που αποτελείται από δύο τμήματα. Το πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel), όπου οι πρωτεΐνες πακετάρονται πριν διαχωριστούν, ώστε να μπουν ταυτόχρονα στο επόμενο πήκτωμα, το οποίο είναι το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel), όπου οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Πάνω από το πήκτωμα πακεταρίσματος τοποθετείται ειδικό χτενάκι για να σχηματιστούν τα ανάλογα πηγαδάκια, όπου θα εισέλθουν τα δείγματα. Όταν το πήκτωμα πακεταρίσματος πολυμεριστεί, το χτενάκι μπορεί να απομακρυνθεί, οπότε και το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου είναι έτοιμο για ηλεκτροφόρηση. Ανάλογα με το μέγεθος των υπό εξέταση πρωτεϊνών, παρασκευάζονται πηκτώματα ανάλογης συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου.

% Ακρυλαμίδιο	Εύρος μοριακού βάρους (kDa)
7	50-500
10	20-300
12	10-200
15	3-100

Πίνακας 1: Απαιτούμενη περιεκτικότητα του πηκτώματος σε ακρυλαμίδιο ανάλογα με το μέγεθος των προς προσδιορισμό πρωτεϊνών

Στο συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό επιλέγεται περιεκτικότητα 10% σε ακρυλαμίδιο. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου τοποθετείται στη συσκευή της Western blot (BioRad, Mini Protean Tetra Cell), στον εσωτερικό και εξωτερικό θάλαμο της οποίας προστίθεται Running buffer 1x. Τα δείγματα ξεπαγώνονται και «φορτώνονται» στα σχηματισμένα πηγαδάκια. Παράλληλα με τα δείγματα, «φορτώνεται» και ένα δείγμα-μάρτυρας της ηλεκτροφόρησης, που είναι ειδικά σχεδιασμένος ώστε να δίνει ζώνες γνωστού μοριακού βάρους («marker», Nippon Genetics, BlueStar Plus Prestained Protein Marker, Cat. No: MWP04). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στο σύστημα ηλεκτροφόρησης της BioRad (PowerPac Universal, 500V/2,5A/500W) στα 75 Volts για περίπου 40 λεπτά, μέχρις ότου τα δείγματα να φτάσουν στην περιοχή της γέλης όπου θα είναι δυνατός ο διαχωρισμός και στη συνέχεια στα 120 Volts, μέχρι να διανύσει ο marker την επιθυμητή απόσταση κατά μήκος της γέλης, ανάλογα με τα kDa των πρωτεϊνών που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε.

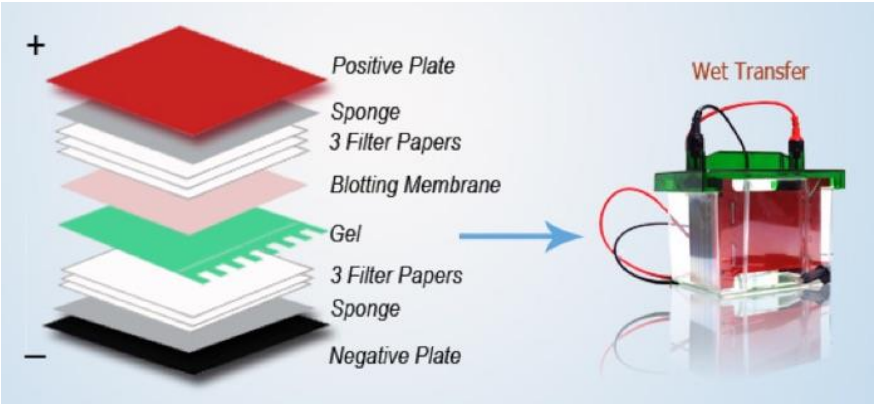


Εικόνα 16: Απεικόνιση της συσκευής που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου

Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη (Διαδικασία Transfer)

Προκειμένου να είναι εφικτή η σύνδεση των πρωτεϊνών με τα αντισώματα που θα προστεθούν, πρέπει αυτές να μεταφερθούν από το πήκτωμα στο οποίο βρίσκονται σε μεμβράνη διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF, Millipore, Immobilon®-P Transfer Membranes). Η μεμβράνη αυτή είναι υδρόφοβη, επομένως για να καταστεί υδρόφιλη και να ενεργοποιηθεί θα πρέπει να διαβραχεί με μεθανόλη για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, τοποθετείται στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς για 15 λεπτά. Η ίδια διαδικασία εμβάπτισης στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς ακολουθείται και για το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, αμέσως μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης.

Σε επόμενο βήμα, η μεμβράνη αφήνεται πάνω στη γέλη, ενώ πάνω από τη μεμβράνη και κάτω από τη γέλη τοποθετούνται δύο ή τρία διηθητικά χαρτιά Whatman και ένα σφουγγάρι, επίσης εμποτισμένα με διάλυμα μεταφοράς. Όλα αυτά μεταφέρονται στη συσκευή που είναι μέσα σε πάγο, με τη μεμβράνη να βρίσκεται προς το θετικό πόλο (κόκκινος πόλος) και ακολουθεί προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος εντός της συσκευής. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται με τη βοήθεια ηλεκτρικού ρεύματος για 1 ώρα και 30 λεπτά στα 100 Volts. Η διάρκεια μεταφοράς, ωστόσο, εξαρτάται από το μέγεθος των πρωτεϊνών, καθώς για πρωτεΐνες με μεγαλύτερο μοριακό βάρος απαιτείται περισσότερος χρόνος.



Εικόνα 17: Απεικόνιση της διαδικασίας ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου στη μεμβράνη PVDF

Κατεργασία της μεμβράνης και επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα

Με σκοπό να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων στη μεμβράνη και να μειωθεί ο «θόρυβος» στο τελικό σήμα που προκύπτει, η μεμβράνη επωάζεται για τουλάχιστον μία ώρα σε διάλυμα έκπλυσης TBS-Tween 1x με 5% άπαχο γάλα (Blocking buffer), υπό ανακίνηση, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί ολιγόλεπτη έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα έκπλυσης TBS-Tween και επώασή της

με το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα, αραιωμένο επίσης σε διάλυμα έκπλυσης, στους 4ºC σε περιστρεφόμενο τροχό για 16-18 ώρες («overnight»). Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη διπλωματική ήταν τα εξής:

Αντίσωμα	Εταιρεία παρασκευής	Είδος-Ζώο προέλευσης	Αραίωση	kDa πρωτεΐνης
CBS (14787-1-AP)	Proteintech Group	Πολυκλωνικό-Κουνέλι	1:1000	61
CSE (12217-1-AP)	Proteintech Group	Πολυκλωνικό-Κουνέλι	1:1000	45
3-MST (HPA001240)	Atlas Antibodies	Πολυκλωνικό-Κουνέλι	1:1000	33
GAPDH (14C10).	Cell Signaling Technology	Μονοκλωνικό-Κουνέλι	1:1000	37

Πίνακας 2: Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη Western blot

Η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH) είναι μία πρωτεΐνη που εκφράζεται σε σταθερά και ισόποσα επίπεδα στα κύτταρα του οργανισμού και η έκφρασή της κατά βάση δε μεταβάλλεται («house-keeping» πρωτεΐνη). Ελέγχεται έτσι η ισοφόρτωση των δειγμάτων, ενώ χρησιμοποιείται στη συνέχεια στην ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των δειγμάτων, καθώς τα αποτελέσματα των πειραμάτων «διορθώνονται» ως προς την έκφραση της εν λόγω πρωτεΐνης.

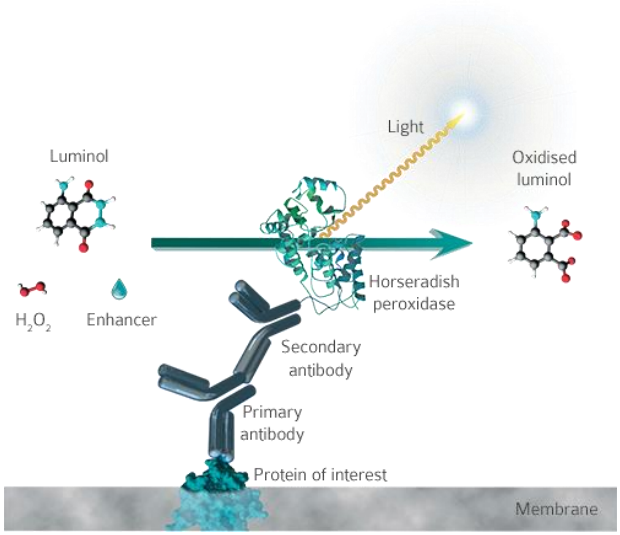
Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα και ανίχνευση του σήματος

Με το πέρας της επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα ακολουθούν δύο εκπλύσεις της μεμβράνης με το διάλυμα έκπλυσης για 10 λεπτά, προς απομάκρυνση του αδέσμευτου αντισώματος και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου για δύο ώρες. Το δεύτερο αυτό μόριο στοχεύει σε ένα ειδικό τμήμα του πρώτου αντισώματος και προέρχεται από το ίδιο ζώο με αυτό. Είναι, συνήθως, συνδεδεμένο με ένζυμα αναφοράς, όπως η υπεροξειδάση αγριοραφανίδων (horseradish peroxidase, HRP) στην προκειμένη περίπτωση, που έχουν τη δυνατότητα να διασπάσουν έναν παράγοντα χημειοφωταύγειας, ώστε να παραχθεί φωτεινότητα ανάλογη με το ποσό των πρωτεϊνών. Για όλα τα πρωτογενή αντισώματα στη

συγκεκριμένη διπλωματική χρησιμοποιήθηκε δευτερογενές αντίσωμα Anti-rabbit IgG HRP-linked, σε αραίωση 1:2000 σε διάλυμα έκπλυσης (Cell signaling Technologies).

Με το τέλος των δύο ωρών, γίνεται ξανά έκπλυση της μεμβράνης με το διάλυμα TBS-Tween τρεις φορές για 15 λεπτά και ακολουθεί επώαση με το αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας ECL για 5 λεπτά (Enhanced ChemiLuminescence Substrate, Thermo Scientific). Το εν λόγω αντιδραστήριο αποτελείται από δύο διαλύματα που αναμειγνύονται ισόποσα, το Luminol/Enhancer και το διάλυμα H_2O_2. Η HRP, που είναι συνδεδεμένη στο δεύτερο αντίσωμα, καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης, αντίδραση που συνεπάγεται την εμφάνιση φωταύγειας για μικρό χρονικό διάστημα.

Εν συνεχεία, η μεμβράνη προσαρμόζεται στην κασετίνα εμφάνισης (Autoradiography Cassette, Fisher Biotech) και στον ειδικό σκοτεινό θάλαμο εμφάνισης τοποθετείται επάνω της ακτινογραφικό φιλμ (X-ray film, Fujifilm) για μερικά δευτερόλεπτα ή λεπτά. Στη συνέχεια, το φιλμ τοποθετείται στη συσκευή εμφάνισης (Optimax X-Ray film processor, Protec), όπου διέρχεται από το διάλυμα εμφάνισης και μονιμοποίησης και παραλαμβάνεται. Η φωταύγεια ανιχνεύεται με την πρόσπτωσή της στο φιλμ και την αμαύρωση αυτού. Οι μαύρες ζώνες αποκαλύπτουν την ύπαρξη, τη θέση και, μερικώς, την ποσότητα των επιθυμητών πρωτεϊνών. Είναι επόμενο να συμπεράνει κανείς πως όσο πιο έντονο είναι το μαύρο χρώμα σε κάποιο σημείο του φιλμ, τόσο περισσότερο φως έχει προσπέσει, που αντιστοιχεί σε μεγαλύτερη ποσότητα HRP και, άρα, πρωτογενούς αντισώματος και αντίστοιχου αντιγόνου. Για να είναι δυνατός ο προσδιορισμός της θέσης των πρωτεϊνών μέσω των kDa τους, γίνεται σύγκριση με τις χρωματιστές ζώνες του «marker», που περιέχει πρωτεΐνες γνωστού μεγέθους.



Εικόνα 18: Απεικόνιση της αντίδρασης χημειοφωταύγειας προς παραγωγή ανιχνεύσιμου σήματος

Αποδέσμευση αντισωμάτων από τη μεμβράνη PVDF και επαναχρησιμοποίησή της

Είναι εφικτό, ύστερα από τη χρήση του συστήματος χημειοφωταύγειας, να επαναχρησιμοποιηθεί η μεμβράνη PVDF για την ανίχνευση κάποιας άλλης πρωτεΐνης, παραδείγματος χάριν κάποιας δομικής πρωτεΐνης, με απομάκρυνση του πρωτογενούς αντισώματος (βήμα stripping). Δεδομένου πως κάνουμε λόγο για τα ίδια δείγματα, που έχουν φορτωθεί ισόποσα και έχουν υποστεί τις ίδιες συνθήκες επεξεργασίας, τα αποτελέσματα πριν και μετά το βήμα του stripping είναι επιτρεπτό να συγκριθούν μεταξύ τους.

Η μεμβράνη PVDF εκπλένεται διαδοχικά με μεθανόλη και διάλυμα TBS-Tween για 5 λεπτά και στη συνέχεια επωάζεται σε Stripping buffer για 30 λεπτά στους 45°C. Ακολουθούν πέντε εκπλύσεις των 5 λεπτών με το διάλυμα έκπλυσης και η μεμβράνη εμβαπτίζεται και πάλι σε blocking buffer. Τα βήματα στη συνέχεια είναι τα ίδια, όπως περιγράφηκαν παραπάνω.

Ποσοτικοποίηση του παραγόμενου σήματος

Μετά την εμφάνιση, τα φιλμ σαρώνονται στον υπολογιστή με χρήση της συσκευής CanoScan N656U (Canon). Μέσω του προγράμματος Photoshop 6.0, τα αποτελέσματα εισάγονται στο πρόγραμμα ImageJ, όπου η οπτική πυκνότητα και η επιφάνεια της ζώνης της κάθε πρωτεΐνης προσδιορίζονται ποσοτικά μέσω μέτρησης της έντασης του σήματος της ζώνης που αντιστοιχεί στην κάθε πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα «διορθώνονται» μέσω διαίρεσης της ποσότητας του σήματος της ζώνης της εκάστοτε πρωτεΐνης με την ποσότητα του σήματος της ζώνης της GAPDH του ίδιου δείγματος και εκφράζονται ως ο λόγος της έκφρασης της κάθε πρωτεΐνης ως προς την έκφραση της GAPDH.

Τα αντιδραστήρια/διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεκπεραίωση της τεχνικής Western blot αναγράφονται ακολούθως:

Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

2 γέλες περιεκτικότητας 10% σε ακρυλαμίδιο	Separating gel	Stacking gel
30% Acrylamide	5mL	650uL
Resolving buffer/Stacking buffer	3,75mL	1,25mL
ddH_2O	6,25mL	3,05mL

APS	100uL	50uL
TEMED	10uL	5uL

Πίνακας 3: Σύσταση των γελών πολυακρυλαμιδίου

Διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis buffer)	• 20mM Tris-HCl pH 7,6 • 1% SDS • 1% Triton X-100 • 1mM EDTA • 0,1mM EGTA • 150mM NaCl • Αναστολείς φωσφατασών: 1mM Glycerol phosphate, 50mM NaF, 1mM Na_3VO_4 • Αναστολείς πρωτεασών: 1mM PMSF, 5ug/mL leupeptin, 10ug/mL aprotinin, 10ug/mL pepstatin
Διάλυμα φορτώσεως (Loading buffer)	• 7mL 4x Tris-HCl/SDS gel buffer pH 6,8 • 3,6mL Glycerol • 1g SDS • 600uL 2-ME • 4mg Bromophenol blue • 12mL ddH_2O
Resolving buffer	• 91g Tris base • 2g SDS • 500mL ddH_2O • pH 8,8
Stacking buffer	• 6,05g Tris base • 0,4g SDS • 100mL ddH_2O • pH 6,8
Running buffer 5x	• 15,2g Tris Base • 72g Glycine • 5g SDS

	• 1L ddH_2O
Running buffer 1x	• 200mL Running buffer 5x • 800mL ddH_2O
Διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer)	• 1,5g Tris • 7,5g Glycine • 100mL Methanol • 900mL ddH_2O
Διάλυμα έκπλυσης TBS 10x	• 80g NaCl • 30g Tris • 1L ddH_2O • pH 7,4
Διάλυμα έκπλυσης TBS-Tween 1x	• 100mL TBS 10x buffer • 900mL ddH_2O • 1mL Tween
Stripping buffer	• 7,6g Tris • 20g SDS • 1L ddH_2O • pH 6,8 • Χρήση 25mL/μεμβράνη, ύστερα από προσθήκη 175uL μερκαπτοαιθανόλης

Πίνακας 4: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της Western blot

3.3. Χορήγηση ουσιών στα καρκινικά κύτταρα

Όλα τα πειράματα που αφορούν στη χορήγηση ουσιών στα καρκινικά κύτταρα λαμβάνουν χώρα σε πλάκες των 96 μικροφρεατίων με επίπεδο πυθμένα. Όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα, οι κυτταρικές καλλιέργειες συλλέγονται σε μορφή ιζήματος, το οποίο αναδιαλύεται με το κατάλληλο θρεπτικό υλικό και μετράται στο μικροσκόπιο ο αριθμός των κυττάρων. Αφότου έχει καθοριστεί, με τον τρόπο που θα αναφερθεί παρακάτω, ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων που θα υπάρχει σε καθένα από τα βοθρία της πλάκας, σε τελικό όγκο 100uL, τα κύτταρα μεταφέρονται σε αυτήν και επωάζονται στον κλίβανο για 16-18 ώρες («overnight»), σε συνθήκες απόλυτης

υγρασίας στους 37°C και σε ατμόσφαιρα με περιεκτικότητα 5% σε CO_2. Το χρονικό αυτό περιθώριο είναι επαρκές, προκειμένου τα κύτταρα να προσκολληθούν στον πυθμένα.

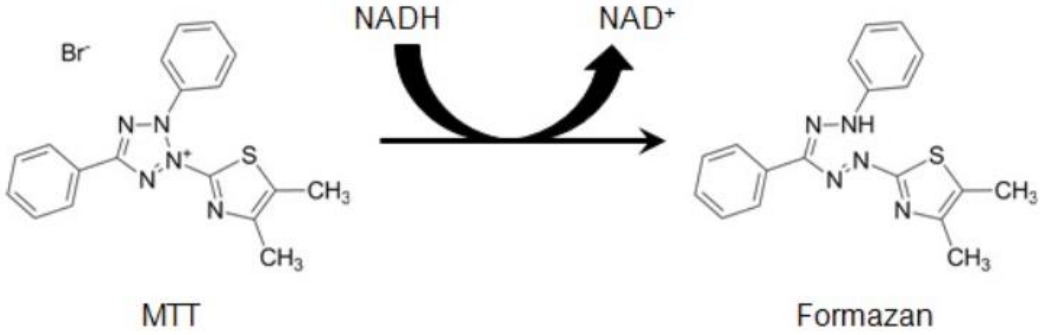
Με το πέρας των ωρών, ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό στα βοθρία με τα κύτταρα και χορηγούνται οι προς έλεγχο ουσίες υπό άσηπτες συνθήκες. Όλα τα πειράματα πραγματοποιούνται σε τελικό όγκο 100uL και η χορήγηση των μορίων γίνεται για 48 ώρες. Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι: ο αναστολέας της β-συνθάσης της κυσταθειονίνης (CBS) και της γ-λυάσης της κυσταθειονίνης (CSE) AOAA (aminooxyacetic acid), ο αναστολέας της γ-λυάσης της κυσταθειονίνης (CSE) PAG (DL-propargylglycine), ο αναστολέας της 3-μερκαπτοπυροσταφυλικής θειοτρανσφεράσης (3-MST) Compound 3 (2-[(4-hydroxy-6-methylpyrimidin-2-yl)sulfanyl]-1-(naphthalen-1-yl)ethan-1-one) και ο δότης H_2S GYY4137 (morpholin-4-ium-4-methoxyphenyl(morpholino)phosphinodithioate). Τα στοιχεία σχετικά με τις εν λόγω ουσίες αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος γίνεται οπτικός έλεγχος των κυττάρων στο μικροσκόπιο, προκειμένου να ελέγχεται η κατάσταση στην οποία βρίσκονται και να διασφαλίζεται η ομαλή έκβαση της πειραματικής διαδικασίας.

Ουσία προς έλεγχο	Χημικός τύπος	Μοριακό Βάρος	Προμηθευτής	Stock συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση στα 100uL
AOAA (Αναστολέας CBS/CSE)	$C_2H_5NO_3$	109,3g/mol	Sigma-Aldrich	100mM σε wfi	100uM, 250uM, 500uM, 750uM, 1mM
PAG (Αναστολέας CSE)	$C_5H_7NO_2$	113,11g/mol	Sigma-Aldrich	100mM σε wfi	500uM, 1mM, 3mM, 5mM
Compound 3 (Αναστολέας 3-MST)	$C_{17}H_{14}N_2O_2S$	310,37g/mol	Specs	2mM σε DMSO	0,1uM, 1uM, 10uM
GYY4137 (Δότης H_2S)	$C_{15}H_{25}N_2O_3PS_2$	376,47g/mol	Ευγενής προσφορά του καθηγητή Whiteman M.	60mM σε wfi	3uM, 30uM, 300uM, 3mM

Πίνακας 5: Ουσίες που χορηγήθηκαν στις 4 καρκινικές σειρές

3.4. Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού (μέθοδος MTT)

Με σκοπό να ελεγχθεί η επίδραση της χορήγησης των ανωτέρω ουσιών στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιείται η χρωματομετρική μέθοδος MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. Η συγκεκριμένη τεχνική, που αναπτύχθηκε ευρέως για πρώτη φορά το 1983 από τον Mosmann[165], στηρίζει την αρχή της στη δυνατότητα των μεταβολικά ενεργών ζωντανών κυττάρων να μετατρέπουν το άλας τετραζολίου (MTT) σε φορμαζάνη. Το πρώτο έχει κίτρινο χρώμα, ενώ το τελικό προϊόν είναι δυσδιάλυτοι κρύσταλλοι με πορφυρό χρώμα, η απορρόφηση του οποίου μετράται σε φασματοφωτόμετρο, ύστερα από διάλυση των κρυστάλλων σε οργανικό διαλύτη. Η μετατροπή αυτή βασίζεται στην αναγωγή του MTT, ύστερα από αλληλεπίδραση με μόρια, όπως είναι οι μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες (π.χ. NADH), τα οποία και του μεταφέρουν ηλεκτρόνια[165,166].



Εικόνα 19: Μετατροπή του άλατος MTT σε κρυστάλλους φορμαζάνης[167]

Για τους κυτταρικούς πληθυσμούς που βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης, η ποσότητα φορμαζάνης και, επομένως, η τιμή της απορρόφησης που προκύπτει, είναι ανάλογη προς τον αριθμό των μεταβολικά ενεργών ζωντανών κυττάρων. Η απορρόφηση μετράται μεταξύ 550nm και 600nm, ενώ συνίσταται και η χρήση ενός μήκους κύματος αναφοράς, προκειμένου να μειώσει το «θόρυβο» για τον οποίο ευθύνεται η μη ειδική απορρόφηση. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε μήκος κύματος μεταξύ 630-750nm. Η μη ειδική αυτή απορρόφηση μπορεί να οφείλεται στην κατακρήμνιση πρωτεϊνών, λόγω της προσθήκης οργανικού διαλύτη κατά τη διάλυση των κρυστάλλων, όπως επίσης και σε χημικές παρεμβολές ορισμένων ενώσεων που συμμετέχουν σε αντιδράσεις αναγωγής. Ισχυρές αναγωγικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένου του ασκορβικού οξέος ή ενώσεων που περιέχουν σουλφυδρυλομάδες, όπως είναι η γλουταθειόνη, το συνένζυμο Α ή η διθειοθρεϊτόλη, έχουν τη δυνατότητα να ανάγουν το άλας τετραζολίου μη ενζυματικά και να οδηγήσουν

σε αυξημένες τιμές απορρόφησης. Επιπροσθέτως, το μέσο καλλιέργειας σε αυξημένο pH ή εκτεταμένη έκθεση του MTT στο φως μπορεί να επιταχύνει την αναγωγή του και να συμβάλει στην εμφάνιση υψηλών απορροφήσεων, ενώ και ο τύπος του χρησιμοποιούμενου μέσου καλλιέργειας, παράλληλα με την πηγή του ορού, ενδέχεται να επηρεάσουν την απορρόφηση[167].

Υπάρχει ένας κατάλογος από παραμέτρους που πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν, καθώς μπορούν να επηρεάσουν τον κυτταρικό μεταβολισμό και να τροποποιήσουν την ευαισθησία της μεθόδου, οδηγώντας σε λανθασμένη υψηλή ή χαμηλή μετρούμενη απορρόφηση φορμαζάνης. Σε αυτόν, συγκαταλέγονται ο αριθμός των κυττάρων που ελέγχονται και η μεταβολική τους δραστηριότητα, το μέσον της καλλιέργειας και η αποφυγή εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών, καθώς και οι βέλτιστες συγκεντρώσεις και χρόνοι έκθεσης στο MTT[167]. Όσον αφορά στο μεταβολισμό των κυττάρων, είναι επόμενο τα κύτταρα που αναπτύσσονται ταχέως ως μονοστιβάδα να έχουν διαφορετικό ρυθμό μεταβολισμού από αυτά που έχουν υποστεί διαφοροποίηση, που έχουν αναπτυχθεί σε μεγάλη πυκνότητα ή είναι γηρασμένα. Ο εκάστοτε ερευνητής θα πρέπει να ελέγχει τις παραμέτρους αυτές μέσω πειραματικών δοκιμασιών, ώστε να βελτιστοποιούνται οι συνθήκες της τεχνικής για τις υπό έλεγχο κυτταρικές σειρές. Με τον τρόπο αυτό, είναι εφικτό να παραχθεί επαρκής ποσότητα σήματος, η ανάλυση του οποίου θα οδηγήσει σε αξιόπιστα συμπεράσματα σχετικά με τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Αξίζει να αναφερθεί πως, παρά τους όποιους περιορισμούς, η τεχνική του MTT έχει χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια σε μια πληθώρα πειραματικών μελετών, για τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της τοξικότητας, της βιωσιμότητας, κ.ά..

Προχωρώντας στον καθορισμό των παραμέτρων της μεθόδου στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, επισημαίνεται, αρχικά, ότι από την αναζήτηση της βιβλιογραφίας βρέθηκε πως η χρήση συγκέντρωσης MTT μεταξύ του εύρους 0,2-1mg/mL δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα[165,167,168], οπότε και επιλέγονται τα 0,5mg/mL. Στη συνέχεια, στις κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών και του προστάτη ελέγχεται τόσο ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων που πρέπει να χρησιμοποιηθεί ανά βοθρίο της πλάκας, όσο και ο καταλληλότερος χρόνος επώασης του MTT, μετά τη χορήγηση των ουσιών, προς έλεγχο της επίδρασής τους στον πολλαπλασιασμό.

Όσον αφορά στην πρώτη παράμετρο, πρέπει να διασφαλιστεί πως τα κύτταρα βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης, οπότε και στο τέλος της διαδικασίας ο αριθμός των μεταβολικά ενεργών κυττάρων είναι ανάλογος της απορρόφησης, δηλαδή της ποσότητας φορμαζάνης που δημιουργείται. Επομένως, ο αριθμός των κυττάρων για τον προσδιορισμό πρέπει να εμπίπτει εντός του γραμμικού τμήματος της καμπύλης.

Σε περίπτωση που τα κύτταρα φτάσουν σε σημείο να βρίσκονται σε επαφή και να μεγαλώνουν πολύ κοντά το ένα με το άλλο, λόγω της ταχείας ανάπτυξής τους, οδηγούμαστε σε υψηλές κυτταρικές πυκνότητες («confluency») μέσα στα βοθρία, γεγονός ανεπιθύμητο, καθώς εξαντλούνται τα θρεπτικά συστατικά του καλλιεργητικού μέσου, επιβραδύνεται ο μεταβολισμός και επηρεάζεται αρνητικά ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός («contact inhibition»), οδηγώντας σε μη αξιόπιστα αποτελέσματα λόγω μειωμένης αναγωγής MTT. Προς αποφυγή αυτού και δεδομένου πως οι δοκιμασίες ελέγχου του πολλαπλασιασμού των κυττάρων απαιτούν την επώαση τους για κάποια παρατεταμένη χρονική περίοδο, ώστε να διερευνηθεί η επίδραση της χορήγησης των ουσιών, πρέπει να επιλέγεται ένας αριθμός κυττάρων κοντά στο χαμηλό άκρο της γραμμικής περιοχής. Αυτό συντελεί στο να διασφαλιστεί ότι το σήμα που μετράται στο τέλος της ανάλυσης δε θα υπερβαίνει τη γραμμική περιοχή, με αποτέλεσμα να μπορεί να είναι εμφανής, τελικά, είτε η διέγερση είτε η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Όσον αφορά στη δεύτερη παράμετρο, αυτή του χρόνου επώασης του MTT, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η κυτταρική πυκνότητα, η μορφολογία και ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων. Έχει δειχθεί πειραματικά πως επώαση για 1-4 ώρες είναι ικανοποιητική, καθώς από ένα χρονικό σημείο και μετά μπορεί να οδηγηθούμε σε πλατώ απορρόφησης[167]. Ο χρόνος επώασης πρέπει να είναι αρκετός ώστε να παραχθεί επαρκής ποσότητα φορμαζάνης, που θα δώσει ένα σήμα το οποίο να ανιχνεύεται με ευκολία. Ωστόσο, δε θα πρέπει να υπερβαίνει κάποιο όριο, δεδομένου του ότι μπορεί να υπάρξει απώλεια γραμμικότητας, εμφάνιση πλατώ και μείωση της παραγωγής φορμαζάνης. Πρέπει να ληφθεί υπόψιν πως το MTT εμφανίζει κυτταροτοξικές επιδράσεις και η προσθήκη του, στην πραγματικότητα, μπορεί να βλάψει ή ακόμη και να σκοτώσει τα κύτταρα κατά τη διάρκεια ενός πειράματος. Αφενός, η έκθεση των κυττάρων στο MTT έχει παρατηρηθεί να έχει ως αποτέλεσμα δραματικές αλλαγές στη μορφολογία τους, γεγονός που συνεπάγεται αλλαγές και στη φυσιολογία τους[167]. Μάλιστα, οι ίδιοι οι κρύσταλλοι φορμαζάνης ενδέχεται να προκαλέσουν βλάβη στις μεμβράνες κατά τη διάρκεια εξωκύττωσης[169]. Αφετέρου, η εν λόγω τεχνική χρησιμοποιεί αναγωγικά ισοδύναμα (όπως NADH) που εμπλέκονται στο ενεργειακό κυτταρικό σύστημα, για τη μετατροπή του άλατος MTT σε έγχρωμο προϊόν φορμαζάνης. Το γεγονός πως ποσότητα NADH, ή άλλων μορίων, δαπανάται για την αναγωγή του MTT και όχι για τις κυτταρικές λειτουργίες για τις οποίες προοριζόταν, είναι πιθανό να έχει επιπτώσεις στη βιωσιμότητα των κυττάρων[167].

Προσδιορισμός των παραμέτρων για τη διεξαγωγή της μεθόδου MTT

Για την εύρεση του κατάλληλου αριθμού κυττάρων, καθώς και του χρόνου επώασης του MTT, τα κύτταρα μεταφέρονται σε πλάκες των 96 μικροφρεατίων σε στήλες των 1000, 2000, 3000, 5000, 10000 και 20000 κυττάρων. Χρησιμοποιούνται τρεις μικροπλάκες ανά κυτταρική σειρά για τρεις διαφορετικούς χρόνους επώασης MTT. Τα κύτταρα, αφότου μεταφερθούν στην πλάκα, επωάζονται στον κλίβανο για 16-18 ώρες, σε συνθήκες απόλυτης υγρασίας στους 37°C και σε ατμόσφαιρα με περιεκτικότητα 5% σε CO_2. Την επόμενη μέρα το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται και γίνεται προσθήκη 10uL διαλύματος MTT σε κάθε βοθρίο, με τελικό όγκο 100uL (τελική συγκέντρωση 0,5mg/mL). Πραγματοποιείται επώαση με το MTT για 1, 2 και 3 ώρες στον κλίβανο, προσθήκη 100uL MTT Stop Solution ανά βοθρίο και επακόλουθη διάλυση των κρυστάλλων, υπό διαρκές πιπεττάρισμα με πολυπιπέττα, σε θερμοκρασία δωματίου υπό κανονικές συνθήκες. Στη συνέχεια, μετράται η απορρόφηση στα 595nm (μήκος κύματος απορρόφησης φορμαζάνης) και στα 750nm (μήκος κύματος αναφοράς προς «διόρθωση θορύβου») με φασματοφωτόμετρο (GENios).

Έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετά τη χορήγηση ουσιών στις καρκινικές σειρές

Ύστερα από τον καθορισμό του κατάλληλου αριθμού κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν, καθώς και του χρόνου επώασης του MTT, έπεται η χορήγηση ουσιών στα κύτταρα, όπως ακριβώς περιγράφηκε στην ενότητα 3.3., για 48 ώρες. Με το πέρας αυτών, προστίθεται σε κάθε βοθρίο το διάλυμα MTT, σε τελική συγκέντρωση 0,5mg/mL, γίνεται επώαση στην ενδεικνυόμενη ώρα, προσθήκη 100uL MTT Stop Solution/βοθρίο, διάλυση των σχηματιζόμενων κρυστάλλων και μέτρηση στα 595nm και 750nm στο φασματοφωτόμετρο, προς ανίχνευση του σήματος που δίνει η φορμαζάνη. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν σε κάθε ομάδα εκφράζονται ως:

Αριθμός κυττάρων (%): (OD_{595}-OD_{750} / OD_{595}-OD_{750} των κυττάρων της ομάδας ελέγχου) * 100%

Για τη μέθοδο του MTT χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

-Φιλτραρισμένο διάλυμα MTT σε ενέσιμο ύδωρ (wfi), συγκέντρωσης 5mg/mL. Η σκόνη MTT αγοράστηκε από την εταιρεία Sigma-Aldrich

-MTT Stop Solution (50mL): 45mL οξινισμένης με 0,1N HCl ισοπροπανόλης, 5mL Triton-X 100

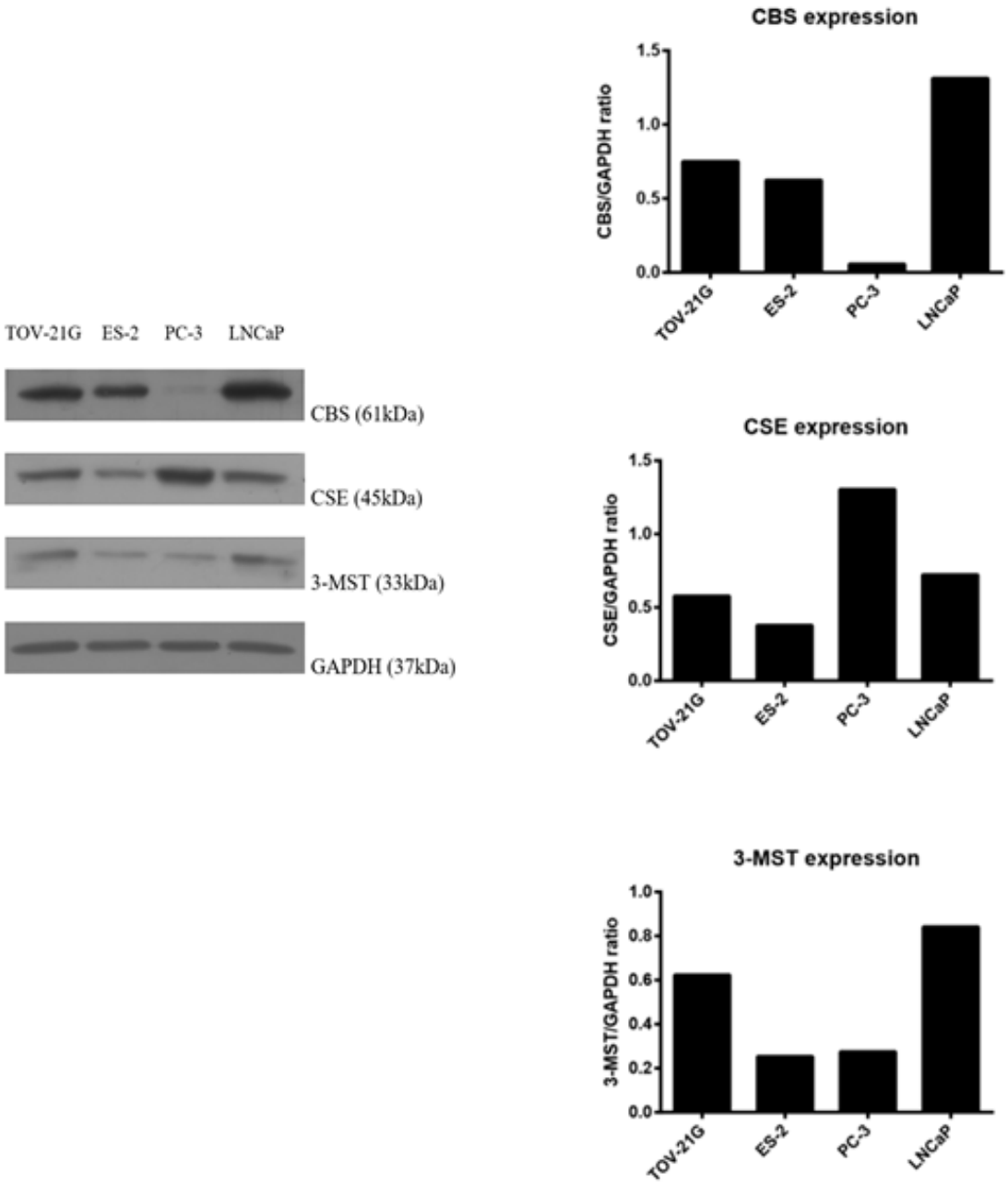
3.5. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM). Η στατιστική επεξεργασία τους γίνεται με τη μη παραμετρική μέθοδο Kruskal-Wallis, ενώ για τις πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται ως post-hoc δοκιμασία το Dunn's test. Τα σημεία *, **, *** και **** υποδηλώνουν επίπεδο σημαντικότητας $p<0,05$, 0,01, 0,001 και 0,0001 αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Για τιμή της μεταβλητής p μικρότερη από 0,05 η διαφορά θεωρείται στατιστικά σημαντική. Όλες οι αναλύσεις γίνονται μέσω του λογισμικού GraphPad Prism 6.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έλεγχος της έκφρασης των ενζύμων βιοσύνθεσης H_2S στις καρκινικές σειρές των ωοθηκών και του προστάτη

Ύστερα από εφαρμογή της τεχνικής Western blot σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τις καρκινικές σειρές των ωοθηκών TOV-21G και ES-2 και του προστάτη PC-3 και LNCaP, ελέγχθηκε η έκφραση των ενζύμων CBS, CSE και 3-MST.

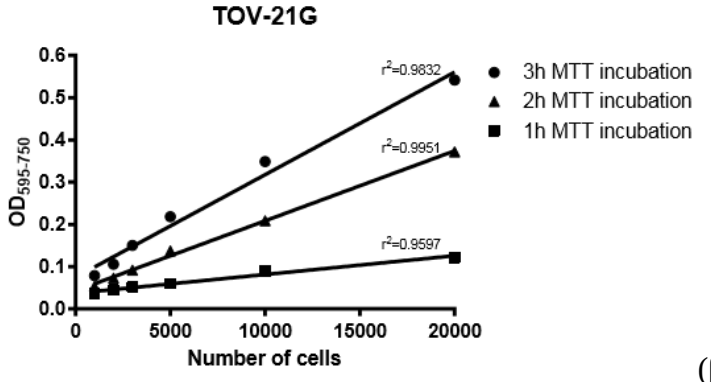


Εικόνα 20: Δείγματα Western blot των πρωτεϊνών CBS, CSE, 3-MST και GAPDH (αριστερά) και πυκνομέτρηση των αποτελεσμάτων που εκφράζονται ως ο λόγος της έκφρασης της κάθε πρωτεΐνης ως προς την έκφραση της GAPDH (δεξιά)

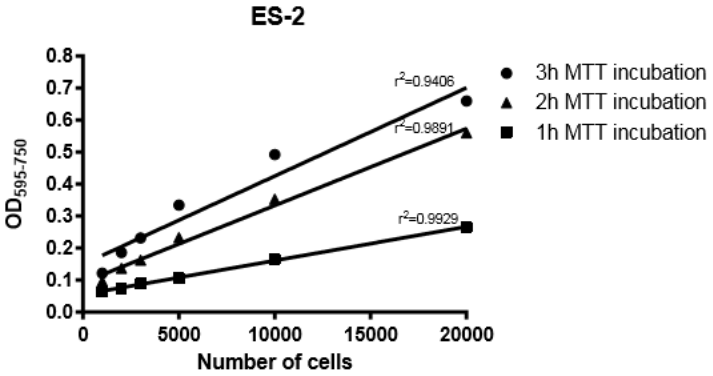
Διαπιστώνεται πως και τα τρία ένζυμα εκφράζονται σε όλες τις υπό μελέτη καρκινικές σειρές. Ωστόσο, όσον αφορά στο CBS, τα κύτταρα PC-3 φαίνεται να εκφράζουν την εν λόγω πρωτεΐνη σε πολύ μικρό βαθμό, ενώ τα κύτταρα LNCaP σε αρκετά μεγαλύτερο σε σύγκριση με τις άλλες σειρές. Η έκφραση του CSE είναι μεγαλύτερη στην προστατική καρκινική σειρά PC-3 σε σχέση με τις λοιπές, ενώ η έκφραση του 3-MST παρουσιάζεται μεγαλύτερη στις σειρές TOV-21G και LNCaP.

Προσδιορισμός των παραμέτρων για τη διεξαγωγή της μεθόδου MTT

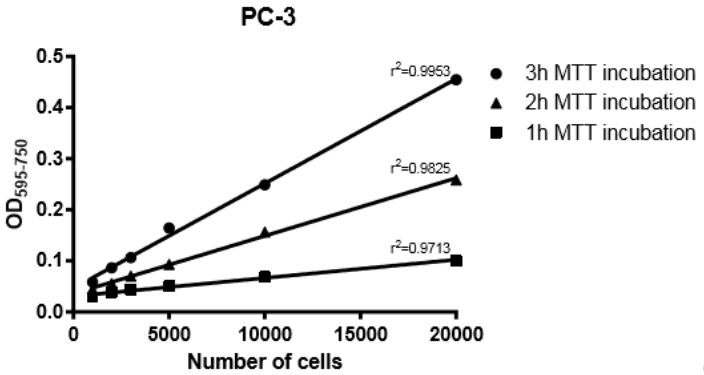
Έχοντας πραγματοποιήσει έλεγχο που επιβεβαίωσε την έκφραση των ενζύμων παραγωγής υδροθείου στις υπό μελέτη καρκινικές σειρές, προτού χρησιμοποιηθεί η μέθοδος MTT για τον έλεγχο της επίδρασης των αναστολέων των ενζύμων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, προσδιορίζεται ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν για τη διαδικασία, καθώς και ο χρόνος επώασης του MTT. Μετά από επώαση διαφορετικών συγκεντρώσεων κυττάρων για 1, 2 και 3 ώρες με διάλυμα MTT, τελικής συγκέντρωσης 0,5mg/mL, μετρήθηκαν οι οπτικές απορροφήσεις και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς για κάθε καρκινική σειρά.



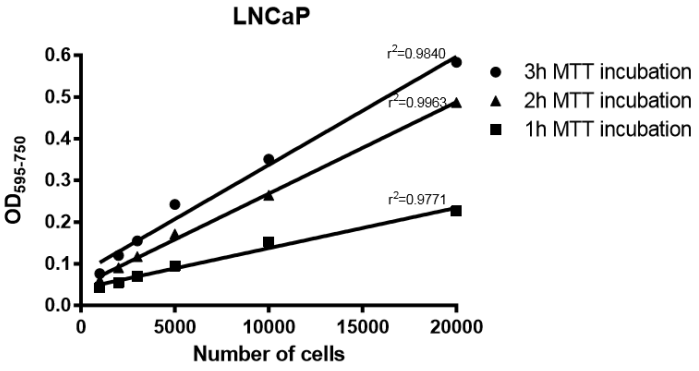
(α)



(β)



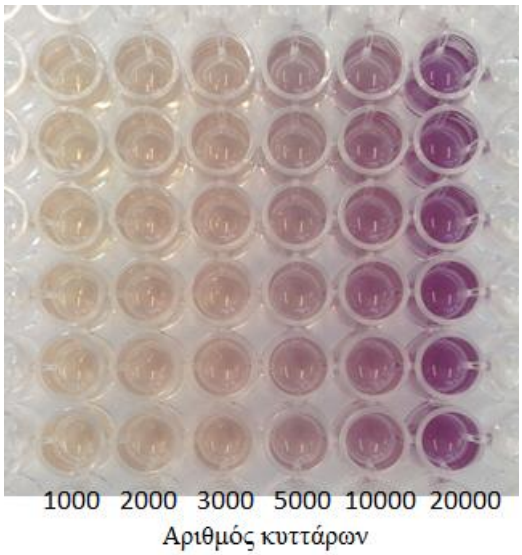
(γ)



(δ)

Εικόνα 21: Απεικόνιση της απορρόφησης (OD) σε συνάρτηση με τον αριθμό των κυττάρων, ύστερα από επώαση του MTT για 1, 2 και 3 ώρες, στις καρκινικές σειρές των ωοθηκών (α, β) και του προστάτη (γ, δ). Στον x άξονα απεικονίζεται ο αριθμός των κυττάρων/βοθρίο και στον y άξονα η αντίστοιχη απορρόφηση της φορμαζάνης στα 595nm, διορθωμένη ως προς το μήκος κύματος αναφοράς στα 750nm. Μέσω γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης προκύπτει η ευθεία που προσαρμόζεται καλύτερα στα δεδομένα. Κάθε σημείο εκφράζεται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM, n=6)

Ο αριθμός των κυττάρων πρέπει να εμπίπτει εντός του γραμμικού τμήματος της καμπύλης μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων, που θα λάβουν χώρα προς έλεγχο της επίδρασης των χορηγούμενων ουσιών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Δεδομένου πως οι χρόνοι διπλασιασμού για τις υπό μελέτη καρκινικές σειρές κυμαίνονται μεταξύ 24 και 36 ωρών και λαμβάνοντας υπόψιν πως η μετέπειτα χορήγηση των υπό έλεγχο ουσιών θα διαρκέσει 48 ώρες, επιλέγονται τα 4000 κύτταρα ως κατάλληλος αριθμός, σε χρόνο επώασης MTT 3 ώρες. Ο συγκεκριμένος χρόνος είναι ικανοποιητικός για το σχηματισμό φορμαζάνης και την ανάπτυξη χρώματος, που θα δώσει ένα αρκετά καλά ανιχνεύσιμο σήμα.



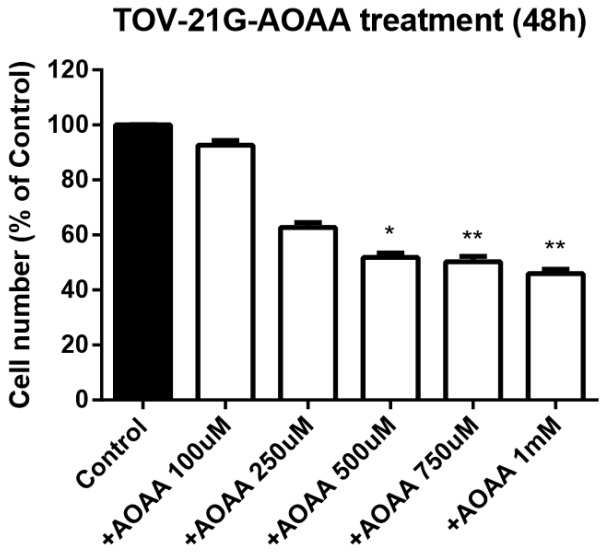
Εικόνα 22: Παραγωγή χρώματος κατά τη μέθοδο MTT, ανάλογα με τη συγκέντρωση των κυττάρων στα βοθρία πλάκας 96 μικροφρεατίων

Έλεγχος της επίδρασης που ασκεί επί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού η χορήγηση των αναστολέων των ενζύμων βιοσύνθεσης H_2S

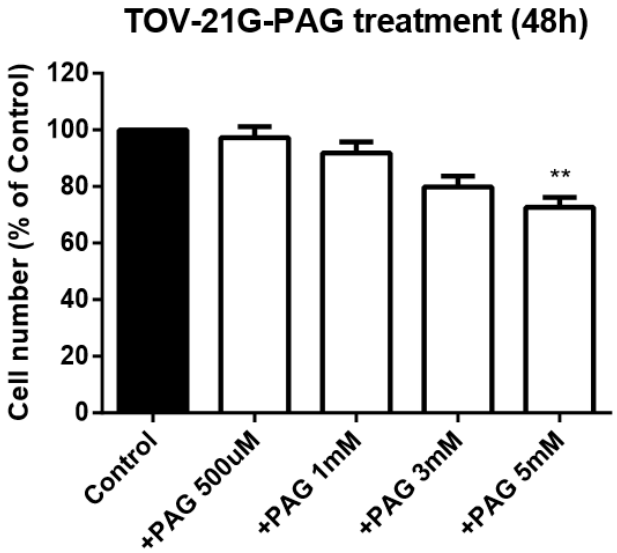
Στο στάδιο αυτό, αφότου έχει καθοριστεί ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν, καθώς επίσης και ο χρόνος επώασης του MTT, πραγματοποιήθηκε η χορήγηση των αναστολέων στις τέσσερις καρκινικές σειρές σε μικροπλάκα των 96 μικροφρεατίων για 48 ώρες στις επιλεγμένες, με βάση τη βιβλιογραφία, συγκεντρώσεις. Με το πέρας των ωρών αυτών, εξετάστηκε η επίδρασή τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με τη μέθοδο MTT. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ακολούθως ανά καρκινική σειρά.

TOV-21G

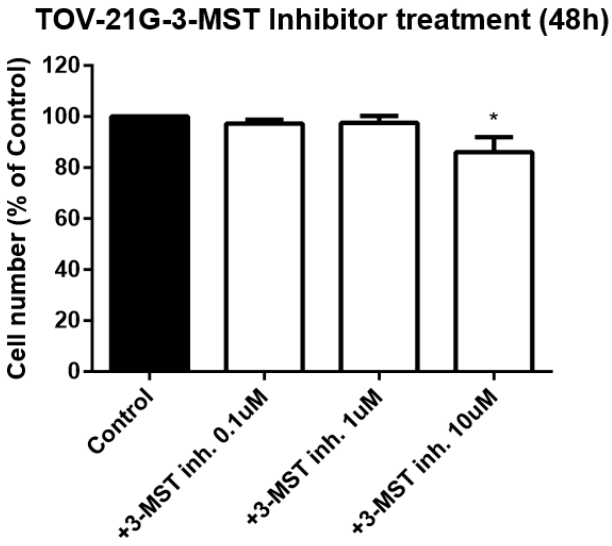
Ο αναστολέας των CBS/CSE, AOAA, είχε τη μεγαλύτερη επίδραση στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων TOV-21G, προκαλώντας μείωση μέχρι και 54,01% (±1,55%), με χορήγηση 1mM, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η μέση ανασταλτική του συγκέντρωση (IC_{50}) υπολογίστηκε στα 684,7uM. Οι άλλοι δύο αναστολείς επηρέασαν σε μικρότερο βαθμό τον πολλαπλασιασμό, με τον αναστολέα του CSE, PAG, να τον περιορίζει κατά 27,32% (±3,43%) στη μέγιστη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (5mM) και να εμφανίζει IC_{50}>>5mM. Ο αναστολέας του 3-MST φάνηκε να έχει τη μικρότερη αποτελεσματικότητα στην αναστολή του πολλαπλασιασμού, της τάξης του 14%, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση που επιλέχθηκε (10uM) χάριν βιβλιογραφίας.



(α)



(β)

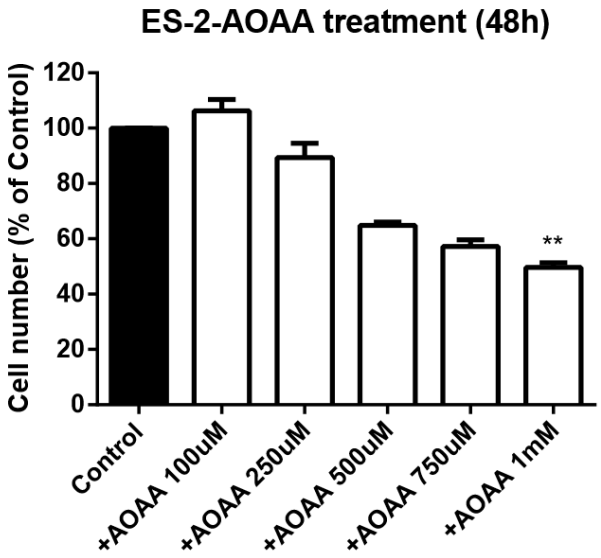


(γ)

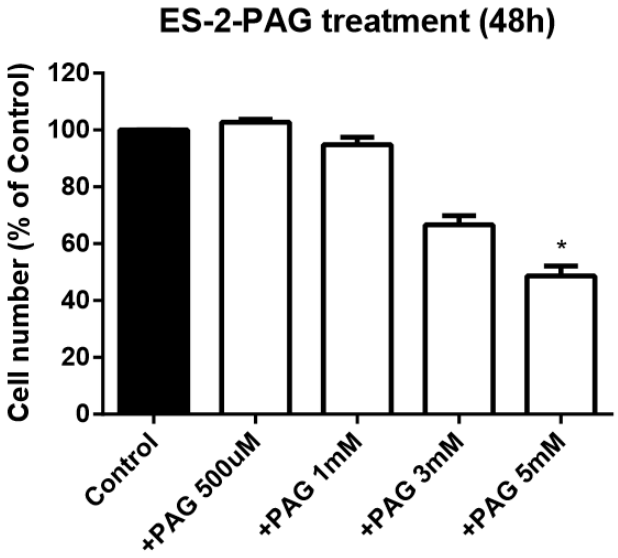
*Εικόνα 23: Η επίδραση των αναστολέων (α) AOAA, (β) PAG και (γ) Compound 3 στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών, της σειράς TOV-21G. Τα αποτελέσματα προέρχονται από τέσσερις ανεξάρτητες μετρήσεις (n=4) και εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM). Οι αστερίσκοι δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (*p<0,05, **p<0,01)*

ES-2

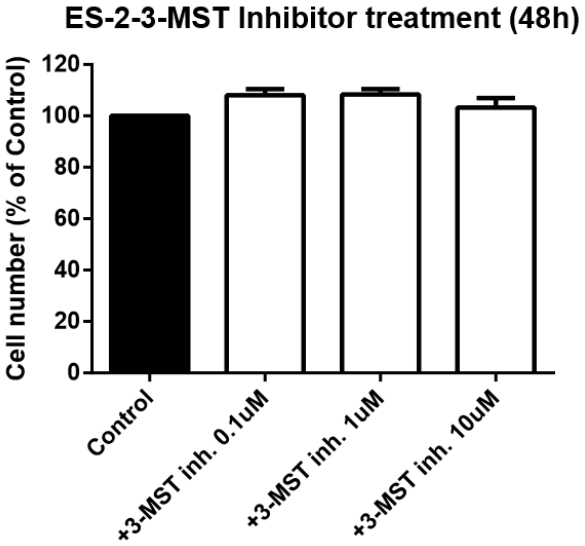
Στην καρκινική σειρά ES-2, το AOAA ανέστειλε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό, παρουσιάζοντας IC_{50} στα 906,3uM. Η επίδραση του PAG στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ήταν εμφανής σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, με σημαντική μείωση να εμφανίζεται με τη χρήση 5mM και τη μέση ανασταλτική συγκέντρωση να υπολογίζεται στα 4mM. Η αναστολή του 3-MST δε φάνηκε να έχει καμία σημαντική επίδραση στον περιορισμό του πολλαπλασιασμού της συγκεκριμένης σειράς.



(α)



(β)



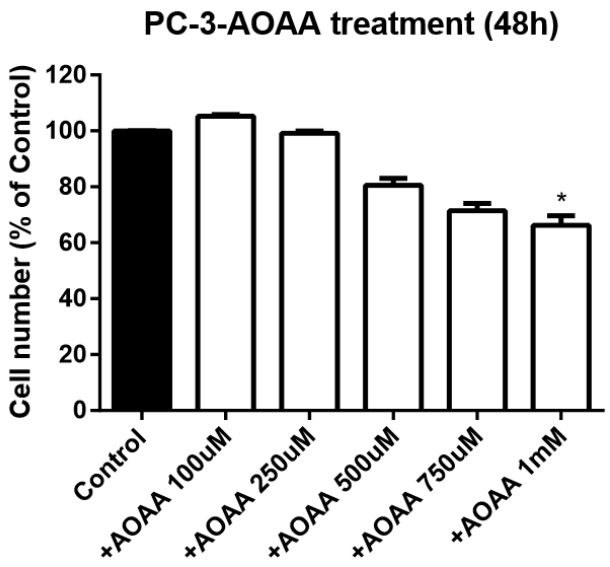
(γ)

*Εικόνα 24: Η επίδραση των αναστολέων (α) AOAA, (β) PAG και (γ) Compound 3 στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών, της σειράς ES-2. Τα αποτελέσματα προέρχονται από τέσσερις ανεξάρτητες μετρήσεις (n=4) και εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM). Οι αστερίσκοι δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (*p<0,05, **p<0,01)*

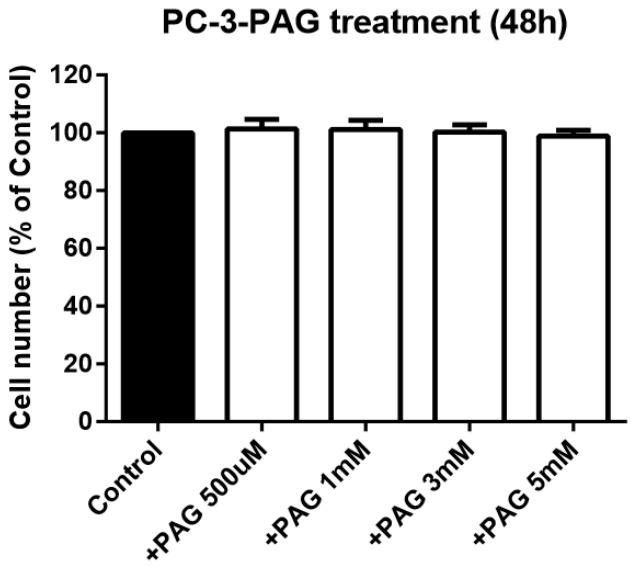
<u>PC-3</u>

Η χρήση του αναστολέα AOAA στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη PC-3, είχε μικρό αντίκτυπο στον πολλαπλασιασμό τους, με σημαντική μείωση να παρατηρείται με τη χορήγηση υψηλής συγκέντρωσης, της τάξης του 1mM, κατά 33,7% (±3,39%), σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η χορήγηση των

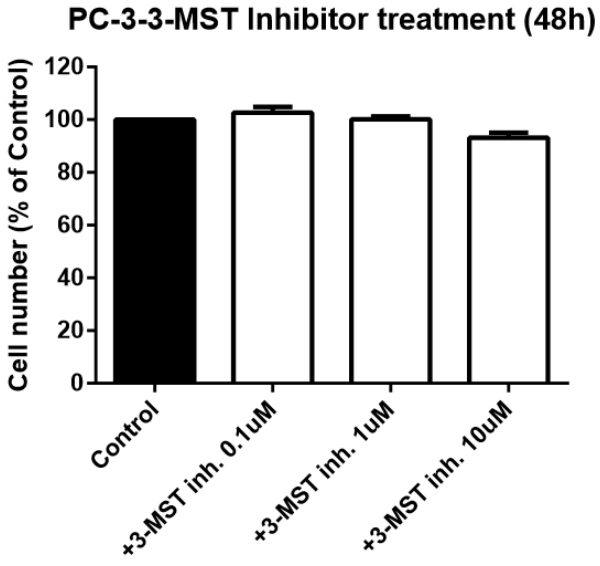
αναστολέων των CSE και 3-MST δεν είχε καμία σημαντική αποτελεσματικότητα στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων.



(α)



(β)

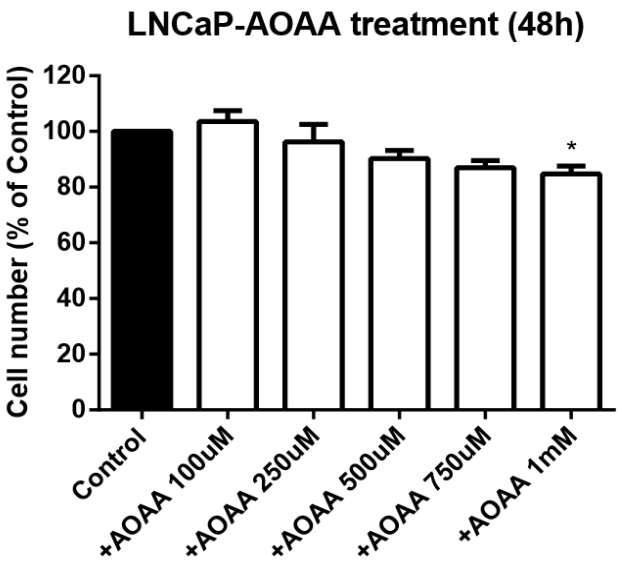


(γ)

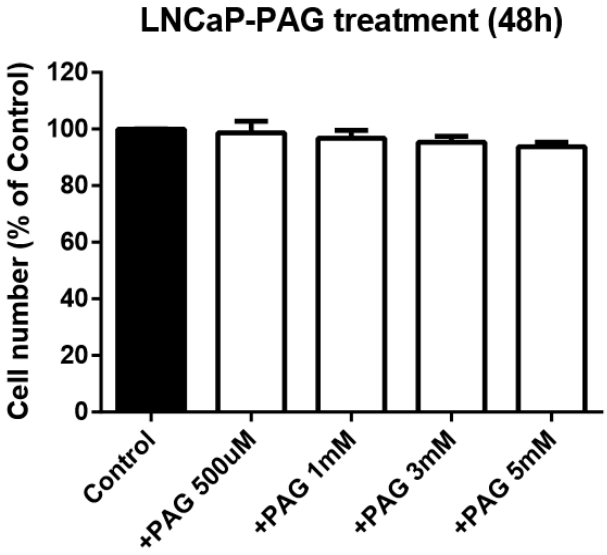
*Εικόνα 25: Η επίδραση των αναστολέων (α) AOAA, (β) PAG και (γ) Compound 3 στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, της σειράς PC-3. Τα αποτελέσματα προέρχονται από τέσσερις ανεξάρτητες μετρήσεις (n=4) και εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM). Οι αστερίσκοι δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (*p<0,05)*

LNCaP

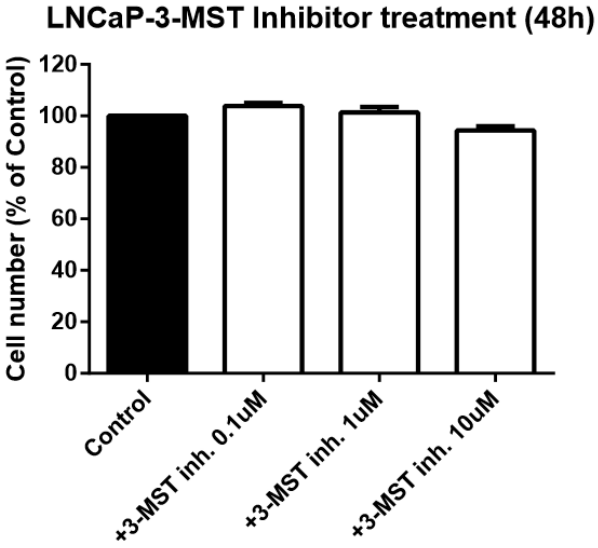
Στα καρκινικά προστατικά κύτταρα LNCaP, η αποτελεσματικότητα του AOAA έναντι του πολλαπλασιασμού ήταν ακόμα μικρότερη σε σύγκριση με την προηγούμενη προστατική σειρά, με τη μεγαλύτερη σημαντική αναστολή να είναι της τάξης του 15% με τη χρήση 1mM. Στο ίδιο μοτίβο με πριν, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική επίδραση στην αναστολή του πολλαπλασιασμού με τη χορήγηση των αναστολέων των λοιπών δύο ενζύμων.



(α)



(β)



(γ)

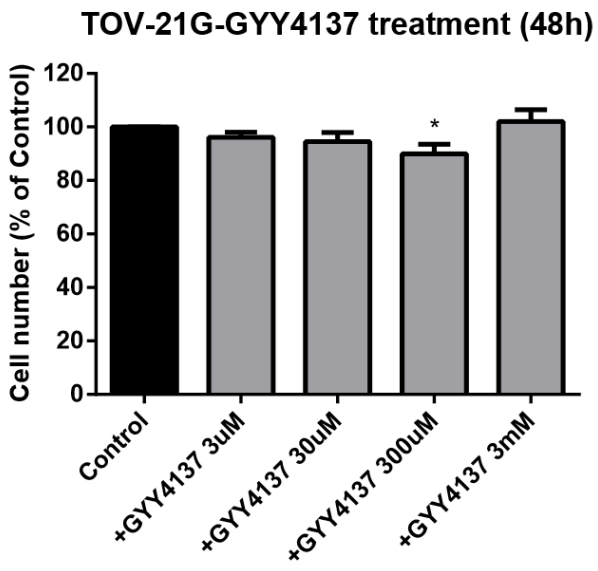
Εικόνα 26: Η επίδραση των αναστολέων (α) AOAA, (β) PAG και (γ) Compound 3 στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, της σειράς LNCaP. Τα

*αποτελέσματα προέρχονται από τέσσερις ανεξάρτητες μετρήσεις (n=4) και εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM). Οι αστερίσκοι δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (*p<0,05)*

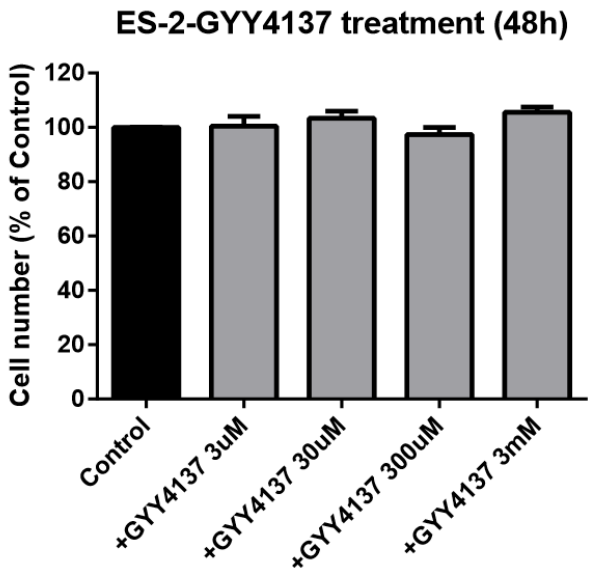
Αναστροφή της δράσης του αναστολέα AOAA με την εξωγενή χορήγηση H_2S

Αξιολογώντας τα ανωτέρω πειραματικά δεδομένα, επιλέχθηκε το AOAA, που αναστέλλει το CBS έχοντας ταυτόχρονα ανασταλτική δράση και επί του CSE, ως η ουσία που έδωσε τα πλέον ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Δεδομένου του περίπλοκου φαρμακολογικού προφίλ της ένωσης αυτής, θελήσαμε να ελέγξουμε κατά πόσο το αποτέλεσμα που προκύπτει οφείλεται στην αναστολή της βιοσύνθεσης του H_2S και όχι σε κάποια δευτερεύουσα δράση. Για το σκοπό αυτό, χορηγήθηκε ένας δότης H_2S, το GYY4137, ταυτόχρονα με τον αναστολέα, προκειμένου να διαπιστωθεί αν είναι δυνατή η αναστροφή της ανασταλτικής επί του πολλαπλασιασμού δράσης του AOAA.

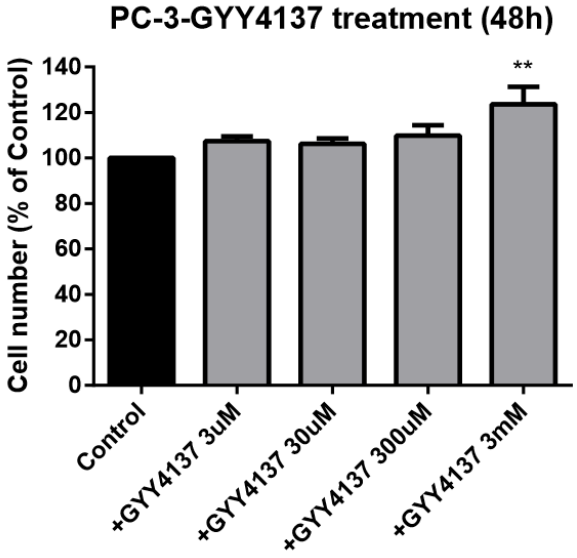
Για το συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκαν συγκεντρώσεις του AOAA που είχαν κάποια εμφανή βιολογική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με βάση τα προηγηθέντα πειράματα. Συνεπώς, χρησιμοποιήθηκαν 500uM AOAA για τις καρκινικές κυτταρικές σειρές των ωοθηκών TOV-21G και ES-2, 750uM AOAA για τα προστατικά καρκινικά κύτταρα PC-3 και, τέλος, 1mM AOAA για τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη της σειράς LNCaP. Ταυτόχρονα, έγινε έλεγχος της επίδρασης διαφόρων συγκεντρώσεων GYY4137 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, προκειμένου να γίνει επιλογή της δόσης που θα χρησιμοποιηθεί για την αναστροφή της δράσης του AOAA. Όπως και στα προηγούμενα πειράματα με τους αναστολείς, το GYY4137 χορηγήθηκε σε 4000 κύτταρα/βοθρίο σε πλάκα 96 μικροφρεατίων για 48 ώρες και εφαρμόστηκε η μέθοδος του MTT προς έλεγχο της επίδρασής του.



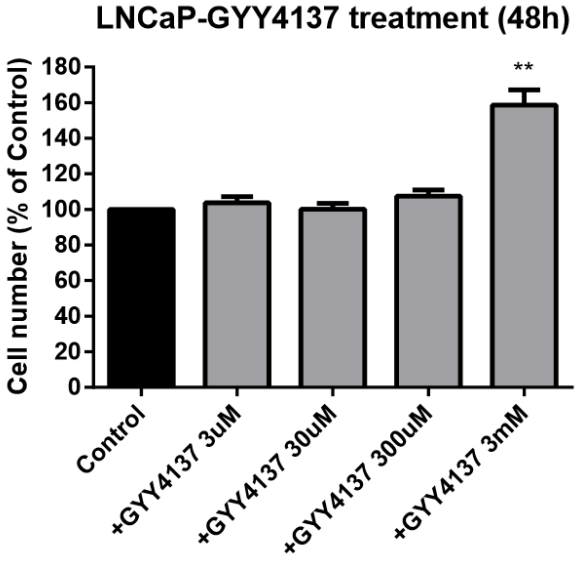
(α)



(β)



(γ)



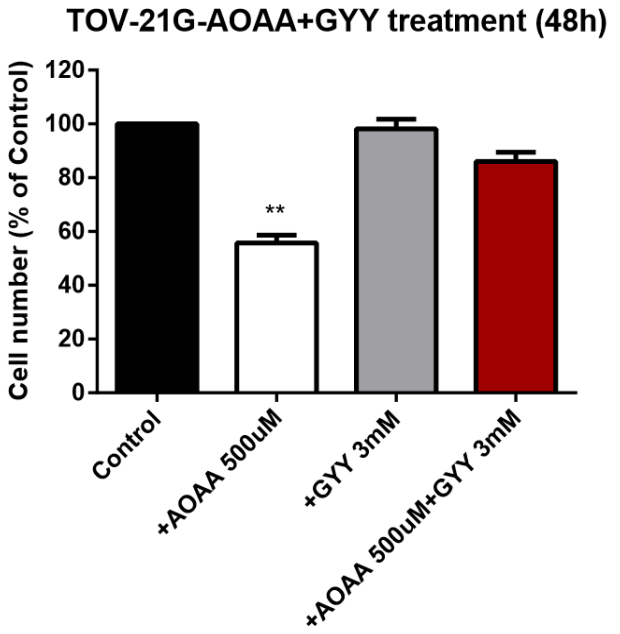
(δ)

*Εικόνα 27: Η επίδραση του δότη H_2S, GYY4137, στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (α) TOV-21G, (β) ES-2, (γ) PC-3 και (δ) LNCaP. Τα αποτελέσματα προέρχονται από τέσσερις ανεξάρτητες μετρήσεις (n=4) και εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM). Οι αστερίσκοι δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (*p<0,05, **p<0,01)*

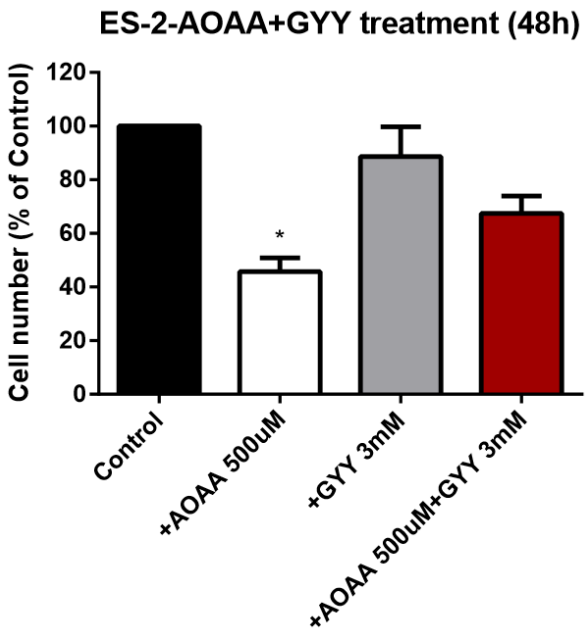
Στις καρκινικές σειρές των ωοθηκών, το GYY4137 δεν είχε μεγάλη ανασταλτική ή διεγερτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, κάτι που συνεπάγεται πως το ενδογενές υδρόθειο είναι επαρκές για τον πολλαπλασιασμό των συγκεκριμένων σειρών, δεδομένου πως επιπρόσθετη ποσότητα δεν έχει κάποια περαιτέρω δράση. Αντιθέτως, και στις δύο προστατικές σειρές, το GYY4137, σε συγκέντρωση 3mM, επάγει σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Λαμβάνοντας αυτά υπόψιν,

επιλέγεται η συγκέντρωση των 3mM GYY4137 για τα πειράματα αναστροφής της δράσης του AOAA σε όλες τις υπό μελέτη καρκινικές σειρές.

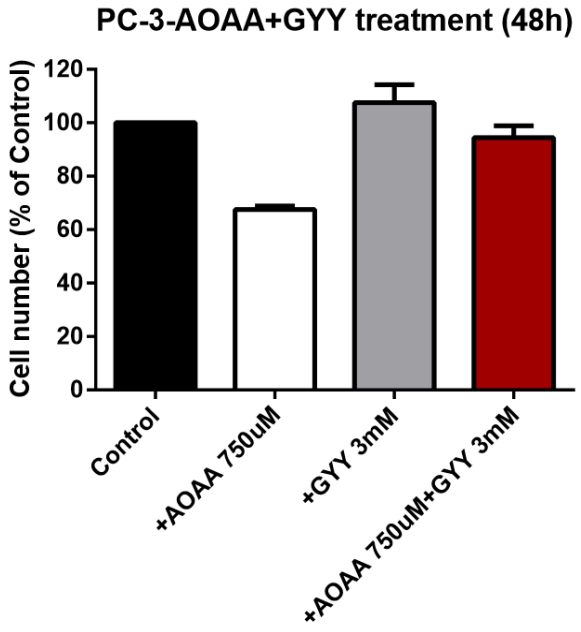
Σε επόμενο βήμα, λοιπόν, γίνεται ταυτόχρονη χορήγηση AOAA και GYY4137 στα καρκινικά κύτταρα σε βοθρία πλάκας 96 μικροφρεατίων (4000 κύτταρα/βοθρίο) για 48 ώρες και ελέγχεται με τη μέθοδο MTT το εάν η δράση του αναστολέα αναστρέφεται από την εξωγενή χορήγηση H_2S.



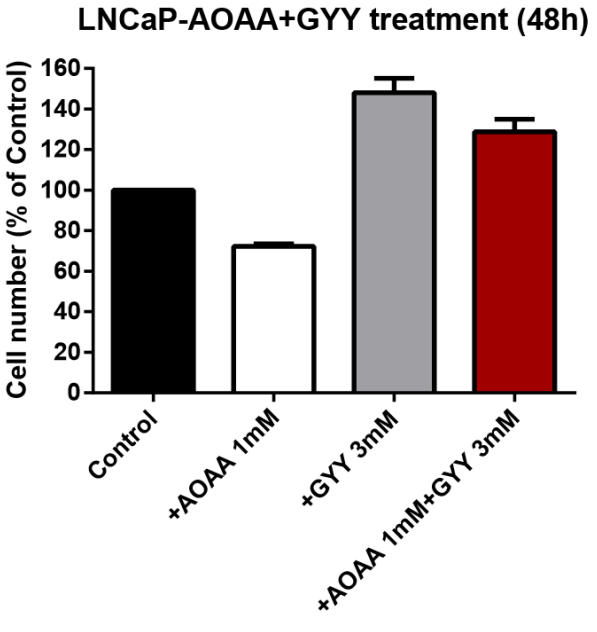
(α)



(β)



(γ)



(δ)

Εικόνα 28: Η επίδραση της ταυτόχρονης χορήγησης του αναστολέα AOAA και του δότη GYY4137 στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (α) TOV-21G, (β) ES-2, (γ)

*PC-3 και (δ) LNCaP. Τα αποτελέσματα προέρχονται από τέσσερις ανεξάρτητες μετρήσεις (n=4) και εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM). Οι αστερίσκοι δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (*p<0,05, **p<0,01)*

Στις κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών, ο δότης υδροθείου αναστρέφει σημαντικά την αναστολή που παρατηρείται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων λόγω χορήγησης του AOAA, γεγονός που επιβεβαιώνει πως, εν μέρει, η δράση του AOAA στον περιορισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού οφείλεται στην αναστολή της βιοσύνθεσης H_2S. Στα κύτταρα του καρκίνου του προστάτη, παρατηρείται ακριβώς η ίδια τάση, με το GYY4137 να αναστρέφει την ανασταλτική, επί της ανάπτυξης των κυττάρων, δράση του AOAA. Επιτρέπεται, έτσι, να εξάγουμε το συμπέρασμα πως η αναστολή της ενδογενούς παραγωγής του διαβιβαστή ευθύνεται, τουλάχιστον μερικώς, για τη μείωση που παρατηρείται στον πολλαπλασιασμό των προστατικών κυττάρων.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έρχεται να συμπληρώσει και να επεκτείνει τις μελέτες γύρω από τη διερεύνηση του ρόλου του ενδογενούς υδροθείου στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων. Το αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης αφορά σε καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών (TOV-21G και ES-2) και του προστάτη (PC-3 και LNCaP), όπου αρχικά ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε η έκφραση των τριών ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του υδροθείου (H_2S), της β-συνθάσης της κυσταθειονίνης (CBS), της γ-λυάσης της κυσταθειονίνης (CSE) και της 3-μερκαπτοπυροσταφυλικής θειοτρανσφεράσης (3-MST). Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιήθηκε χορήγηση αναστολέων των ενζύμων αυτών στις υπό μελέτη καρκινικές σειρές και έλεγχος της επίδρασής τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με τη μέθοδο MTT, μετά το πέρας 48 ωρών.

Όσον αφορά στον καρκίνο των ωοθηκών, ο αναστολέας του CBS, AOAA, που παράλληλα ασκεί και ανασταλτική δράση στο CSE, φάνηκε να έχει τη μεγαλύτερη επίδραση επί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, προκαλώντας μείωση κατά 50%, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, σε μέσες συγκεντρώσεις (IC_{50}) 684,7uM και 906,3uM, στις σειρές TOV-21G και ES-2 αντίστοιχα. Ο αναστολέας του CSE, PAG, αποδείχθηκε πως έχει μικρότερη αποτελεσματικότητα, καθώς περιορίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε μικρότερο βαθμό και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, σε σύγκριση με τον αναστολέα AOAA. Ομοίως, ο αναστολέας του 3-MST δεν έδειξε να ασκεί βιολογικά σημαντική επίδραση στην αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών. Έχοντας, λοιπόν, καταλήξει στο συμπέρασμα πως ο αναστολέας AOAA είναι ο πλέον αποτελεσματικός στον περιορισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, έγινε έλεγχος του κατά πόσο η ανασταλτική του δράση μεσολαβείται δια αναστολής της παραγωγής του υδροθείου. Πράγματι, μέσω ταυτόχρονης χορήγησης του δότη H_2S, GYY4137, αναστράφηκε σημαντικά η ανασταλτική επί του πολλαπλασιασμού δράση του AOAA, επιβεβαιώνοντας πως, εν μέρει, η αναστολή της βιοσύνθεσης του αέριου διαβιβαστή είναι αυτή που ευθύνεται για την παρατηρούμενη μείωση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Εξάγουμε, λοιπόν, το συμπέρασμα πως το ένζυμο CBS διαδραματίζει τον πλέον καίριο ρόλο στα πλαίσια του καρκίνου των ωοθηκών, σε σύγκριση με τα ένζυμα CSE και 3-MST. Ωστόσο, πρέπει να ληφθεί υπόψιν, πως μέρος της δράσης του AOAA είναι πιθανό να αντιστοιχεί και σε αναστολή του ενζύμου CSE.

Το εύρημα αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγηθείσες μελέτες, όπως αυτή των Bhattacharyya et al., οι οποίοι, ελέγχοντας την έκφραση των ενζύμων παραγωγής υδροθείου και διαπιστώνοντας μεγαλύτερη έκφραση του CBS στην πλειονότητα των

υπό μελέτη καρκινικών σειρών των ωοθηκών, επικεντρώθηκαν στη διερεύνηση του μονοπατιού CBS/H_2S[106]. Μέσω φαρμακολογικής αναστολής ή αποσιώπησης του CBS, παρατήρησαν μείωση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε καρκίνο των ωοθηκών, η οποία αναστρέφεται, μερικώς, μετά τη χορήγηση δότη υδροθείου. Μάλιστα, συσχέτισαν την αναστολή αυτή με μεταβολή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, διαταραχή της μιτοχονδριακής λειτουργίας και ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών[106]. Η παρούσα εργασία αναγνωρίζει το CBS ως το βασικότερο από τα τρία ένζυμα, όσον αφορά στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της ωοθήκης σε ακόμα δύο σειρές διαυγοκυτταρικού καρκινώματος που δεν είχαν ελεγχθεί, υπολογίζοντας τη μέση ανασταλτική συγκέντρωση του αναστολέα του και συγκρίνοντάς το, παράλληλα, με τα υπόλοιπα δύο ένζυμα ενδογενούς βιοσύνθεσης H_2S.

Όσον αφορά στις καρκινικές σειρές του προστάτη οι παρατηρήσεις μας είναι παρόμοιες. Περισσότερο αποτελεσματικός στον περιορισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αποδείχθηκε ο αναστολέας AOAA, με τους υπόλοιπους αναστολείς να μην εμφανίζουν καμία σημαντική επίδραση στη μείωση της ανάπτυξης των κυττάρων. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις του AOAA στις οποίες παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή του πολλαπλασιασμού στις συγκεκριμένες σειρές ήταν κατά πολύ μεγαλύτερες σε σύγκριση με τα κύτταρα των ωοθηκών, ενώ σε καμία από τις χρησιμοποιούμενες δόσεις το AOAA δεν κατόρθωσε να περιορίσει στο μισό τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, εν αντιθέσει με πριν. Στη μέγιστη δόση που χορηγήθηκε (1mM), η προκληθείσα αναστολή του πολλαπλασιασμού στη σειρά PC-3 ήταν της τάξης του 35%, σε σύγκριση με ένα ποσοστό 15% στη σειρά LNCaP. Ομοίως με πριν, έτσι και στην περίπτωση των κυττάρων αυτών, χορήγηση του δότη H_2S ανέστρεψε, εν μέρει, τη δράση του AOAA, επιβεβαιώνοντας πως η αναστολή της ενδογενούς παραγωγής του διαβιβαστή ευθύνεται, μερικώς, για τη μείωση που παρατηρείται στον πολλαπλασιασμό των προστατικών κυττάρων.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν στα κύτταρα PC-3 συμβαδίζουν με την παρατήρηση ότι η έκφραση του CBS δεν είναι τόσο υψηλή, ώστε ο αναστολέας του να έχει σημαντικές βιολογικές επιδράσεις. Δυστυχώς, η βιβλιογραφία γύρω από το υδρόθειο και τον καρκίνο του προστάτη δεν είναι εκτενής. Οι Pei et al. έχουν διαπιστώσει πως το CSE εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε κύτταρα PC-3 και ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό της παραγωγής υδροθείου σε προστατικούς ιστούς. Χορηγώντας δότες υδροθείου, αλλά και κάνοντας υπερέκφραση του ενζύμου CSE, παρατήρησαν μείωση στη βιωσιμότητα των κυττάρων PC-3[162]. Λαμβάνοντας αυτό υπόψιν, φαίνεται πως η επαγωγή, παρά η αναστολή, του CSE θα μπορούσε να εμφανίσει ευεργετικά αποτελέσματα κατά του προστατικού καρκίνου, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη συγκεκριμένη εργασία, όπου η χορήγηση PAG δεν είχε κανένα σημαντικό

αντίκτυπο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PC-3. Όσον αφορά στην αναστολή επί του πολλαπλασιασμού που παρατηρήθηκε μέσω του AOAA, αφενός δεν ήταν σε μεγάλο ποσοστό, όσο στον καρκίνο των ωοθηκών, για να δικαιολογήσει εκτενέστερο πειραματισμό και αφετέρου ήταν διακριτή σε μεγάλες συγκεντρώσεις, οι οποίες αυξάνουν την πιθανότητα εμπλοκής μηχανισμών που δε σχετίζονται με το υδρόθειο, δεδομένου πως και η έκφραση του CBS, όπως προαναφέρθηκε, είναι μικρή στη σειρά PC-3.

Όσον αφορά στα κύτταρα LNCaP, αυτά αποτελούν ανδρογονοευαίσθητη καρκινική σειρά, γεγονός που συνεπάγεται πως ο ανδρογονικός υποδοχέας (AR) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Οι Zhao et al. έχουν διαπιστώσει μειωμένη έκφραση του CSE, αλλά όχι του CBS, σε καρκινικούς προστατικούς ιστούς και κύτταρα LNCaP ανθεκτικά σε αντιανδρογονική θεραπεία[117]. Έχουν αποδείξει, επίσης, πως αποσιώπηση του CSE έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα LNCaP να μην ανταποκρίνονται αποτελεσματικά στην αντικαρκινική θεραπεία, κάτι που επιβεβαιώνεται και από την εκ νέου ανταπόκριση ανθεκτικών LNCaP κυττάρων σε αντιανδρογονοθεραπεία, μετά από υπερέκφραση του CSE. Παράλληλα,, θα άξιζε να αναφερθεί πως οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν και μεγαλύτερο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε προστατικό ιστό ποντικών μεγάλης ηλικίας, όπου είχε αποσιωπηθεί το CSE (CSE knock-out)[117].

Έχοντας υπόψιν τα ανωτέρω, παράλληλα με το εύρημα πως το υδρόθειο μέσω σουλφυδρυλίωσης αναστέλλει το διμερισμό και τη δραστηριότητα του ανδρογονικού υποδοχέα[117], μπορεί κανείς να υποθέσει πως το CSE είναι το ένζυμο με πιο κυρίαρχο ρόλο στον καρκίνο του προστάτη. Μάλιστα, και στα ανδρογονοευαίσθητα προστατικά κύτταρα, η ενίσχυση, και όχι η αναστολή, του μονοπατιού CSE/H_2S θα μπορούσε δυνητικά να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτική προσέγγιση στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την παρούσα μελέτη μας, όπου οι αναστολείς των ενζύμων παραγωγής H_2S δεν είχαν μεγάλη επίδραση επί του πολλαπλασιασμού των κυττάρων LNCaP, ενώ η επίδραση που φάνηκε να έχει μονάχα το AOAA ήταν σε πολύ μικρό ποσοστό και σε υψηλές συγκεντρώσεις, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα να μεσολαβούν και άλλοι μηχανισμοί. Αντιθέτως, είναι αρκετές οι βιβλιογραφικές αναφορές που επιβεβαιώνουν, τόσο in vitro, όσο και in vivo, την αποτελεσματικότητα δοτών υδροθείου στην αναστολή του πολλαπλασιασμού κυττάρων του προστάτη[161].

Με βάση τα παραπάνω, στα πλαίσια της συνέχισης της εν λόγω μελέτης, ενδείκνυται η ταυτόχρονη χορήγηση των αναστολέων στα καρκινικά κύτταρα in vitro προς έλεγχο της επίδρασης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και η αποσιώπηση των τριών ενζύμων, παράλληλα με ταυτόχρονη χορήγηση φαρμακολογικών αναστολέων τους στα κύτταρα, ώστε να διαπιστωθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια πού οφείλεται η

ανασταλτική δράση που παρατηρείται. Επιπροσθέτως, μένει να γίνουν μελέτες γύρω από την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων δοτών H_2S και για διαφορετικά χρονικά διαστήματα στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, προς διερεύνηση και του ρόλου του εξωγενούς υδροθείου. Εφόσον κάποια από αυτά τα αποτελέσματα φανούν ενθαρρυντικά, προτείνεται η διερεύνηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται, καθώς και η επέκταση των μελετών in vivo, προς εξαγωγή συμπερασμάτων αναφορικά με το ρόλο τόσο του ενδογενούς, όσο και του εξωγενούς υδροθείου σε ζωντανούς οργανισμούς, δεδομένης της μεγαλύτερης πολυπλοκότητας που συνοδεύει τα εν λόγω μοντέλα.

Συμπερασματικά, η διερεύνηση του ρόλου του H_2S στον καρκίνο αποτελεί ένα περίπλοκο και πολύπλευρο ζήτημα. Ο διφασικός του χαρακτήρας, που έγκειται στο ότι τόσο η αναστολή των ενζύμων βιοσύνθεσής του, όσο και η χορήγηση δοτών του σε υψηλές συγκεντρώσεις, μπορεί να έχει ευεργετικά αποτελέσματα κατά του καρκίνου και να περιορίσει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, συσχετίζεται με πολλές παραμέτρους, με πρωταρχική τον τύπο του καρκίνου που μελετάται. Παραδείγματος χάριν, η αναστολή της ενδογενούς παραγωγής H_2S μέσω του CBS μπορεί να επιφέρει θετικά αποτελέσματα, μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου[90] και των ωοθηκών[106], αλλά στο μελάνωμα η αποσιώπηση και των τριών ενζύμων, που εμπλέκονται στην παραγωγή H_2S, δεν έχει κανένα αντίκτυπο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό[113], ενώ σε μοντέλο γλοιώματος η αποσιώπηση του CBS επιταχύνει την κυτταρική ανάπτυξη[137].

Σε γενικότερο πλαίσιο, οι αναστολείς των ενζύμων της ενδογενούς παραγωγής υδροθείου πρέπει να εξετάζονται ως θεραπευτική προσέγγιση στον καρκίνο μόνο υπό την προϋπόθεση πως ο όγκος εκφράζει υψηλά επίπεδα των ενζύμων παραγωγής H_2S, παράγει σε μεγάλες ποσότητες τον αέριο διαβιβαστή προς ενίσχυση του δικού του πολλαπλασιασμού, της αγγειογένεσής του και της άμυνάς του και, τέλος, ο διαβιβαστής δεν αποτελεί βασική γραμμή άμυνας του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος έναντι του καρκίνου[105]. Ομοίως, πρέπει να έχει κανείς υπόψιν πως η χορήγηση δοτών H_2S μπορεί σε πολλές περιπτώσεις να είναι τοξική για τον καρκίνο, υπό την προϋπόθεση, όμως, πως ξεπερνάται κάποιο συγκεκριμένο όριο στα επίπεδα του H_2S.

Άλλη μία παράμετρος που πρέπει να εκτιμάται, είναι τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται σε προκλινικό επίπεδο, τόσο στην αναστολή της βιοσύνθεσης του υδροθείου, όσο και στην εξωγενή χορήγησή του μέσω δοτών. Αναφορικά με τους δότες, πρέπει να δίνεται βάση στο ρυθμό με τον οποίο απελευθερώνουν υδρόθειο, καθώς οφείλουν να μιμούνται, μέχρι ένα βαθμό, τόσο το ρυθμό, όσο και την ποσότητα του διαβιβαστή στην οποία εκτίθεται υπό φυσιολογικές συνθήκες το βιολογικό

σύστημα του ανθρώπου. Επιπροσθέτως, διαφορετικοί δότες ενεργοποιούν διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια, γι' αυτό και συνίσταται η χρήση παραπάνω του ενός δότη κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων[131]. Βασικό μειονέκτημα αποτελεί η έλλειψη δοτών που στοχεύουν ειδικά τα καρκινικά κύτταρα και βιοενεργοποιούνται εντός του όγκου-πιθανώς εκμεταλλευόμενοι το διαφορετικό pH του. Με τους περισσότερους από τους υπάρχοντες δότες, επιτυγχάνονται υψηλές συγκεντρώσεις υδροθείου και σε μη καρκινικούς ιστούς, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών λόγω της τοξικής δράσης του διαβιβαστή, κυρίως μέσω αναστολής της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Τέλος, ακόμα ένα ζήτημα που προκύπτει σχετικά με τους δότες, είναι τα «τμήματα» του μορίου που απομένουν μετά την απελευθέρωση του διαβιβαστή. Τόσο τα επίπεδά τους, όσο και ο βιολογικός τους ρόλος, πρέπει να διευκρινίζονται ή να λαμβάνονται υπόψιν, μέσω της χρήσης, παραδείγματος χάριν, κατάλληλων ομάδων ελέγχου.

Όσον αφορά στους αναστολείς της βιοσύνθεσης H_2S, εκλείπουν δύο σημαντικά χαρακτηριστικά στους ήδη υπάρχοντες. Το ένα είναι η επαρκής δραστικότητα. Είναι επιθυμητό, in vitro και in vivo, τα μόρια να είναι αποτελεσματικά σε μικρές συγκεντρώσεις, καθώς όσο αυξάνεται η δόση τόσο αυξάνεται και η πιθανότητα εμφάνισης επιπρόσθετων μη επιθυμητών στόχων. Στο πεδίο αυτό γίνονται έρευνες, με τις προσπάθειες να επικεντρώνονται στην ανάπτυξη προφαρμάκων των αναστολέων που, παραδείγματος χάριν, θα είναι πιο λιπόφιλα από τα πρότυπα μόρια και θα διαπερνούν ευκολότερα τις μεμβράνες. Το δεύτερο χαρακτηριστικό έχει να κάνει με την ειδικότητα· ιδανικά ο εκάστοτε αναστολέας πρέπει να στοχεύει ένα και μόνο ένζυμο παραγωγής υδροθείου, να μην επηρεάζει την παραγωγή του διαβιβαστή μέσω των άλλων οδών και να μην έχει και περαιτέρω φαρμακολογικούς στόχους, όπως συμβαίνει με το AOAA και το PAG[131].

Επόμενη παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν, είναι οι ενδεχόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες που ελλοχεύουν πίσω από την αναστολή των ενζύμων ενδογενούς βιοσύνθεσης υδροθείου. Δεδομένου πως το CBS είναι το κύριο ένζυμο που εμπλέκεται στη βιολογική αποικοδόμηση της ομοκυστεΐνης, η χρόνια αναστολή του αναμένεται να προκαλέσει υπερομοκυστεϊναιμία, σημαντικό παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση καρδιαγγειακών προβλημάτων. Η μέτρηση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης στην κυκλοφορία θα μπορούσε δυνητικά να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης, για την εκτίμηση της έκτασης της αναστολής του CBS, αλλά και για την αξιολόγηση της συμμόρφωσης του ασθενούς. Όσον αφορά στο CSE, δεδομένου ότι είναι το κύριο ένζυμο παραγωγής υδροθείου στο καρδιαγγειακό σύστημα, η αναστολή του είναι πιθανό να προκαλέσει σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες σε κλινικό επίπεδο[130].

Επιπροσθέτως, καίριας σημασίας κρίνεται το γεγονός πως οι αέριοι διαβιβαστές δεν ασκούν τις δράσεις τους μεμονωμένα, αλλά σε συνεργασία ο ένας με τον άλλον. Διευκρινίζοντας τα σηματοδοτικά μονοπάτια και τις συνεργιστικές δράσεις μεταξύ τους, αναμένεται να γίνουν εντατικές προσπάθειες σύνθεσης υβριδικών μορίων, ικανών να απελευθερώνουν παραπάνω από ένα διαβιβαστή, ασκώντας αξιόλογη αντικαρκινική δράση, όπως ήδη έχει πραγματοποιηθεί σε πειραματικό επίπεδο με τη χρήση ενός υβριδικού παραγώγου ασπιρίνης, συνδεδεμένο με H_2S και NO[164].

Τέλος, πειραματικές μελέτες πρέπει να επικεντρωθούν στο συνδυασμό της αντικαρκινικής θεραπείας που αφορά στον αέριο διαβιβαστή με κάποια δεύτερη θεραπευτική προσέγγιση. Αφενός, η θεραπεία που βασίζεται μονάχα στο διαβιβαστή δεν μπορεί να είναι πλήρως αποτελεσματική κατά του όγκου. Αφετέρου, υπάρχουν πολλές μελέτες όπου η χορήγηση είτε αναστολέα, είτε δότη υδροθείου, αύξησε την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων απέναντι σε κάποιο χημειοθεραπευτικό παράγοντα[106] ή την ευαισθησία έναντι ραδιοθεραπείας[170]. Ήδη έχουν γίνει αξιόλογες in vitro και in vivo προσπάθειες στο πεδίο αυτό, με την ένωση ATB-346, ένα παράγωγο ναπροξένης που μπορεί να απελευθερώσει H_2S, να ενδέχεται να έχει σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες, όπως έχει διαπιστωθεί σε μοντέλο μελανώματος[171].

Εν κατακλείδι, οι μελέτες και δημοσιεύσεις που αφορούν στον καρκίνο από τη σκοπιά του υδροθείου τείνουν να αυξάνονται σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Με ενδελεχή μελέτη των σηματοδοτικών μονοπατιών όπου συμμετέχει ο αέριος διαβιβαστής μεμονωμένα στους διαφόρους τύπους καρκίνου, καθώς και με την ανάπτυξη εκλεκτικών και δραστικών αναστολέων και δοτών του, το πεδίο του H_2S θα μπορούσε να προσφέρει μία πολύ ελπιδοφόρα θεραπευτική επιλογή, με προοπτική μετάφρασης σε κλινικό επίπεδο, ειδικά σε συνδυασμό με ήδη υπάρχουσες θεραπείες, ύστερα από προσεκτική διερεύνηση των αποτελεσματικότερων και ασφαλέστερων συνδυασμών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144,** 646–674 (2011).

2. Siegel, R. L., Miller, K. D. & DVM, A. J. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* **67,** 7–30 (2017).

3. Matsuzaki, S. *et al.* Potential targets for ovarian clear cell carcinoma: a review of updates and future perspectives. *Cancer Cell Int.* **15,** 117 (2015).

4. Scully R.E, S. S. . Histological Typing of Ovarian Tumours,. *World Heal. Organ.* **54,** 575 (1973).

5. Del Carmen, M. G., Birrer, M. & Schorge, J. O. Clear cell carcinoma of the ovary: A review of the literature. *Gynecologic Oncology* **126,** 481–490 (2012).

6. Mabuchi, S., Sugiyama, T. & Kimura, T. Clear cell carcinoma of the ovary: Molecular insights and future therapeutic perspectives. *J. Gynecol. Oncol.* **27,** 1–14 (2016).

7. Mabuchi, S., Kuroda, H., Takahashi, R. & Sasano, T. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **137,** 173–179 (2015).

8. Sato, N. *et al.* Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of the tumor suppressor gene PTEN in benign endometrial cyst of the ovary: Possible sequence progression from benign endometrial cyst to endometrioid carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary. *Cancer Res.* **60,** 7052–7056 (2000).

9. Alsop, K. *et al.* BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: A report from the Australian ovarian cancer study group. *J. Clin. Oncol.* **30,** 2654–2663 (2012).

10. Johnston, P. & Grandis, J. STAT3 signaling: anticancer strategies and challenges. *Mol. Interv.* **11,** 18–26 (2011).

11. Yu, H., Pardoll, D. & Jove, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* **9,** 798–809 (2009).

12. Olsson, A., Dimberg, A., Kreuger, J. & Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signalling-in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7,** 359–371 (2006).

13. Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W. & Hall, M. N. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* **144,** 757–768 (2011).

14. Pejovic, T. *et al.* Cytogenetic instability in ovarian epithelial cells from women at risk of ovarian cancer. *Cancer Res.* **66,** 9017–9025 (2006).

15. Saal, L. H. *et al.* Recurrent gross mutations of the PTEN tumor suppressor gene in breast cancers with deficient DSB repair. *Nat. Genet.* **40,** 102–7 (2008).

16. Tsuchiya, A. *et al.* Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma: identification of hepatocyte nuclear factor-1 beta as a molecular marker and a

possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* **163,** 2503–2512 (2003).

17. Sun, Y., Niu, J. & Huang, J. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Am. J. Transl. Res.* **1,** 148–162 (2009).

18. Tai, S. *et al.* PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate* **71,** 1668–1679 (2011).

19. Gustavsson, H., Jennbacken, K., Welén, K. & Damber, J.-E. Altered expression of genes regulating angiogenesis in experimental androgen-independent prostate cancer. *Prostate* **68,** 161–170 (2008).

20. Grignon, D. J. Unusual subtypes of prostate cancer. *Mod. Pathol.* **17,** 316–327 (2004).

21. Miyoshi, Y. *et al.* CASE REPORT Neuroendocrine differentiated small cell carcinoma presenting as recurrent prostate cancer after androgen deprivation therapy. *BJU Int.* **88,** 982–983 (2001).

22. Billis, A. Small cell carcinoma of the prostate. A morphologic and immunohistochemical study of 95 cases. *Int. Braz J Urol* **34,** 107–108 (2008).

23. Papandreou, C. N. *et al.* Results of a phase II study with doxorubicin, etoposide, and cisplatin in patients with fully characterized small-cell carcinoma of the prostate. *J. Clin. Oncol.* **20,** 3072–3080 (2002).

24. Horoszewicz, J. S. *et al.* LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma1. *Cancer Res* **43,** 1809–1818 (1983).

25. Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F. & Jones, L. W. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest. Urol.* **17,** 16–23 (1979).

26. Cunningham, D. & You, Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J. Biol. Methods* **2,** e17 (2015).

27. Sciarra, A., Casale, P., Colella, D., Di Chiro, C. & Di Silverio, F. Hormone-refractory prostate cancer? Anti-androgen withdrawal and intermittent hormone therapy. *Scand J Urol Nephrol* **33,** 211–216 (1999).

28. Crawford, E. D. Understanding the Epidemiology, Natural History, and Key Pathways Involved in Prostate Cancer. *Urology* **73,** S4–S10 (2009).

29. Schulz, W. A. Molecular biology of prostate cancer. *Mol. Hum. Reprod.* **9,** 437–448 (2003).

30. Jarrard, D. F. *et al.* Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Cancer Research* **58,** 5310–5314 (1998).

31. Culig, Z. *et al.* Androgen Receptor Activation in Prostatic Tumor Cell Lines by Insulin-like Growth Factor-I, Keratinocyte Growth Factor, and Epidermal Growth Factor. *Cancer Res.* **54,** 5474–5478 (1994).

32. Hobisch, A. *et al.* Interleukin-6 Regulates Prostate-specific Protein Expression in Prostate Carcinoma Cells by Activation of the Androgen Receptor. *Cancer*

Res. **58,** 4640–4645 (1998).

33. Veldscholte, J. *et al.* The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **41,** 665–669 (1992).

34. Visakorpi, T. *et al.* In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* **9,** 401–406 (1995).

35. Müller, J. M. *et al.* FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *EMBO J.* **19,** 359–69 (2000).

36. Craft, N., Shostak, Y., Carey, M. & Sawyers, C. L. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat. Med.* **5,** 280–5 (1999).

37. Lonergan, P. E. & Tindall, D. J. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog* **10,** 20 (2011).

38. Kaarbø, M., Klokk, T. I. & Saatcioglu, F. Androgen signaling and its interactions with other signaling pathways in prostate cancer. *BioEssays* **29,** 1227–1238 (2007).

39. Syed, S. & Tolcher, A. Innovative therapies for prostate cancer treatment. *Rev. Urol.* **5,** 78–84 (2003).

40. Gregory, C. W. *et al.* Heregulin-Induced Activation of HER2 and HER3 Increases Androgen Receptor Transactivation and CWR-R1 Human Recurrent Prostate Cancer Cell Growth. *Clin Cancer Res.* **11,** 1704–1712 (2005).

41. Scher, H. *et al.* Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in the progression of prostatic neoplasms. *Clin Cancer Res* **1,** 545–50 (1995).

42. Majumder, P. K. & Sellers, W. R. Akt-regulated pathways in prostate cancer. *Oncogene* **24,** 7465–7474 (2005).

43. Lin, H. K., Yeh, S., Kang, H. Y. & Chang, C. Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 7200–5 (2001).

44. Fan, W. *et al.* Insulin-like growth factor 1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of Foxo1 with androgen receptor. *J. Biol. Chem.* **282,** 7329–7338 (2007).

45. Yoshimoto, M. *et al.* Interphase FISH analysis of PTEN in histologic sections shows genomic deletions in 68% of primary prostate cancer and 23% of high-grade prostatic intra-epithelial neoplasias. *Cancer Genet. Cytogenet.* **169,** 128–137 (2006).

46. Morgan, T. M., Koreckij, T. D. & Corey, E. Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Curr. Cancer Drug Targets* **9,** 237–49 (2009).

47. Wagner, E. F. & Nebreda, A. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* **9,** 537–549 (2009).

48. Magi-Galluzzi, C. *et al.* Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is overexpressed in prostate cancers and is inversely related to apoptosis. *Lab. Invest.* **76,** 37–51 (1997).

49. Srikanth, S., Franklin, C. C., Duke, R. C. & Kraft, A. S. Human DU145 prostate cancer cells overexpressing mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 are resistant to Fas ligand-induced mitochondrial perturbations and cellular apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* **199,** 169–178 (1999).

50. Bakin, R. E., Gioeli, D., Bissonette, E. A. & Weber, M. J. Attenuation of Ras signaling restores androgen sensitivity to hormone-refractory C4-2 prostate cancer cells. *Cancer Res.* **63,** 1975–1980 (2003).

51. Limami, Y. *et al.* The P2Y 2/Src/p38/COX-2 pathway is involved in the resistance to ursolic acid-induced apoptosis in colorectal and prostate cancer cells. *Biochimie* **94,** 1754–1763 (2012).

52. Franco, O. E. *et al.* Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in androgen-independent PSA gene expression in LNCaP cells. *Prostate* **56,** 319–325 (2003).

53. Szlosarek, P. W. & Balkwill, F. R. Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol.* **4,** 565–573 (2003).

54. Bouraoui, Y. *et al.* Pro-inflammatory cytokines and prostate-specific antigen in hyperplasia and human prostate cancer. *Cancer Detect. Prev.* **32,** 23–32 (2008).

55. Suh, J. *et al.* Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in human prostate cancer cells. *Prostate* **52,** 183–200 (2002).

56. Chen, C. D. & Sawyers, C. L. NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer. *Mol Cell Biol* **22,** 2862–2870 (2002).

57. Zhang, L. *et al.* NF-kappaB regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth. *Am. J. Pathol.* **175,** 489–99 (2009).

58. Guseva, N. V., Taghiyev, A. F., Rokhlin, O. W. & Cohen, M. B. Death receptor-induced cell death in prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* **91,** 70–99 (2004).

59. Culig, Z., Steiner, H., Bartsch, G. & Hobisch, A. Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *J. Cell. Biochem.* **95,** 497–505 (2005).

60. Yang, L. *et al.* Interleukin-6 differentially regulates androgen receptor transactivation via PI3K-Akt, STAT3, and MAPK, three distinct signal pathways in prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305,** 462–469 (2003).

61. Ueda, T., Bruchovsky, N. & Sadar, M. D. Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.* **277,** 7076–7085 (2002).

62. Lattouf, J. & Srinivasan, R. Mechanisms of disease: the role of heat-shock protein 90 in genitourinary malignancy. *Nat. Clin. Pract.* **3,** 590–601 (2006).

63. Terry, S., Yang, X., Chen, M. W., Vacherot, F. & Buttyan, R. Multifaceted

interaction between the androgen and Wnt signaling pathways and the implication for prostate cancer. *J. Cell. Biochem.* **99,** 402–410 (2006).

64. Yang, X. *et al.* Complex regulation of human androgen receptor expression by Wnt signaling in prostate cancer cells. *Oncogene* **25,** 3436–44 (2006).

65. Paul, B. D. & Snyder, S. H. H_2S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13,** 499–507 (2012).

66. Wang, R. Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* **16,** 1792–8 (2002).

67. Ignarro, L. J. *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide (endothelium-dependent relaxation/vascular smooth muscle/cyclic GMP). *Med. Sci.* **84,** 9265–9269 (1987).

68. Miller, M. R. & Megson, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br. J. Pharmacol.* **151,** 305–21 (2007).

69. Kim, H. P., Ryter, S. W. & Choi, A. M. K. CO as a cellular signaling molecule. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **46,** 411–449 (2006).

70. Pace, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276,** 734–740 (1997).

71. Szabó, C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6,** 917–35 (2007).

72. Petersen, L. C. The effect of inhibitors on the oxygen kinetics of cytochrome c oxidase. *BBA - Bioenerg.* **460,** 299–307 (1977).

73. Abe, K. & Kimura, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* **16,** 1066–1071 (1996).

74. Hosoki, R., Matsuki, N. & Kimura, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237,** 527–531 (1997).

75. Kimura, H. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. *Neurochemistry International* **63,** 492–497 (2013).

76. Liu, Y.-H., Yan, C.-D. & Bian, J.-S. Hydrogen sulfide: a novel signaling molecule in the vascular system. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **58,** 560–9 (2011).

77. Szabó, C. & Papapetropoulos, A. Hydrogen sulphide and angiogenesis: Mechanisms and applications. *British Journal of Pharmacology* **164,** 853–865 (2011).

78. Farrugia, G. & Szurszewski, J. H. Carbon monoxide, hydrogen sulfide, and nitric oxide as signaling molecules in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **147,** 303–313 (2014).

79. Veeranki, S. & Tyagi, S. C. Role of hydrogen sulfide in skeletal muscle biology and metabolism. *Nitric Oxide* **46,** 66–71 (2015).

80. Okamoto, M., Ishizaki, T. & Kimura, T. Protective effect of hydrogen sulfide on pancreatic beta-cells. *Nitric Oxide* **46,** 32–36 (2015).

81. Taniguchi, S. & Niki, I. Significance of Hydrogen Sulfide Production in the Pancreatic β-Cell. *J. Pharmacol. Sci.* **116,** 1–5 (2011).

82. Koning, A. M., Frenay, A.-R. S., Leuvenink, H. G. D. & van Goor, H. Hydrogen sulfide in renal physiology, disease and transplantation-the smell of renal protection. *Nitric Oxide* **46,** 37–49 (2015).

83. Wei, H. L., Zhang, C. Y., Jin, H. F., Tang, C. S. & Du, J. B. Hydrogen sulfide regulates lung tissue-oxidized glutathione and total antioxidant capacity in hypoxic pulmonary hypertensive rats. *Acta Pharmacol. Sin.* **29,** 670–676 (2008).

84. Srilatha, B., Adaikan, P. G., Li, L. & Moore, P. K. Hydrogen sulphide: A novel endogenous gasotransmitter facilitates erectile function. *J. Sex. Med.* **4,** 1304–1311 (2007).

85. Chen, C. Q., Xin, H. & Zhu, Y. Z. Hydrogen sulfide: Third gaseous transmitter, but with great pharmacological potential. *Acta Pharmacologica Sinica* **28,** 1709–1716 (2007).

86. Whiteman, M., Le Trionnaire, S., Chopra, M., Fox, B. & Whatmore, J. Emerging role of hydrogen sulfide in health and disease: critical appraisal of biomarkers and pharmacological tools. *Clin. Sci.* **121,** 459–488 (2011).

87. Wallace, J. L. & Wang, R. Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14,** 329–345 (2015).

88. Fu, M. *et al.* Hydrogen sulfide (H_2S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109,** 2943–8 (2012).

89. Teng, H. *et al.* Oxygen-sensitive mitochondrial accumulation of cystathionine -synthase mediated by Lon protease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110,** 12679–12684 (2013).

90. Szabo, C. *et al.* Tumor-derived hydrogen sul fi de, produced by cystathionine- β -synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. *PNAS Pharmacol.* **110,** 12474–12479 (2013).

91. Wang, R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol. Rev.* **92,** 791–896 (2012).

92. Coletta, C. & Módis, K. Regulation of Vascular Tone, Angiogenesis and Cellular Bioenergetics by the 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase/H_2S Pathway: Functional Impairment by Hyperglycemia and Restoration by DL-α-Lipoic Acid. *Mol. Med.* **21,** 1–14 (2015).

93. Kredich, N. M., Foote, L. J. & Keenan, B. S. The stoichiometry and kinetics of the inducible cysteine desulfhydrase from Salmonella typhimurium. *J. Biol. Chem.* **248,** 6187–6196 (1973).

94. Simpson, R. C. & Freedland, R. A. Factors affecting the rate of gluconeogenesis from L-cysteine in the perfused rat liver. *J. Nutr.* **106,** 1272–8 (1976).

95. Shibuya, N. *et al.* A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nat Comms* **4,** 1366 (2013).

96. Barr, L. A. & Calvert, J. W. Discoveries of Hydrogen Sulfide as a Novel Cardiovascular Therapeutic. *Circ. J.* **78,** 2111–2118 (2014).

97. Mustafa, A. K. *et al.* Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ. Res.* **109,** 1259–1268 (2011).

98. Coletta, C. *et al.* Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109,** 9161–6 (2012).

99. Li, L., Rose, P. & Moore, P. K. Hydrogen Sulfide and Cell Signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **51,** 169–187 (2011).

100. Sen, N. *et al.* Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF-κB mediates its antiapoptotic actions. *Mol. Cell* **45,** 13–24 (2012).

101. Baskar, R. & Bian, J. Hydrogen sulfide gas has cell growth regulatory role. *European Journal of Pharmacology* **656,** 5–9 (2011).

102. Manna, P. & Jain, S. K. Hydrogen sulfide and L-cysteine increase phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) and glucose utilization by inhibiting phosphatase and tensin homolog (PTEN) protein and activating PI3K/AKT/PKCζ/λ in 3T3l1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **286,** 39848–39859 (2011).

103. Kimura, Y., Goto, Y. & Kimura, H. Hydrogen Sulfide Increases Glutathione Production and Suppresses Oxidative Stress in Mitochondria. *Antioxid Redox Signal.* **12,** 1–13 (2010).

104. Szabo, C. *et al.* Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. *British Journal of Pharmacology* **171,** 2099–2122 (2014).

105. Szabo, C. Gasotransmitters in cancer: from pathophysiology to experimental therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15,** 185–203 (2015).

106. Bhattacharyya, S. *et al.* Cystathionine Beta-Synthase (CBS) Contributes to Advanced Ovarian Cancer Progression and Drug Resistance. *PLoS One* **8,** e79167 (2013).

107. Guo, H. *et al.* Characterization of hydrogen sulfide and its synthases, cystathionine β-synthase and cystathionine γ-lyase, in human prostatic tissue and cells. *Urology* **79,** 483.e1–483.e5 (2012).

108. Sen, S. *et al.* Role of cystathionine β-synthase in human breast Cancer. *Free Radic. Biol. Med.* **86,** 228–238 (2015).

109. Hansel, D. E. *et al.* Identification of Novel Cellular Targets in Biliary Tract Cancers Using Global Gene Expression Technology. *Am J Pathol.* **163,** 217–229 (2003).

110. Szczesny, B., Brunyanszki, A., Hellmich, M. R. & Szabo, C. Hydrogen sulfide in lung adenocarcinoma: A tumor cell survival factor, an enhancer of mitochondrial DNA repair and a cellular bioenergetic stimulator. *Nitric Oxide* **47,** S46 (2015).

111. Zhang, W. *et al.* Expression Profiling of Homocysteine Junction Enzymes in the NCI60 Panel of Human Cancer Cell Lines in the NCI60 Panel of Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* **65,** 1554–1560 (2005).

112. De Vos, J. *et al.* Comparison of gene expression profiling between malignant and normal plasma cells with oligonucleotide arrays. *Oncogene* **21,** 6848–57 (2002).

113. Panza, E. *et al.* Role of the cystathionine γ lyase/hydrogen sulfide pathway in human melanoma progression. *Pigment Cell Melanoma Res.* **28,** 61–72 (2015).

114. Fan, K. *et al.* Wnt/β-catenin signaling induces the transcription of cystathionine-γ-lyase, a stimulator of tumor in colon cancer. *Cell. Signal.* **26,** 2801–2808 (2014).

115. You, J., Ma, M., Ye, J., Shi, X. & Wang, T. Down-regulation of cystathionine-γ-lyase/H_2S system inhibits cell growth in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *BIO Web Conf.* **34,** 4–10 (2017).

116. Wróbel, M. *et al.* Is development of high-grade gliomas sulfur-dependent? *Molecules* **19,** 21350–21362 (2014).

117. Zhao, K., Li, S., Wu, L., Lai, C. & Yang, G. Hydrogen sulfide represses androgen receptor transactivation by targeting at the second zinc finger module. *J. Biol. Chem.* **289,** 20824–20835 (2014).

118. Wu, D. *et al.* Hydrogen sulfide in cancer: Friend or foe? *Nitric Oxide* **50,** 38–45 (2015).

119. Szabo, C. *et al.* Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* **171,** 2099–2122 (2014).

120. Taylor, P. Endogenously produced hydrogen sulfide supports tumor cell growth and proliferation. *Cell Cycle* **12,** 2915–2916 (2013).

121. Asimakopoulou, A. *et al.* Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine γ lyase (CSE). *Br. J. Pharmacol.* **169,** 922–932 (2013).

122. Chao, C. & Zatarain, J. R. Cystathionine-β-Synthase Inhibition for Colon Cancer: Enhancement of the Efficacy of Aminooxyacetic Acid via the Prodrug Approach. *Mol. Med.* **22,** 361–379 (2016).

123. Pan, X. Q. The mechanism of the anticancer function of M1 macrophages and their use in the clinic. *Chinese Journal of Cancer* **31,** 557–563 (2012).

124. Mannel, D. N., Moore, R. N. & Mergenhagen, S. E. Macrophages as a Source of Tumoricidal Activity (Tumor-Necrotizing Factor). *Infect Immun.* **30,** 523–530 (1980).

125. Allen, R. G., Lafuse, W. P., Powell, N. D., Marketon, I. W. & Stiner-jones, L. T. M. Stressor-Induced Increase in Microbicidal Activity of Splenic Macrophages Is Dependent upon Peroxynitrite Production. *Infect Immun.* **80,** 3429–3437 (2012).

126. Sonke, E. *et al.* Inhibition of endogenous hydrogen sulfide production in clear-cell renal cell carcinoma cell lines and xenografts restricts their growth, survival and angiogenic potential. *Nitric Oxide* **49,** 26–39 (2015).

127. Yin, P. *et al.* Sp1 is involved in regulation of cystathionine γ-lyase gene expression and biological function by PI3K/Akt pathway in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cell. Signal.* **24,** 1229–1240 (2012).

128. Pan, Y. *et al.* Hydrogen sulfide (H_2S)/cystathionine γ-lyase (CSE) pathway contributes to the proliferation of hepatoma cells. *Mutat Res.* **763–764,** 10–18 (2014).

129. Beeler, T. & Churchich, J. E. Reactivity of the phosphopyridoxal groups of cystathionase. *J. Biol. Chem.* **251,** 5267–5271 (1976).

130. Hellmich, M. R., Coletta, C., Chao, C. & Szabo, C. The Therapeutic Potential of Cystathionine β-Synthetase/Hydrogen Sulfide Inhibition in Cancer. *Antioxid. Redox Signal.* **22,** 424–448 (2014).

131. Szabo, C. & Papapetropoulos, A. Pharmacological modulation of hydrogen sulfide (H_2S) levels: H_2S donors and inhibitors of H_2S biosynthesis. *Pharmacol. Rev.* (2017).

132. Perry TL, Wright JM, Hansen S, Allan BM, Baird PA, M. P. Failure of aminooxyacetic acid therapy in Huntington disease. *Neurology* **30,** 772–5 (1980).

133. Annals, T. & Ochsner, J. R. Evaluation of amino-oxyacetic acid as a palliative in tinnitus. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **99,** 74–9 (1990).

134. Sun, Q. *et al.* Structural basis for the inhibition mechanism of human cystathionine γ-lyase, an enzyme responsible for the production of H_2S. *J. Biol. Chem.* **284,** 3076–3085 (2009).

135. Huang, J., Khan, S. & O'Brien, P. J. The glutathione dependence of inorganic sulfate formation from L- or D- cysteine in isolated rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* **110,** 189–202 (1998).

136. Hanaoka, K. *et al.* Discovery and Mechanistic Characterization of Selective Inhibitors of H_2S-producing Enzyme: 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3MST) Targeting Active-site Cysteine Persulfide. *Sci. Rep.* **7,** 40227 (2017).

137. Takano, N. *et al.* Decreased Expression of Cystathionine β-Synthase Promotes Glioma Tumorigenesis. *Mol. Cancer Res.* **12,** 1398–1406 (2014).

138. Cai, W.-J., Wang, M.-J., Ju, L.-H., Wang, C. & Zhu, Y.-C. Hydrogen sulfide induces human colon cancer cell proliferation: role of Akt, ERK and p21. *Cell Biol. Int.* **34,** 565–572 (2010).

139. Ma, Z., Bi, Q. & Wang, Y. Hydrogen sulfide accelerates cell cycle progression in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Dis.* **21,** 156–162 (2015).

140. Lu, S., Gao, Y., Huang, X. & Wang, X. GYY4137, a hydrogen sulfide (H_2S) donor, shows potent anti-hepatocellular carcinoma activity through blocking the STAT3 pathway. *Int. J. Oncol.* **44,** 1259–1267 (2014).

141. Nicholson, R. a *et al.* Inhibition of respiratory and bioenergetic mechanisms by hydrogen sulfide in mammalian brain. *J. Toxicol. Environ. Health. A* **54,** 491–507 (1998).

142. Lee, Z. W. *et al.* The slow-releasing Hydrogen Sulfide donor, GYY4137, exhibits novel anti-cancer effects in vitro and in vivo. *PLoS One* **6,** 5–11 (2011).

143. Wu, Y. C. *et al.* Hydrogen sulfide lowers proliferation and induces protective autophagy in colon epithelial cells. *PLoS One* **7,** e37572 (2012).

144. Cotter, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat. Rev. Cancer* **9,** 501–507 (2009).

145. Fulda, S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* **31,** 84–88 (2015).

146. MA, K. *et al.* H_2S donor, S-propargyl-cysteine, increases CSE in SGC-7901 and cancer-induced mice: Evidence for a novel anti-cancer effect of endogenous H_2S? *PLoS One* **6,** e20525 (2011).

147. Zhang, L. *et al.* An Anticancer Role of Hydrogen Sulfide in Human Gastric Cancer Cells. *Oxid Med Cell Longev.* **2015,** 636410 (2015).

148. Lee, Z. W. *et al.* Utilizing hydrogen sulfide as a novel anti-cancer agent by targeting cancer glycolysis and pH imbalance. *Br. J. Pharmacol.* **171,** 4322–4336 (2014).

149. Mathai, J. C. *et al.* No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106,** 16633–8 (2009).

150. Li, L. *et al.* Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): New insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation* **117,** 2351–2360 (2008).

151. Alexander, B. E. *et al.* Investigating the generation of hydrogen sulfide from the phosphonamidodithioate slow-release donor GYY4137. *Med. Chem. Commun.* **6,** 1649–1655 (2015).

152. Yi, L. & Su, Q. Molecular mechanisms for the anti-cancer effects of diallyl disulfide. *Food Chem. Toxicol.* **57,** 362–370 (2013).

153. Chattopadhyay, M. *et al.* Hydrogen sulfide-releasing aspirin suppresses NF-κB signaling in estrogen receptor negative breast cancer cells in vitro and in vivo. *Biochem. Pharmacol.* **83,** 723–732 (2012).

154. Kashfi, K. & Olson, K. R. Biology and therapeutic potential of hydrogen sulfide and hydrogen sulfide-releasing chimeras. *Biochemical Pharmacology* **85,** 689–703 (2013).

155. Gemici, B. *et al.* H_2S-releasing drugs: Anti-inflammatory, cytoprotective and chemopreventative potential. *Nitric Oxide* **46,** 25–31 (2015).

156. Wallace IV, G. C. *et al.* Multi-targeted DATS prevents tumor progression and promotes apoptosis in ectopic glioblastoma xenografts in SCID mice via HDAC inhibition. *J. Neurooncol.* **114,** 43–50 (2013).

157. Li, W. *et al.* Diallyl trisulfide induces apoptosis and inhibits proliferation of

A549 cells in vitro and in vivo. *Acta Biochim Biophys Sin* **44,** 577–583 (2012).

158. Wu, P. P. *et al.* Diallyl trisulfide (DATS) inhibits mouse colon tumor in mouse CT-26 cells allograft model in vivo. *Phytomedicine* **18,** 672–676 (2011).

159. De Cicco, P. *et al.* The Hydrogen Sulfide Releasing Molecule Acetyl Deacylasadisulfide Inhibits Metastatic Melanoma. *Front. Pharmacol.* **8,** 1–11 (2017).

160. Duan, F. *et al.* Sulfur inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer. *Oncol. Lett.* **9,** 437–441 (2015).

161. Yang, G. & Sudbury, O. Hydrogen sulfide signalling axis as a target for prostate cancer therapeutics. *Prostate Cancer* **2016,** 1–9 (2016).

162. Pei, Y., Wu, B., Cao, Q., Wu, L. & Yang, G. Hydrogen sulfide mediates the anti-survival effect of sulforaphane on human prostate cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **257,** 420–428 (2011).

163. Szabo, C. Gaseotransmitters: new frontiers for translational science. *Sci. Transl. Med.* **2,** 59ps54 (2010).

164. Kodela, R., Chattopadhyay, M. & Kashfi, K. NOSH-aspirin: A novel nitric oxide-hydrogen sulfide-releasing hybrid: A new class of anti-inflammatory pharmaceuticals. *ACS Med. Chem. Lett.* **3,** 257–262 (2012).

165. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65,** 55–63 (1983).

166. Gerlier, D. & Thomasset, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods* **94,** 57–63 (1986).

167. Riss, T. L. *et al.* Cell viability assays. *Assay Guid. Man.* 1–31 (2015).

168. Twentyman, P. R. & Luscombe, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer* **56,** 279–285 (1987).

169. Lü, L., Zhang, L., Wai, M. S. M., Yew, D. T. W. & Xu, J. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicol Vitr.* **26,** 636–644 (2012).

170. De Preter, G. *et al.* A Fast Hydrogen Sulfide-Releasing Donor Increases the Tumor Response to Radiotherapy. *Mol. Cancer Ther.* **15,** 154–161 (2016).

171. De Cicco, P. *et al.* ATB-346, a novel hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug, induces apoptosis of human melanoma cells and inhibits melanoma development in vivo. *Pharmacol. Res.* **114,** 67–73 (2016).