



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
UNIVERSITY OF CRETE

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
FACULTY OF MEDICINE



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
(Διευθυντής: Καθηγητής Δ.Α. Σπαντίδος)

ΙΩΑΝΝΑ Α. ΔΙΑΛΥΝΑ  
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΣΥΧΝΟΤΗΤΩΝ  
ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΠΟΤΟΞΙΝΩΣΗΣ  
ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2003

*στους γονείς μου*

*στην αδερφή μου*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους με βοήθησαν κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Δ.Α. Σπαντίδο, ο οποίος με εισήγαγε στο πεδίο της Μοριακής Ογκολογίας και μου μετέδωσε πολύτιμες γνώσεις. Με τις συμβουλές, τις ιδέες και τις παρατηρήσεις του με υποστήριξε όλο αυτό τον καιρό και μου έδωσε τη δυνατότητα, στα πλαίσια συνεργασίας που οργάνωσε ο ίδιος, να εργαστώ στο Roy Castle International Institute for Lung Cancer Research στο Λίβερπουλ και στη συνέχεια στο Dept. Of Virology, Institute of Biomedical and Life Science, στο Πανεπιστήμιο της Γλασκώβης. Θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου και στα μέλη της επιτροπής μου, Καθηγητή Ν. Σιαφάκα και Επικ. Καθηγητή Δ. Καρδάση για την επίβλεψη της διατριβής μου, καθώς και τον Αναπλ. Καθηγητή Α. Τσατσάκη και το Λέκτορα Χ. Τσατσάνη για τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους. Ευχαριστίες οφείλω και στους Ιατρούς κ. Σ. Βασίλαρο και κ. Ν. Γεωργάτου για την παροχή του βιολογικού υλικού.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη του Ιολογικού Εργαστηρίου Δρ. Α. Ζαφειρόπουλο, Δρ. Σ. Μυγιάκη και τους υποψήφιους διδάκτορες Δ. Αρβανίτη και Ν. Σουλιτζή για τις συμβουλές και τη βοήθειά τους κατά τη διάρκεια της διατριβής μου, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη συνεργασία τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένειά μου και την οικογένεια Τ. Σταυρουλάκη για την ηθική τους υποστήριξη, και τους φίλους μου για τη συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια.

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

**ΕΠΩΝΥΜΟ:** ΔΙΑΛΥΝΑ  
**ΟΝΟΜΑ:** ΙΩΑΝΝΑ  
**ΗΜΕΡ/ΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ:** 08/07/1974  
**ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:** Γερμανικά, Αγγλικά

### **ΑΚΑΔΗΜΑΙΚΑ ΠΡΟΣΟΝΤΑ**

1993-1998 Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας (Λίαν Καλώς)  
Διπλωματική εργασία: 'Ανάπτυξη μεθόδου HPLC για το σύγχρονο προσδιορισμό των φαρμακευτικών ουσιών υδροχλωροθειαζιδίου και μηλείνικης εναλαπρίλης σε φαρμακευτικά σκευάσματα'

1998-1999 Μεταπτυχιακές Σπουδές στην Περιβαλλοντική Διαχείριση, Διαπανεπιστημιακό Πρόγραμμα: Erasmus University of Rotterdam, Ολλανδία και Πανεπιστήμιο Αθηνών.  
Τίτλος εργασίας: 'Μελέτη του Κύκλου του Καδμίου (Cd) στην Ελλάδα'

2000-2003 Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Τίτλος διδακτορικής διατριβής: 'Προσδιορισμός και σύγκριση συχνοτήτων γενετικών πολυμορφισμών των γονιδίων αποτοξίνωσης του κυττάρου στον καρκίνο του πνεύμονα και του μαστού'

### **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

Μάιος-Ιούλιος 1998 Εργαστήριο Ελέγχου Ποιότητας, Φαρμακευτικής Βιομηχανίας 'ΕΛΠΕΝ Α.Ε.' (Πρόγραμμα ΕΠΕΑΕΚ)

Ιούνιος-Σεπτ. 1999 Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας και DG XII της Ευρωπαϊκής Επιτροπής. Τίτλος προγράμματος: 'Towards an Integrated EU Policy for Heavy Metals' (EUPHEMET)

Νοεμ.2000-Απρ.2001 Επισκέπτης Ερευνητής, Roy Castle International Institute for Lung Cancer Research, Liverpool, UK  
Υποτροφία Erasmus/Socrates

Μάιος-Σεπτ.2002 Επισκέπτης Ερευνητής, Dept. Of Virology, Institute of Biomedical and Life Science, University of Glasgow, Glasgow, UK. Τίτλος project: 'Anti-KSHV neutralizing antibody assay'  
Υποτροφία UICC (International Union Against Cancer)

## **ΕΠΙΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ**

Μέλος της Οργανωτικής Επιτροπής για τα έτη 2000, 2001 και 2002 των συνεδρίων:

- 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology, Κρήτη, Ελλάδα
- 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Κρήτη, Ελλάδα

## **ΜΕΛΟΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ**

- Ένωση Ελλήνων Χημικών (ΕΕΧ)
- European Environmental Management Association (EEMA)
- Association of UICC Fellows

## **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ**

- 1) **Dialyna IA**, Arvanitis DA, Spandidos DA. Genetic polymorphisms on CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 genes in female breast cancer susceptibility in Greek population. 5<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology & 3<sup>rd</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, Crete, Greece, 2000. International Journal of Molecular Medicine, 6 (supplement) 1,2000
- 2) **Διαλυνά ΙΑ** και Σπαντίδος ΔΑ. Κυτόχρωμα P450 και Μοριακή Τοξικολογία. 3<sup>ο</sup> Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Ιατροδικαστικών Επιστημών και Τοξικολογίας, Ηράκλειο, Κρήτη, Νοέμβριος 2002
- 3) **Διαλυνά ΙΑ**, Πεδιώτη Α, Τσατσάκης ΑΜ και Σπαντίδος ΔΑ. Genetic polymorphisms and susceptibility to pesticide toxicity in lung cancer Greek patients. 3<sup>ο</sup> Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Ιατροδικαστικών Επιστημών και Τοξικολογίας, Ηράκλειο, Κρήτη, Νοέμβριος 2002

## **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**

- 1) **Dialyna IA**, Arvanitis DA, Spandidos DA. Genetic polymorphisms and transcriptional pattern analysis of CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 and GSTT1 genes in breast cancer. Int J Mol Med. 2001 Jul;8(1):79-87
- 2) **Dialyna IA**, Graham D, Razaee AS, Stavrianeas NG, Spandidos DA and Blackburn DJ. Anti-KSHV neutralising antibodies in infected individuals. Lancet (Submitted)
- 3) **Dialyna IA**, Miyakis S, Georgatou N, Spandidos DA. Genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 and lung cancer risk in Greek population. Lung Cancer (Submitted)

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καρκινογένεση είναι μια πολυδιάστατη διαδικασία για την έναρξη της οποίας έχει ενοχοποιηθεί η έκθεση σε περιβαλλοντικούς τοξικούς παράγοντες. Ακρογωνιαίος λίθος της χημικής καρκινογένεσης είναι η έννοια των αλληλεπιδράσεων γονιδίου και περιβάλλοντος. Η πιθανή διατομική ευαισθησία στη χημική καρκινογένεση μπορεί να καθοριστεί καλά από τις γενετικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ατόμων. Οι λειτουργικοί πολυμορφισμοί των πρωτεϊνών, οι οποίοι έχουν, ή μπορούν να έχουν, ένα ρόλο στη χημική καρκινογένεση, περιλαμβάνουν τα ένζυμα που μεταβολίζουν (ενεργοποιούν και αποτοξινώνουν) τις ξеноβιοτικές ουσίες, τα ένζυμα που αποκαθιστούν τη βλάβη στο DNA, τα γονίδια ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια). Η διατήρηση σωστής ισορροπίας μεταξύ των ενζύμων αποτοξίνωσης φάσης I και II απαιτείται για να εξασφαλιστεί η καλύτερη προστασία του κυττάρου. Η μεταβολική ενεργότητα των ενζύμων αυτών μπορεί να διαφοροποιηθεί από γενετικούς πολυμορφισμούς. Τα P450s, ένζυμα φάσης I, μεταβολίζουν τις καρκινογόνες ουσίες σε ενεργά ενδιάμεσα, ενώ τα GSTs, ένζυμα φάσης II, καταλύουν τη μετατροπή των ενεργών ενδιάμεσων σε υδατοδιαλυτές και εύκολα απεκκρινόμενες ενώσεις. Σκοπός της διατριβής ήταν ο προσδιορισμός και η σύγκριση συχνοτήτων γενετικών πολυμορφισμών των γονιδίων αποτοξίνωσης του κυττάρου σε ελληνικούς πληθυσμούς που εκδήλωσαν καρκίνο πνεύμονα και καρκίνο μαστού. Παρατηρήθηκε ότι οι συχνότερες των γενετικών πολυμορφισμών, CYP1A1 MspI, απαλοιφή GSTM1 και απαλοιφή GSTT1, των γονιδίων αποτοξίνωσης στον ελληνικό πληθυσμό βρίσκονται σε συμφωνία με εκείνες που αντιστοιχούν στην καυκάσια φυλή. Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ασθενών με καρκίνο μαστού, κατά την ανάλυση των πολυμορφισμών ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό, και σύμφωνα με την ηλικία εμφάνισης της ασθένειας, την εμμηνορροϊκή κατάσταση ή την λήψη αντισυλληπτικών χαπιών. Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων CYP1A1, GSTM1 και GSTT1 δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες προδιάθεσης στην εμφάνιση του καρκίνου του μαστού. Σε μεταγραφικό επίπεδο, τα πρότυπα απορύθμισης στην έκφραση των CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 και GSTT1 μεταξύ καρκινικών και αντίστοιχων φυσιολογικών ιστών μαστού βρέθηκαν να εκθέτουν τη μεταγραφική απορύθμιση σε ένα τουλάχιστον από τα παραπάνω γονίδια σε ποσοστό 87%. Τα πρότυπα αυτά ήταν αποτέλεσμα μεταγραφικής ρύθμισης και όχι ενίσχυσης ή απώλειας γονιδίων, δεδομένου ότι καμία διαφοροποίηση δεν ανιχνεύθηκε στον αριθμό αντιγράφων DNA. Αν και η μεταγραφή του CYP1A1 εξαρτάται από την έκφραση του AhR (υποδοχέας αρωματικών υδρογονανθράκων), στη μελέτη αυτή δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ τους. Όμως η μεταγραφική απορύθμιση του CYP1A1 συσχετίστηκε με την έκφραση του GSTM1 και του GSTP1. Όταν τα mRNA επίπεδα του GSTM1 ή του GSTP1 ήταν ανυψωμένα στους καρκινικούς ιστούς του μαστού έναντι των αντίστοιχων φυσιολογικών, εκείνα του CYP1A1 ήταν σταθερά ή χαμηλότερα. Τα μεταγραφικά επίπεδα των CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 και GSTT1 θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα ως μοριακοί δείκτες, λαμβάνοντας υπόψη τη λειτουργική σημασία των γονιδίων στο

μεταβολισμό μιας σειράς χημειοθεραπευτικών ενώσεων και την ποικιλία των μεταγραφικών προτύπων που παρουσιάστηκαν στους διάφορους ιστούς καρκίνου του μαστού, ανεξάρτητα με την ηλικία, το στάδιο ή το βαθμό. Στη μελέτη που αφορούσε άτομα που εκδήλωσαν καρκίνο πνεύμονα παρατηρήθηκε αυξημένη ευαισθησία στους φορείς του ομόζυγου μεταλλαγμένου γονότυπου του CYP1A1, η οποία ενισχύεται με τη σύγχρονη απαλοιφή του GSTM1, ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι του GSTT1. Η ύπαρξη μεταλλαγμένου γονότυπου σε δύο από τα τρία υπό εξέταση γονίδια αποδίδει σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας μεγαλύτερο κίνδυνο για καρκίνο πνεύμονα από ότι σε μικρότερες ηλικίες, το οποίο είναι συνάρτηση της χρόνιας έκθεσης σε τοξικούς παράγοντες. Η απαλοιφή του GSTT1 φαίνεται να σχετίζεται με την υψηλού κινδύνου έκθεση σε καρκινογόνα στον επαγγελματικό χώρο, αποδίδοντας στα άτομα που έχουν το συγκεκριμένο γονότυπο μεγαλύτερη ευαισθησία στην εμφάνιση καρκίνου πνεύμονα. Ο ίδιος γονότυπος παρουσιάζεται με αυξημένη συχνότητα και στους βαριά καπνιστές, αν και τα πιθανά υποστρώματα του GSTT1 ανάμεσα στις τοξικές ενώσεις του καπνού του τσιγάρου δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί επαρκώς. Το υψηλό ποσοστό του μεταλλαγμένου γονότυπου του CYP1A1 στους βαριά καπνιστές δικαιολογεί το ρόλο του ως μεταβολικό ένζυμο των αρωματικών υδρογονανθράκων, αντίθετα η αυξημένη συχνότητα του CYP1A1m1 στους μη καπνιστές ενοχοποιεί τη συμμετοχή του γονιδίου στο μεταβολισμό άλλων τοξικών ενώσεων, όπου ακόμα και χαμηλή έκθεση σε αυτές μπορεί να συσχετιστεί με την αυξημένη ευαισθησία για την εμφάνιση καρκίνου πνεύμονα. Διαφορετικοί συνδυασμένοι γονότυποι παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε κάθε ιστολογικό τύπο καρκίνου του πνεύμονα. Δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ οικογενειακού ιστορικού και αυξημένης ευαισθησίας στην εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. Σε σχέση με το ατομικό αναμνηστικό, άτομα με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και φορείς του GSTM1(-) γονότυπου φάνηκε να έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανάπτυξη της νόσου σε σχέση με εκείνους που κατά το παρελθόν είχαν νοσήσει από λοίμωξη στους πνεύμονες. Επίσης ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα και φορείς CYP1A1wt/m1 ή m1 παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία στη δημιουργία μεταστάσεων. Η διαφοροποίηση αυτή που παρατηρείται στις συχνότητες γενετικών πολυμορφισμών ανάμεσα στους ασθενείς μπορεί να έχει σημαντικές συνέπειες στην κλινική πράξη, πιθανώς ως δείκτης κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος.

## **ABSTRACT**

Carcinogenesis is a multi-stage process and the exposure to environmental chemicals plays an important role in it. A cornerstone of human chemical carcinogenesis is the concept of gene–environment interactions. Potential interindividual susceptibility to chemical carcinogenesis may well be defined by genetic variations in the host elements of this compound system. The functional polymorphisms of proteins, which have, or could have, a role in the chemical carcinogenesis, include the enzymes that metabolize (activate and detoxify) xenobiotics, the DNA-damage repair enzymes, the cell cycle control genes (oncogenes and tumor-suppressor genes). Maintenance of an appropriate balance between the phase I and II detoxification enzymes is required to ensure optimal cellular protection. Metabolic activity of both phase detoxification enzymes may be altered by genetic polymorphisms. P450s, phase I enzymes, metabolizing activate carcinogens in highly reactive intermediates, while GSTs, phase II enzymes, catalyze the conversion of reactive intermediates to inactive conjugates which are more water soluble and more readily excreted. The aim of this study was the determination and the comparison of the genetic polymorphisms frequencies of detoxification genes among greek lung cancer and breast cancer cases. It was observed that the frequencies of the genetic polymorphisms of detoxification genes, CYP1A1 MspI, GSTM1 and GSTT1 null deletions, in the Greek population are found in agreement with those that correspond in the Caucasian race. Genotyping analysis did not show any correlation to breast cancer risk. Expression of mRNA levels of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1 and AhR genes in 31 breast cancer patients, revealed inter-individual variation in an independent manner to patient age, genotype, or tumour stage. 87% of the tumour specimens tested was deregulated, compared to their normal counterparts, in at least one locus. Up regulation of CYP1A1 was observed only when one of the GSTM1 or GSTP1 was down regulated while the other remained constant. No alterations in gene copy number were observed which suggest that the deregulations of mRNA levels observed are due to transcriptional apparatus modifications. CYP1A1 was not correlated to AhR



expression. Up regulation of CYP1A1 was observed only when one of the GSTM1 or GSTP1 was down regulated while the other remained constant. Considering their functional significance in the metabolism of a series of chemotherapeutic compounds and the variety of transcriptional patterns exhibited by different breast tumours in an independent manner to age, stage or grade, CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 and GSTP1 mRNA levels could be useful molecular biomarkers. Individuals with CYP1A1m1 genotype were at a higher risk for lung cancer, which is enhanced for the carriers of GSTM1(-) genotype, but with no association with GSTT1 genotype. Older individuals with two combined mutant genotypes were at high risk for lung cancer compared to younger ages and this is a result of the high exposure to toxic factors lifetime. Individuals with GSTT1(-) genotype and high exposure to occupational carcinogens were at an elevated risk for lung cancer. The frequency of GSTT1(-) genotype was increased among heavy smokers, although the possible substrates of GSTT1 among components of tobacco smoke have not been totally identified. The high percentage of mutant CYP1A1 genotypes among heavy smokers is associated with its role as metabolic enzyme of aromatic hydrocarbons, while the frequency of CYP1A1m1 among non smokers shows that it participate in the metabolism of other toxic substances, where even low exposure to them could lead to increased susceptibility for lung cancer. When the cases stratified by histological type, different combined genotypes were at higher risk for each type. There was not observed association between the genotypes and the familial history. Individuals with COPD and GSTM1(-) genotype were at higher risk for lung cancer than those with old lung inflammation. Also patients with CYP1A1wt/m1 or m1 genotype presented higher sensitivity in the development of metastases. This differentiation that is observed in the frequencies of genetic polymorphisms is of a clinical importance with respect to treatment management of lung cancer patients.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	i
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	ii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iv
ABSTRACT	vi
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	viii

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

<b>1. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ</b>	
1.1 Εισαγωγή στη βιολογία του καρκίνου	1
1.2. Γενετικό υπόβαθρο του καρκίνου	3
<b>2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ</b>	
2.1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ του ΠΝΕΥΜΟΝΑ	4
2.1.1. Ιστολογική Ταξινόμηση	5
2.2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ του ΜΑΣΤΟΥ	7
2.2.1. Ιστολογική ταξινόμηση και παθολογία	7
<b>3. ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ</b>	
3.1 Χημική Καρκινογένεση	9
3.2. Χημικά καρκινογόνα	13
3.3. Ρυθμιστικοί παράγοντες καρκινογένεσης	
3.3.1. Ενδογενείς παράγοντες	17
Ρόλος γονιδίων ως ενδογενείς παράγοντες	18
3.2.2. Εξωγενείς παράγοντες	19
Αναστολείς καρκινογόνων	20
<b>4. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ-ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ</b>	
4.1. Βιομετατροπή χημικών καρκινογόνων	21
4.1.1. Φάσεις βιομετατροπής καρκινογόνων	21
4.2. Γενετική διαφοροποίηση στην ευαισθησία εμφάνισης καρκίνου (genetic variation)	23
4.3. Αλληλεπίδραση ‘γονίδιο-περιβάλλον’ και διατομική διαφοροποίηση (gene-environment interaction and inter-individual variation)	27
4.3.1. Εμπλοκή της Μοριακής Επιδημιολογίας στην αξιολόγηση του κινδύνου και την πρόληψη του καρκίνου	28
<b>5. ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ P450</b>	
5.1. Εισαγωγή στο κυτόχρωμα P450	31
5.2. Τι είναι τα P450s;	32
5.3. Βιοχημικές ιδιότητες	32
5.4. Τι κάνουν τα P450;	34
5.5. Ονοματολογία της υπερ-οικογένειας των P450	35
5.6 Ο ρόλος κλειδί των P450 στην ανθρώπινη βιολογία και τα ιατρικά θεραπευτικά	36
5.7. P450s και καρκίνος- Βιοενεργοποίηση καρκινογόνων	37
5.8. Ευπάθεια στον καρκίνο	40
5.9. Το γονίδιο CYP1A1	41
Υποδοχέας αρωματικών υδρογονανθράκων (AhR)	42
5.10. Έκφραση των CYPs σε όγκους και χημειοευαισθησία των καρκίνων	42

<b>6. Γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση</b>	
6.1. Εισαγωγή στα GSTs	44
6.2. Ο ρόλος των GSTs στην ενζυματική αποτοξίνωση	44
6.3. Το γονίδιο GSTM1	47
6.4. Το γονίδιο GSTP1	48
6.5. Το γονίδιο GSTT1	48
<b>7. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ</b>	
<b>7.1. ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
7.1.1. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από περιφερικό αίμα	49
7.1.2. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από ιστό	49
7.1.3. Απομόνωση ολικού RNA από ιστό	50
7.1.4. Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR)	
Αρχή μεθόδου	50
7.1.5. Πέψη με περιοριστικά ένζυμα	52
7.1.6. Μέθοδος ανάστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (RT-PCR)	52
7.1.7. Ηλεκτροφόρηση DNA	53
7.1.8. Χρώση με νιτρικό άργυρο	53
7.1.9. Ψηφιακή επεξεργασία αποτελεσμάτων	53
7.1.10. Στατιστική ανάλυση	54
<b>7.2. ΔΕΙΓΜΑΤΑ</b>	
7.2.1. Δείγματα για τη μελέτη στον καρκίνο του μαστού	55
7.2.2. Δείγματα για τη μελέτη στον καρκίνο του πνεύμονα	55
7.2.3. Ερωτηματολόγιο	56
<b>7.3. ΥΛΙΚΑ</b>	
7.3.1. Εκκινητές	57
7.3.2. Υλικά και εταιρείες προέλευσης	58
7.3.3. Διαλύματα	59
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ I</b>	
<b>8. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ</b>	
8.1. Γενετική ανάλυση	60
Ανάλυση ατομικών γονότυπων	63
Ανάλυση συνδυασμένων γονότυπων ανά δύο γονίδια	64
Ανάλυση συνδυασμένων γονότυπων ανά τρία γονίδια	66
Συσχέτιση συχνότητας γονότυπων με ατομικά χαρακτηριστικά	67
8.2. Ανάλυση σε μεταγραφικό επίπεδο	68
8.3. Ανάλυση γενομικής διαφοροποίησης για την επισημάνση διαφοροποίησης στον αριθμό αντιγράφων	77
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ I</b>	
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ</b>	78
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ II</b>	
<b>9. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ</b>	
9.1. Γενικά	83
9.2. Γενετική ανάλυση	84
Ανάλυση ατομικών γονότυπων	84

Ανάλυση συνδυασμένων γονότυπων ανά δύο γονίδια	85
Ανάλυση συνδυασμένων γονότυπων ανά τρία γονίδια	87
9.3. Κατανομή ασθενών σε σχέση με δημογραφικά στοιχεία και με περιβαλλοντικούς παράγοντες	88
Ηλικία	89
Διαμονή και Έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες	90
9.3.1. Συσχέτιση συχνότητας πολυμορφισμών και καπνίσματος	92
9.4. Ιστολογικοί τύποι και συχνότητες πολυμορφισμών των γονιδίων CYP1A1, GSTM1 και GSTT1	96
9.5. Συσχέτιση ιστολογικών τύπων και ατομικών χαρακτηριστικών	
Οικογενειακό Ιστορικό	103
Ατομικό Αναμνηστικό	104
Στάδιο, Μεταστάσεις	105
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ II</b>	
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ</b>	106
<b>ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	113
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	116
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	120

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ**

#### **1.1 Εισαγωγή στη βιολογία του καρκίνου**

Μια από τις μεγαλύτερες μάστιγες της εποχής μας αποτελεί ο καρκίνος, ακολουθώντας έναν σταθερά αυξανόμενο ρυθμό κρουσμάτων ανεξαρτήτου ηλικίας. Σύμφωνα με επιδημιολογικές έρευνες οι αναπτυγμένες χώρες (Δ. Ευρώπη, Β. Αμερική, Αυστραλία, Ιαπωνία, κλπ) με πληθυσμό περίπου 1,2 δισεκατομμύρια, παρουσίασαν 11 εκατομμύρια θανάτους από διάφορες αιτίες, από τις οποίες 3,3 εκατομμύρια οφείλονταν σε καρδιοαγγειακά νοσήματα και 2,3 εκατομμύρια σε διάφορα είδη καρκίνου. Παρατηρείται λοιπόν ότι οι διάφορες μορφές καρκίνου, από την όγδοη θέση ως αιτία θανάτου στις αρχές του αιώνα, έγιναν η δεύτερη αιτία. Από τα 2,3 εκατομμύρια καρκίνου, το 22% είναι καρκίνος του πνεύμονα, το 16% του στομάχου, το 7% του μαστού, το 4% του προστάτη και ακολουθούν άλλα είδη καρκίνων.

Συναντάται και με τους όρους 'κακοήθης όγκος' ή 'κακοήθες νεόπλασμα'. Με τους όρους αυτούς νοείται ο αυτόνομος, άναρχος και άτυπος πολλαπλασιασμός των κυττάρων που μπορεί να προκύψει σε οποιοδήποτε όργανο ή ιστό του σώματος. Επικρατέστερος όμως σήμερα ορισμός είναι αυτός που έχει δοθεί από τον Willis το 1967 και σύμφωνα με τον οποίο ως νεόπλασμα μπορεί να ορισθεί μια ανώμαλη μάζα που υπερβαίνει την ανάπτυξη των κανονικών ιστών, δε συντονίζεται με αυτούς και εξακολουθεί και αυξάνεται κατά τον ίδιο πληθωρικό τρόπο και μετά την καταστολή του γενεσιουργού ερεθίσματος.

Η τάση που επικρατεί στο χώρο της ιατρικής να ταξινομούνται οι ασθένειες αιτιολογικά, παρουσιάζει σοβαρές δυσχέρειες στην περίπτωση του καρκίνου. Είναι γνωστό ότι πρόκειται για νόσο αγνώστου αιτιολογίας, οφειλόμενη στη δράση καρκινογόνων παραγόντων –φυσικών, χημικών και βιολογικών-, όπως προκύπτει από την παθολογία σε άνθρωπο και ζώα (Cairns 1981). Επιπλέον το γεγονός ότι ένας καρκινογόνος παράγοντας μπορεί να προκαλέσει περισσότερα είδη όγκων (π.χ. ο ιός Epstein-Bar μπορεί να προκαλέσει κακοήθες λέμφωμα Burkitt και

καρκίνωμα Schminke-Regaud), καθιστά ακόμα πιο δύσκολη την ταξινόμηση των όγκων αιτιολογικά.

Η πιο σημαντική διάκριση των νεοπλασμάτων είναι ανάλογα με τη βιολογική τους συμπεριφορά, αν είναι δηλαδή κακοήθη ή καλοήθη. Και οι δύο τύποι είναι αποτέλεσμα ανώμαλης κυτταρικής αναπαραγωγής. Ένα καλοήθες νεόπλασμα αναπτύσσεται τοπικά, δε διηθεί γειτονικούς ιστούς και δε μεθίσταται σε άλλα όργανα και ενδεχομένως έχει καλύτερη πρόγνωση. Αντίθετα ένα κακοήθες νεόπλασμα είναι διηθητικό, δίνει μεταστάσεις, είναι ικανό να διηθεί και να καταστρέφει γειτονικούς ιστούς. Είναι γενικώς κακής προγνώσεως, η οποία εξαρτάται από τη φύση του νεοπλασματος καθώς και τους παράγοντες που καθορίζουν την αντίσταση του οργανισμού στην ανάπτυξη και εξάπλωση του όγκου, συνάρτηση και αυτοί της ετοιμότητας των άνοσων μηχανισμών του οργανισμού. Γίνεται φανερό ότι η διάκριση στηρίζεται στην πρόγνωση, στη θεραπεία και ειδικότερα στην προοπτική θανάτου για τα κακοήθη νεοπλάσματα.

Ταξινόμηση των νεοπλασμάτων γίνεται και με βάση την ιστολογία τους, στην οποία υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ μορφολογίας και βιολογικής συμπεριφοράς των νεοπλασματικών κυττάρων. Τα περισσότερα κακοήθη νεοπλάσματα διακρίνονται σε σαρκώματα, καρκινώματα και λεμφώματα. Τα καρκινώματα είναι επιθηλιακής προέλευσης, ενώ τα σαρκώματα και τα λεμφώματα είναι μεσεγχυματικής προέλευσης. Η διάκριση των καλοηθών νεοπλασμάτων είναι περισσότερο δυσχερής και γίνεται είτε με βάση την προέλευση (ιστός με κατάληξη -ώμα, π.χ. λίπωμα) είτε με βάση τη μακροσκοπική τους εικόνα, όπως π.χ. θήλωμα, αδένωμα, κυσταδένωμα.

Με τον όρο διαφοροποίηση του νεοπλασματικού κυττάρου νοείται ο βαθμός ομοιότητάς του με το φυσιολογικό από το οποίο προέρχεται, μορφολογικά και λειτουργικά. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο βαθμός αυτός είναι αντιστρόφως ανάλογος του ρυθμού πολλαπλασιασμού του κυττάρου. Τα καλοήθη νεοπλάσματα είναι συνήθως καλά διαφοροποιημένα, ενώ τα κακοήθη παρουσιάζουν ευρύ φάσμα διαφοροποίησης, καθώς επίσης εμφανίζουν αναπλασία (δομική και λειτουργική παλινδρόμηση των κυττάρων) και κυτταρική ατυπία (ποικιλομορφία μεγέθους και σχήματος των κυττάρων).

## 1.2. Γενετικό υπόβαθρο του καρκίνου

Στη σημερινή εποχή ο καρκίνος θεωρείται νόσος με γενετικό υπόβαθρο, με την έννοια ότι οι αλλοιώσεις που παρατηρούνται μορφολογικά στο μικροσκόπιο και καταγράφονται σε βιοχημικό επίπεδο, έχουν την αιτία τους σε υποκυτταρικό επίπεδο και συγκεκριμένα στο επίπεδο DNA. Η αλλοιωμένη γενετική πληροφορία οδηγεί στην απορύθμιση των μηχανισμών ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στη διαφοροποίηση σε βάρος του υπόλοιπου κυτταρικού πληθυσμού. Το DNA που έχει υποστεί βλάβη επιδιορθώνεται μέσω ειδικών ενζυμικών συστημάτων, ενώ τα αλλοιωμένα μακρομόρια αντικαθίστανται στον οργανισμό. Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι το κύτταρο επιδιορθώνει πολλές από τις ενδιάμεσες βλάβες που προκαλούν τα χημικά καρκινογόνα. Αν τα κύτταρα πολλαπλασιαστούν κατά την διάρκεια της βλάβης του DNA, τότε οι βλάβες του γενώματος μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγή ή απώλεια κωδικών περιοχών, σε εσφαλμένη κωδικοποίηση και αλληλουχία των βάσεων του DNA, σε ανασυνδυασμούς, δημιουργία χασμάτων και αλλαγή της πεπτικής αλυσίδας. Οι αλλαγές στις κωδικές περιοχές μπορούν να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση των ογκογονιδίων. Τα ογκογονίδια ελέγχουν άμεσα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Όταν εκφράζονται σε φυσιολογική κατάσταση έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη κυτταρική γέννηση ή τον μειωμένο κυτταρικό θάνατο. Μια μεταλλαγή σε ένα ογκογονίδιο μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Όταν η βλάβη που προκαλείται από την αλλοιωμένη πληροφορία αφορά κύτταρα της γενετικής σειράς, τότε αφενός είναι κληρονομήσιμη και αφετέρου η προδιάθεση της αυτόνομης ανάπτυξης των κυττάρων αφορά περισσότερους του ενός ιστούς. Το σύνδρομο Li-Fraumeni αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα κληρονομήσιμης προδιάθεσης καρκίνου, στο οποίο η γενετική βλάβη αφορά το ρυθμιστικό γονίδιο p53 (Li and Fraumeni 1994). Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ενός καρκινικού κυττάρου εδράζονται σε συγκεκριμένα χρωμοσώματα και μεταβιβάζονται σε φυσιολογικά κύτταρα με τη μεταφορά των εν λόγω χρωμοσωμάτων.

Η κατανόηση σε μοριακό επίπεδο της ανάπτυξης καρκίνου απαιτεί την ταυτοποίηση των διαδοχικών αλλοιώσεων, οι οποίες αθροιστικά οδηγούν στην κακοήθεια (Spandidos and Siminovitch 1977).

## **2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

### **2.1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ του ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

Ο καρκίνος του πνεύμονα έγινε η περισσότερο κοινή αιτία θανάτου από καρκίνο, από τις αρχές της δεκαετίας του '80. Στον περισσότερο κόσμο, το νεόπλασμα αυτό έχει περιγραφεί ως πανδημικό.

Η πρόγνωση για τους ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα σχετίζεται στενά με το στάδιο της νόσου κατά τη διάγνωση. Ασθενείς με νόσο κλινικού σταδίου IA εμφανίζουν πενταετή επιβίωση σε ποσοστό περίπου 60%, ενώ η ίδια χρονική διάρκεια επιβίωσης σε ασθενείς κλινικού σταδίου II-IV ποικίλει από 5% έως 40% (Mountain 1997). Πάνω από τα δύο τρίτα των ασθενών εμφανίζουν κατά τη διάγνωση διήθηση επιχωρίων λεμφαδένων ή απομακρυσμένες μεταστάσεις. Η αδυναμία στην έγκαιρη πρόγνωση οφείλεται κυρίως στη δυσκολία της πρώιμης διάγνωσης και θεραπείας της νόσου. Τα μεγάλα ποσοστά μη αποτελεσματικής θεραπείας δίνουν έναυσμα για μελέτες σε νέες μεθόδους που θα συμβάλλουν στην πρώιμη διάγνωση και την κατάλληλη και αποτελεσματική θεραπεία στον καρκίνο του πνεύμονα.

Η ακτινογραφία θώρακα και η κυτταρολογική εξέταση πτυέλων αποτελούν τα μέχρι τώρα μέσα για την πρώιμη διάγνωση της νόσου. Η εφαρμογή των εξετάσεων αυτών ως screening test στο γενικό πληθυσμό έδειξε ότι μπορούν να οδηγήσουν στην ανίχνευση προσυμπτωματικού, πρώιμου κλινικού σταδίου καρκίνου, ιδιαίτερα καρκινωμάτων πλακωδών κυττάρων. Η ταυτόχρονη εφαρμογή αυτών των εξετάσεων δεν μπόρεσε να οδηγήσει σε μείωση της θνησιμότητας από καρκίνο του πνεύμονα, συμπεραίνοντας ότι τα μαζικά προγράμματα screening του πληθυσμού δεν μπορούν να εφαρμοστούν για τον καρκίνο του πνεύμονα (Melamed, Flehinger et al. 1984; Fontana, Sanderson et al. 1986). Λόγω όμως της επιτακτικής ανάγκης να βρεθούν επαρκής διαγνωστικές μέθοδοι για τον καρκίνο του πνεύμονα, οι μελέτες έχουν στραφεί στον τομέα της μοριακής βιολογίας, με σκοπό την προσέγγιση και ανάδειξη ομάδων στο πληθυσμό με προδιάθεση στην ανάπτυξη καρκίνου πνεύμονα.

Η σημαντικότερη αιτία του καρκίνου του πνεύμονα θεωρείται το κάπνισμα κατά το οποίο απελευθερώνονται πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες



(PAH), με κύριο αντιπρόσωπο το βενζο(α)πυρένιο (BP). Όμως, πέρα από αυτόν τον παράγοντα, η έκθεση ενός ατόμου (μέσω εισπνοής) σε τοξικές χημικές ουσίες που βρίσκονται στο περιβάλλον, όπως η άσβεστος, οι αρωματικές αμίνες, με κύριο αντιπρόσωπο το N-2-ακετυλ-2 αμινοφλουρένιο (AAF), η αιθανόλη, τα γλυκοκορτικοειδή, η φαινοβαρβιτάλη και οι διοξίνες, αυξάνει τον κίνδυνο για εμφάνιση της νόσου (Perera 1997). Ωστόσο, η δεκτικότητα κάθε οργανισμού, ως προς την εμφάνιση νεοπλασματικής νόσου στον πνεύμονα, οφειλόμενη στους παραπάνω παράγοντες, δείχνει να διαφέρει σημαντικά μέσα στο γενικό πληθυσμό. Ο προφανής λόγος αυτής της διαφοροποίησης είναι η γενετική ποικιλομορφία του γενικού πληθυσμού (Watanabe 1998).

Τα κύτταρα του πνεύμονα, όπως και όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, προστατεύονται από την επικίνδυνη συσσώρευση των προαναφερόμενων κυτταροτοξικών ουσιών, μέσω της λειτουργίας μιας σειράς μεταβολικών ενζύμων. Γενετικές μεταλλαγές των ενζυμικών συστημάτων, μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετική ευαισθησία στην εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα.

### **2.1.1. Ιστολογική Ταξινόμηση**

Σε δύο μεγάλες κατηγορίες, με κριτήρια, την παθολογοανατομική εξέταση τις κλινικές εκδηλώσεις, τη μεταστατική διασπορά και την ανταπόκριση στη θεραπεία, διαχωρίζεται ο καρκίνος του πνεύμονα: στο μικροκυτταρικό (SCLC, small cell lung carcinoma) με ποσοστό 20-25% βρογχογενών καρκινωμάτων και στο μη μικροκυτταρικό (NSCLC, non small cell lung carcinoma). Το γεγονός της ιστολογικής ετερογένειας μπορεί να ερμηνευτεί ως δηλωτικό της προέλευσης του καρκίνου του πνεύμονα από ένα πολυδύναμο αρχέγονο κύτταρο (Mooi, Dingemans et al. 1990; Sekido, Fong et al. 1998).

Το SCLC είναι ιδιαίτερα επιθετικό με νευροενδοκρινικά χαρακτηριστικά. Μπορεί να εμφανιστεί ως νομισματοειδής σκιά στον πνεύμονα σε ποσοστό 5%. Παρουσιάζονται κυρίως εκτεταμένες λεμφαδενικές μεταστάσεις. Μετά την έναρξη θεραπείας με χημειοθεραπευτικά μέσα, μικτοί πληθυσμοί με χαρακτηριστικά μη μικροκυτταρικού καρκίνου, μπορούν να ανευρεθούν σε ποσοστά 15 με 45%. Η απόκριση σε χημειο- και ακτινοθεραπευτικά σχήματα είναι αρκετά αποτελεσματική σε αρχική φάση της θεραπείας. Σε διάστημα όμως ενός χρόνου, οι περισσότερες

περιπτώσεις υποτροπιάζουν και δεν αποκρίνονται σε περαιτέρω θεραπευτικά σχήματα, μειώνοντας κατά συνέπεια και το χρόνο επιβίωσης του ασθενούς (Kreisman, Wolkove et al. 1992; Travis, Travis et al. 1995).

Το NSCLC πνεύμονα διαχωρίζεται σε αδenoκαρκίνωμα (adenocarcinoma), σε καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων (squamous cell carcinoma), μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (large cell carcinoma) και σε αδιαφοροποίητο καρκίνωμα. Εμφανίζει ενδοκρινή διαφοροποίηση, ενισχύοντας τη θεωρία ότι το βρογχογενές καρκίνωμα προέρχεται από ένα αρχέγονο αδιαφοροποίητο κύτταρο που κατά την εξέλιξη του είτε δε διαφοροποιείται, είτε παρουσιάζει επιθηλιακή πλακώδη, αδενική ή νευροενδοκρινική διαφοροποίηση προκύπτοντας έτσι οι αντίστοιχοι ιστολογικοί τύποι. Το SCC παρατηρείται κυρίως μεγάλους βρόγχους και λιγότερο σε περιφερικά τμήματα του πνεύμονα (Tomashefski, Connors et al. 1990). 30% των περιπτώσεων αποτελούν τα αδenoκαρκινώματα εμφανίζοντας συχνά μεικτά χαρακτηριστικά από δύο ή περισσότερους ιστολογικούς υποτύπους (βρογχιολοκυψελιδικό- bronchioloalveolar carcinoma). Το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα εμφανίζεται σε ποσοστό 9% των περιπτώσεων και συχνότερα στην περιφέρεια του πνεύμονα (Travis 2002).

## 2.2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ του ΜΑΣΤΟΥ

Η εμφάνιση του καρκίνου του μαστού έχει πάρει επιδημικές διαστάσεις στις χώρες του δυτικού κόσμου και αυξάνεται σταθερά στις περισσότερες χώρες του κόσμου. Σήμερα αποτελεί την κυριότερη αιτία θανάτου στις γυναίκες 40-55 ετών, ενώ η πιθανότητα μιας γυναίκας να αναπτύξει καρκίνο μαστού, από 1 στις 20 το 1950 στις ΗΠΑ, αυξήθηκε σε 1 στις 8 γυναίκες στη σημερινή εποχή.

### 2.2.1. Ιστολογική ταξινόμηση και παθολογία

Αξιόλογη ομοιομορφία παρουσιάζει όσο αφορά την παθολογία η νόσος αυτή. Παρόλα αυτά, τα νεοπλάσματα του μαστού εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια ως προς τη βιολογική και κλινική τους συμπεριφορά.

Ως σημεία έναρξης έχουν την εσωτερική επιθηλιακή στοιβάδα των μαζικών αδένων ή τα αδενωματώδη λοβίδια. Διακρίνονται σε δύο τύπους: διηθητικών και μη διηθητικών, *in situ*, καρκινωμάτων. Ο διηθητικός αδενώδης καρκίνος του μαστού αποτελεί τον ευρέως εμφανιζόμενο ιστολογικό τύπο. Άλλοι ιστολογικοί τύποι είναι τα λοβιδιακά, μυελώδη, βλεννώδη, θηλωματώδη και σωληνώδη καρκινώματα, τα οποία αποτελούν το 1-10% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού. Από τους πιο συχνά εμφανιζόμενους μη διηθητικούς καρκίνους μαστού είναι ο πορογενής και ο λοβιδιακός. Επίσης είναι δυνατόν να εμφανιστούν καλοήθεις υπερπλασίες του μαστού με χαρακτηριστικά των *in situ* καρκινωμάτων, οι οποίες ονομάζονται υπερπλαστικές ατυπίες (Devilee, Schuurin et al. 1994).

Το μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων καρκίνου μαστού παρουσιάζουν σε σημαντικό βαθμό το φαινόμενο της ανευπλοειδίας. Πολλαπλή ανευπλοειδία παρατηρείται σε ποσοστό 15%, ενώ η σχέση μεταξύ πλοειδίας του DNA και των διαφόρων ιστολογικών τύπων δεν παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Τα μυελώδη καρκινώματα είναι συνήθως ανευπλοειδικά, ενώ τα σωληνώδη, τα βλεννώδη και τα διηθητικά λοβιακά καρκινώματα έχουν την τάση να είναι διπλοειδή. Το μεγαλύτερο ποσοστό των διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων είναι ανευπλοειδικά.

Η επίδραση των ορμονών πιστεύεται ότι παίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου μαστού στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Όμως το δεδομένο ότι εκδήλωση του καρκίνου απαιτεί μέχρι 30 χρόνια, θεωρείται ότι τα πρωταρχικά

στάδια για τη δημιουργία κακοήθειας συμβαίνουν προεμμηνοπαυσιακά. Επίσης είναι πιθανό ότι τουλάχιστον τα περισσότερα διηθητικά καρκινώματα εμφανίζονται αρχικά ως καρκινώματα *in situ*. Εναλλακτική άποψη είναι η απευθείας μετάβαση από το φυσιολογικό επιθήλιο προς το κακοήθες, χωρίς την ορατή τουλάχιστον μετάβαση από το καλοήθες προνεοπλασματικό στάδιο.

Η πιθανή χρησιμότητα της DNA πλοείδιας σαν προγνωστικό παράγοντα του καρκίνου του μαστού βρίσκεται ακόμα υπό εξέταση. Η πλοείδια όμως των καρκινικών κυττάρων παρουσιάζει μια γενικότερη εικόνα της γενετικής εξέλιξης και ετερογένειας του όγκου, αποτελώντας πιθανό γενετικό δείκτη για τη σταθερότητα του γονιδιώματος των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Κυτταρογενετικές και μοριακές έρευνες έχουν δείξει ότι η ανάπτυξη καρκίνου του μαστού βασίζεται στη συσσώρευση γενετικών αλλοιώσεων, τόσο σε γονίδια που ενεργοποιούνται σε αντίστοιχα με ογκογόνο δράση (ογκογονίδια), όσο και σε αυτά που χρειάζονται απενεργοποίηση για την έναρξη και εξέλιξη της κακοήθειας (ογκοκατασταλτικά γονίδια).

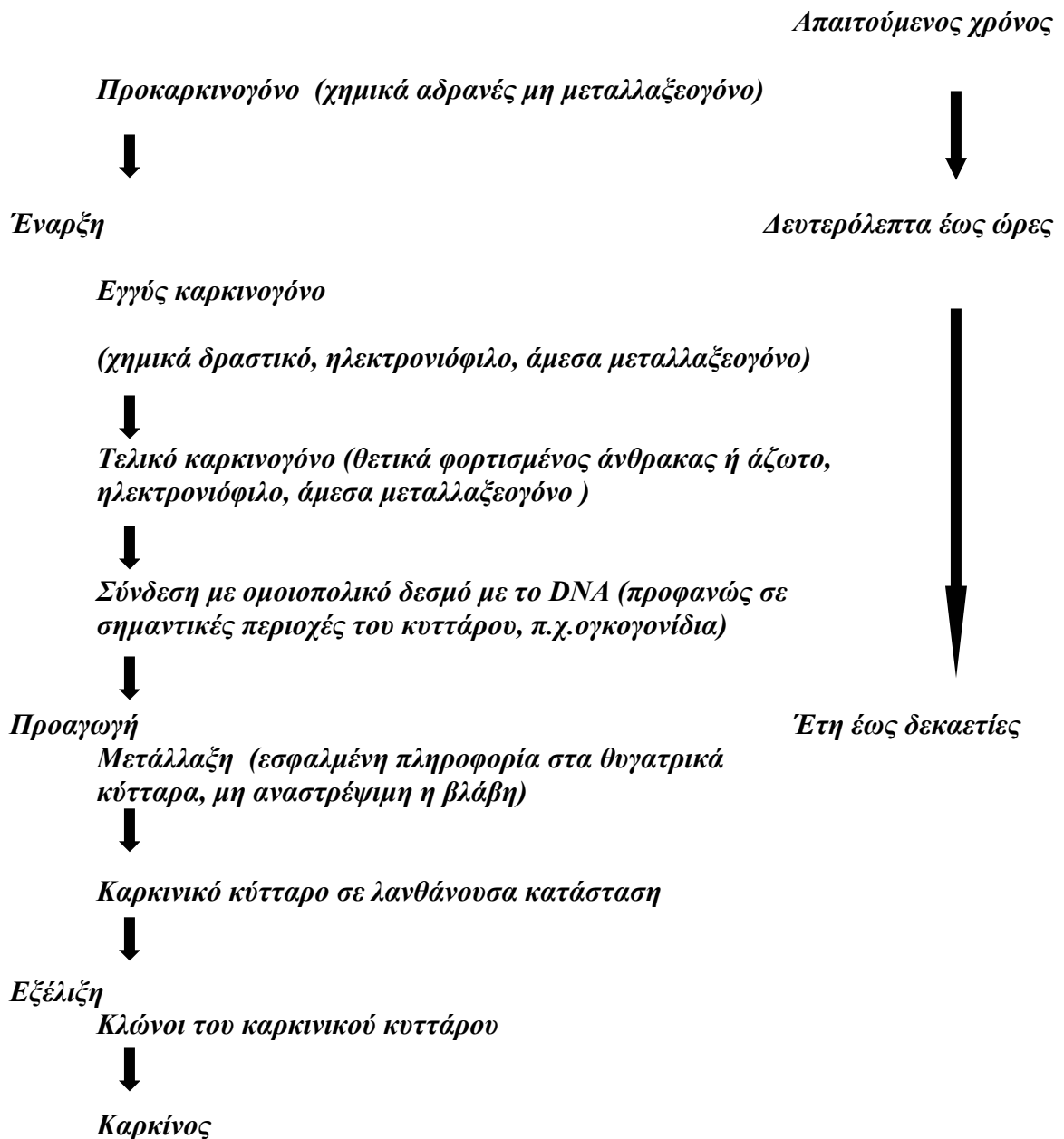
### 3. ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

Αν και κατά καιρούς έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες, ο βασικός αιτιολογικός μηχανισμός της καρκινογένεσης δεν έχει διευκρινιστεί απόλυτα. Πάντως, είναι κοινά αποδεχτό από τους επιστήμονες ότι πρόκειται για μια πολυδιάστατη διαδικασία από τη μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε προνεοπλασματικό και στη συνέχεια μετά από μακρά λανθάνουσα περίοδο, σε κακοήθες νεοπλασματικό κύτταρο. Έχουν περιγραφεί πολυάριθμοι παράγοντες, χημικοί (φυσικής προέλευσης ή και συνθετικές χημικές ουσίες), φυσικοί (ακτινοβολίες) και βιολογικοί (ιοί) που προκαλούν ή τουλάχιστον ευνοούν το μετασχηματισμό των φυσιολογικών σε νεοπλασματικά κύτταρα (Cairns 1981). Πέρα από τις φαινοτυπικές διαφορές που χαρακτηρίζουν τον κάθε ιστό, η καρκινογένεση εμφανίζει αρκετά κοινά στοιχεία σε μοριακό επίπεδο. Αυτό εκφράζεται με την ενεργοποίηση ή καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων, προϋπόθεση για την κακοήθη εξαλλαγή, ανεξάρτητα από την ιστολογική προέλευση του όγκου. Τα γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία της καρκινογένεσης ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες, με βάση τη δράση τους: α) γονίδια επιδιόρθωσης βλαβών του DNA των κυττάρων, β) ογκογονίδια και γ) ογκοκατασταλτικά γονίδια (Spandidos 1986).

#### 3.1 Χημική Καρκινογένεση

Η πρώτη ένδειξη ότι η εμφάνιση του καρκίνου στους ανθρώπους μπορεί να σχετίζεται με τη δράση εξωγενών παραγόντων προέρχεται από τον Άγγλο χειρουργό Pott το 1775 (Pott 1775), ο οποίος παρατήρησε υψηλή συχνότητα καρκίνου του οσχέου σε ανθρώπους που εργάζονταν ως καπνοδοκαθαριστές. Μετά από σειρά μελετών πρότεινε ότι η εναπόθεση αιθάλης στην οσχείκη περιοχή σχετίζεται με την πρόκληση καρκίνου. Το 1918 οι Yamagiwa και Ickikawa διατύπωσαν την άποψη ότι η τοπική επάλειψη με πίσσα στο δέρμα κονίκλου προκαλεί καρκίνου και για πρώτη φορά μια ουσία χαρακτηρίστηκε ως καρκινογόνος (Yamagawa and Ickikawa 1918).

Η επικρατέστερη θεωρία καρκινογένεσης διατυπώθηκε από τους Miller και Miller, σύμφωνα με την οποία οι χημικές καρκινογόνες ουσίες βρίσκονται είτε ως προκαρκινογόνα (procarcinogens) και γίνονται δραστικές μετά από μεταβολική



**Σχήμα 1. Μηχανισμός καρκινογένεσης κατά Miller και Miller**

ενεργοποίηση, οπότε προκύπτει το τελικό καρκινογόνο (ultimate carcinogen), είτε έχουν άμεσο δράση, είναι δηλαδή άμεσα καρκινογόνα (proximate carcinogen) και μπορούν να δράσουν ως καρκινογόνοι παράγοντες χωρίς να υποστούν μεταβολική ενεργοποίηση. Η καρκινογένεση χαρακτηρίζεται από τα εξής στάδια:

έναρξη (initiation), προαγωγή (promotion), εξέλιξη (progression), (Σχήμα 1) (Miller and Miller 1981).

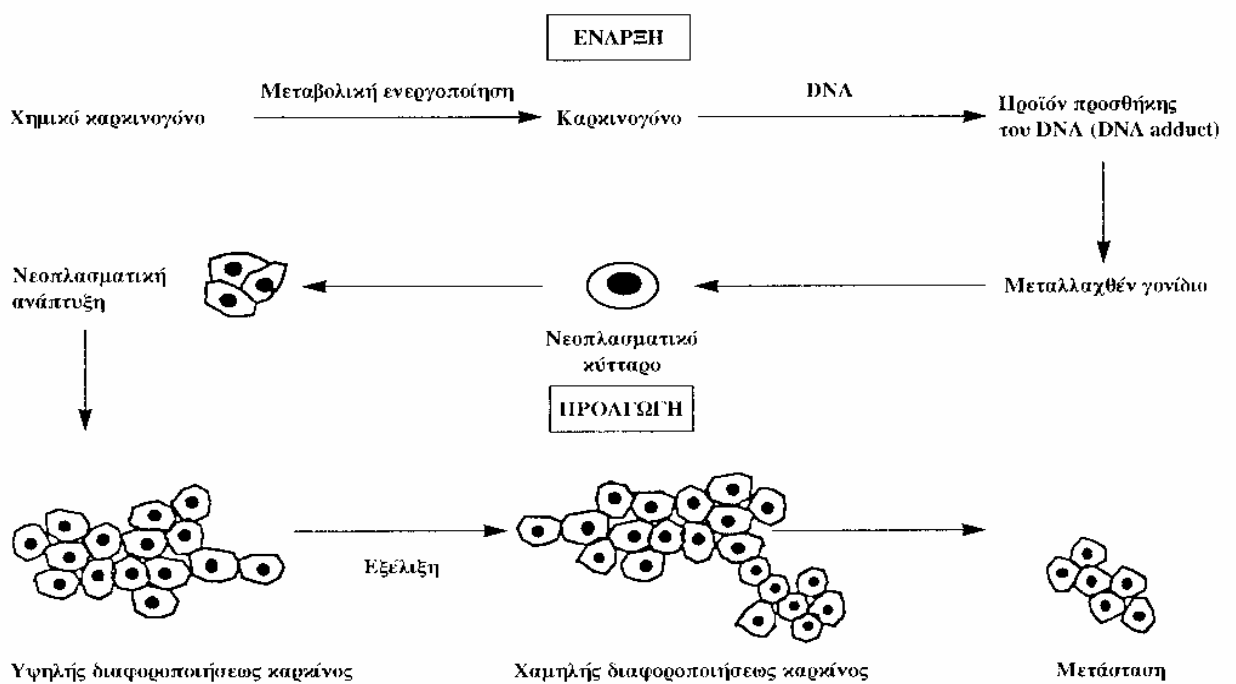
Κατά την έναρξη ή επαγωγή της καρκινογένεσης επιτυγχάνεται η δράση των καρκινογόνων (τελικών ή άμεσων) στο DNA του κυττάρου στόχου, προκαλώντας σπάσιμο της αλυσίδας του DNA ή παράγοντας ένα αλλοιωμένο νουκλεοτίδιο, που καλείται σύμπλοκο (DNA adduct). Αν τώρα το κύτταρο δεν επιδιορθώσει τη βλάβη, με τους μηχανισμούς που διαθέτει, πριν την αντιγραφή του DNA, η βλάβη μεταβιβάζεται στα θυγατρικά κύτταρα, θεωρείται εγκατεστημένη, σταθεροποιείται δηλαδή οριστικά ένα κληρονομήσιμο λάθος στο γονιδίωμα. Για τα σύμπλοκα ένα τέτοιο λάθος περιλαμβάνει την εισαγωγή ενός λανθασμένου νουκλεοτιδίου στην αλυσίδα του DNA, αν και η πλειοψηφία τέτοιων λανθασμένων ενσωματώσεων είναι πιθανά ουδέτερη στο κύτταρο. Οι διαταραχές στη δομή των γονιδίων στους διάφορους μηχανισμούς, όπως στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, χρωμοσωματικές μεταλλαγές, οδηγούν σε αλλαγές του φαινοτύπου και σε λειτουργικές διαταραχές της αύξησης και της διαφοροποίησης των κυττάρων.

Ομοιοστατικοί μηχανισμοί του κυττάρου μπορεί να συγκρατήσουν τα κύτταρα που υπέστησαν βλάβη σε μια προκαρκινική κατάσταση. Όταν όμως οι μηχανισμοί αυτοί αδρανοποιηθούν ή δεν επαρκέσουν, τότε η διαδικασία της καρκινογένεσης συνεχίζεται στο στάδιο της προαγωγής (Perera and Santella 1993).

Κατά το στάδιο της προαγωγής ουσίες που ονομάζονται προαγωγοί και συν-καρκινογόνα δρουν στα προκαρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα την εξαλλαγή τους σε καρκινικά κύτταρα. Η διαφορά προαγωγών και συν-καρκινογόνων έγκειται στο ότι τα δεύτερα επιταχύνουν την μετατροπή των φυσιολογικών σε νεοπλασματικά κύτταρα ενώ οι προαγωγοί συμβάλλουν στην αύξηση και στον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων (Farber 1981). Τέτοιες ουσίες είναι διάφορα φάρμακα, ορμόνες και φυτικά προϊόντα, τα οποία είτε αντιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη, είτε με τους υποδοχείς. Χαρακτηριστικά του σταδίου προαγωγής είναι η αναστρεψιμότητα και η έλλειψη αθροιστικότητας, μορφολογικές αλλοιώσεις των κυττάρων και μακροσκοπικά χαρακτηριστικά νεοπλασίας,

εξάρτηση από περιβαλλοντικούς παράγοντες και από τον τρόπο ζωής του ατόμου και ύπαρξη οριακής δόσης και μέγιστης απέκκρισης.

Τα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης ελέγχονται και τροποποιούνται, τόσο από ενδογενείς, όσο και εξωγενείς παράγοντες, όπως το φύλο και η ηλικία. Περιβαλλοντικοί παράγοντες του κυττάρου, όπως είναι ανοσολογικοί, ορμονικοί και άλλοι ενδογενείς, μπορεί να επιδράσουν στα καρκινογόνα και να τροποποιήσουν τη δράση τους μειώνοντας ή ενισχύοντας την πορεία της καρκινογένεσης.



**Σχήμα 2. Διαγραμματική αποτύπωση των διαφόρων σταδίων καρκινογένεσης.** Η πολυσταδιακή χημική καρκινογένεση μπορεί να διαιρεθεί εννοιολογικά σε τέσσερα στάδια: έναρξη, προώθηση, κακοήθης μετατροπή και πρόοδος. Η ενεργοποίηση των πρωτοογκογονιδίων και η αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι μεταλλακτικά γεγονότα που εμφανίζονται ως αποτέλεσμα της ομοιοπολικής βλάβης στο DNA που προκαλείται από την έκθεση σε χημικά. Η συσσώρευση των μεταλλαγών και όχι απαραίτητως η σειρά στην οποία εμφανίζονται αποτελεί την πολυβάθμια καρκινογένεση.

Η νεοπλασματική διαδικασία είναι μια μακροχρόνια διαδικασία, κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας αυτής περιόδου, προκαλούνται, προοδευτικά, αλλοιώσεις των κυττάρων και των ιστών, είτε από επιπρόσθετη έκθεση σε καρκινογόνο, ή από αυτόματες μεταλλαγές οφειλόμενες στην φυσική ατέλεια των ενζύμων που συμμετέχουν στην αντιγραφή, ή από αστάθειες του γονιδιώματος



προκαλούμενες από τις εναρκτήριες μεταλλαγές. Επίσης συχνά εμφανίζονται και νέοι πληθυσμοί κυττάρων που αποτελούν προβαθμίδες κατά την πορεία της εξαλλαγής από φυσιολογικά σε προκαρκινικά, σε κακοήθη και σε άκρως νεοπλασματικά κύτταρα (Σχήμα 2) (Miller, Blume et al. 1990).

### 3.2. Χημικά καρκινογόνα

Αν και ο όρος καρκινογόνο σημαίνει ώθηση να δημιουργηθεί ένα καρκίνωμα, αυτός ο ορισμός όμως δεν είναι πλήρως αποδεκτός. Χημικά καρκινογόνα ονομάζονται οι τοξικοί παράγοντες που έχουν μια ειδική και καθορισμένη ανεπιθύμητη ενέργεια, την πρόκληση δηλαδή κακοήθους νεοπλασίας σε άνθρωπο και ζώα. Ένα ή περισσότερα από τα κριτήρια, που πρέπει να πληρούν οι ουσίες για να θεωρηθούν καρκινογόνες, είναι:

- να προκαλούν την εμφάνιση όγκων που δεν παρατηρούνται στην ομάδα ελέγχου
- να αυξάνουν τους όγκους στην ομάδα ελέγχου, εφόσον αυτοί προϋπήρχαν
- να προκαλούν την εμφάνιση όγκων νωρίτερα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου
- να προάγουν την εμφάνιση πολλαπλών όγκων

Περίπου 35 είδη χημικών ουσιών έχουν κριθεί ύποπτα για την πρόκληση καρκίνου από την International agency for research on cancer (Πίνακας 1). Πολλά από αυτά είναι χημικά βιομηχανιών ή φάρμακα της διεθνούς θεραπευτικής και η πλειοψηφία τους αφορά ουσίες που αλληλεπιδρούν με το DNA.

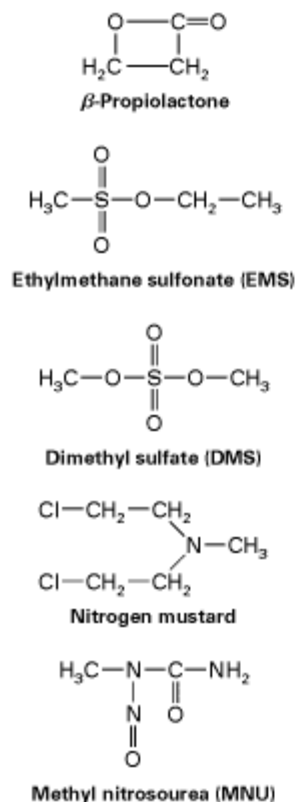
Η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός μιας ουσίας ως δυνητικά καρκινογόνου βασίζεται σε επιδημιολογικές και βιολογικές- βιοχημικές μεθόδους. Ανάλογα με τη χημική τους δομή κατηγοριοποιούνται ως εξής: *-πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες* (βενζο(α)πυρένιο, 7,12-διμεθυλβενζανθρακένιο, κ.α.), *-αρωματικές αμίνες και αζωχρώματα* (2-ναφθυλαμίνη, N,N-διμεθυλαμινο-4-αμινοαζωβενζόλιο (DMAB), κ.α.), *-νιτροζαμίνες και νιτροζαμίδια* (β-προπιολακτόνες, N-μεθυλο-δι(β-χλωραιθυλαμίνη) και τα παράγωγά της, κ.α.), *-ανόργανες ουσίες (μέταλλα), -παράγωγα μικροβίων και μυκήτων (αφλατοξίνες, ακτινομυκίνη D, κ.α.), -λοιπές καρκινογόνες ουσίες, φάρμακα (στεροειδή, ανοσοκατασταλτικά, κ.α.).*

**Πίνακας 1. Γνωστές ή ύποπτες καρκινογόνες ουσίες για την πρόκληση καρκίνου στον άνθρωπο**

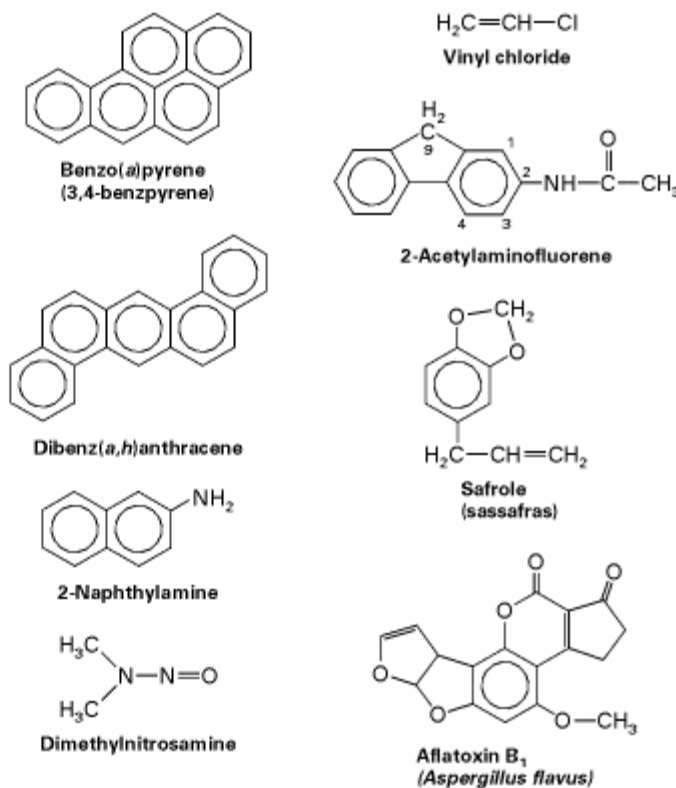
<b>Χημικές ουσίες επαγγελματικού περιβάλλοντος</b>	<b>Πιθανή εντόπιση του καρκίνου:</b>
Αρωματικές αμίνες	Ουροδόχος κύστη
Αρσενικό	Δέρμα και βρόγχοι
Αμίαντος	Βρόγχοι, υπεζωκώς, περιτόναιο
Οργανικοί διαλύτες (βενζόλιο, χλωροφόρμιο, τολουόλιο)	Μυελός των οστών
Κάδμιο	Προστάτης, νεφρός
Βηρύλλιο	Πνεύμονες
Μεταλλεύματα χρωμίου	Βρόγχοι, πνεύμονες
Μεταλλεύματα νικελίου	Βρόγχοι, ρινικοί κόλποι, πνεύμονες
Προϊόντα καύσεως του άνθρακα(κωκ)	Βρόγχοι
Αιθάλη, πίσσες και ορυκτέλαια	Δέρμα, πνεύμονες
Κόνις ξύλου	Ρινικοί κόλποι
Βινυλοχλωρίδιο	Ήπαρ
Ακρυλονιτρίλιο	Ήπαρ
Βενζό(α)πυρενιο	Βρόγχοι, πνεύμονες
Χλωριωμένα εντομοκτόνα	Ήπαρ
Πολυχλωριωμένα διφαινύλια	Ήπαρ
Αλατα ραδίου	Οστεοσάρκωμα

Ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τα χημικά καρκινογόνα διακρίνονται σε γονοτοξικά (μεταλλαξεογόνα) και επιγενετικά. Τα καρκινογόνα που αντιδρούν με το DNA είτε άμεσα (proximate carcinogens), είτε μετά από μεταβολική ενεργοποίηση (procarcinogens) και το μεταβάλλουν ονομάζονται γονοτοξικά ή αντιδρώντα με το DNA (Boehm and Drahnovsky 1983). Τα καρκινογόνα αυτά είναι ηλεκτρονιόφιλες ουσίες (Ramel, Lambert et al. 1986) ή γίνονται ηλεκτρονιόφιλες, μετά από μεταβολική ενεργοποίηση (Εικόνα 1), συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό με τις περιοχές του κυττάρου που διαθέτουν πυρηνόφιλα κέντρα, όμως με το DNA, που θεωρείται το πιθανότερο σημείο από το οποίο ξεκινάει ο καρκίνος, το RNA, τις πρωτεΐνες, τη γλουταθειόνη και πιθανόν με τους πολυσακχαρίτες (σχήμα 3). Τα γονοτοξικά καρκινογόνα είναι σαφώς επικίνδυνα για τον άνθρωπο και σε μερικές περιπτώσεις είναι δυνατόν να δράσουν ακόμη και μετά από μια έκθεση του ατόμου σε αυτά, έχουν αθροιστική δράση και δρουν μαζί με άλλα γονοτοξικά καρκινογόνα με τα οποία έχουν τον ίδιο οργανοτροπισμό (Williams and Weisburger 1986). Επομένως, ο κίνδυνος από την έκθεση του ατόμου στα γονοτοξικά καρκινογόνα έχει ποιοτικό χαρακτήρα.

ΑΜΕΣΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ  
ΚΑΡΚΙΝΟΓΩΝΑ

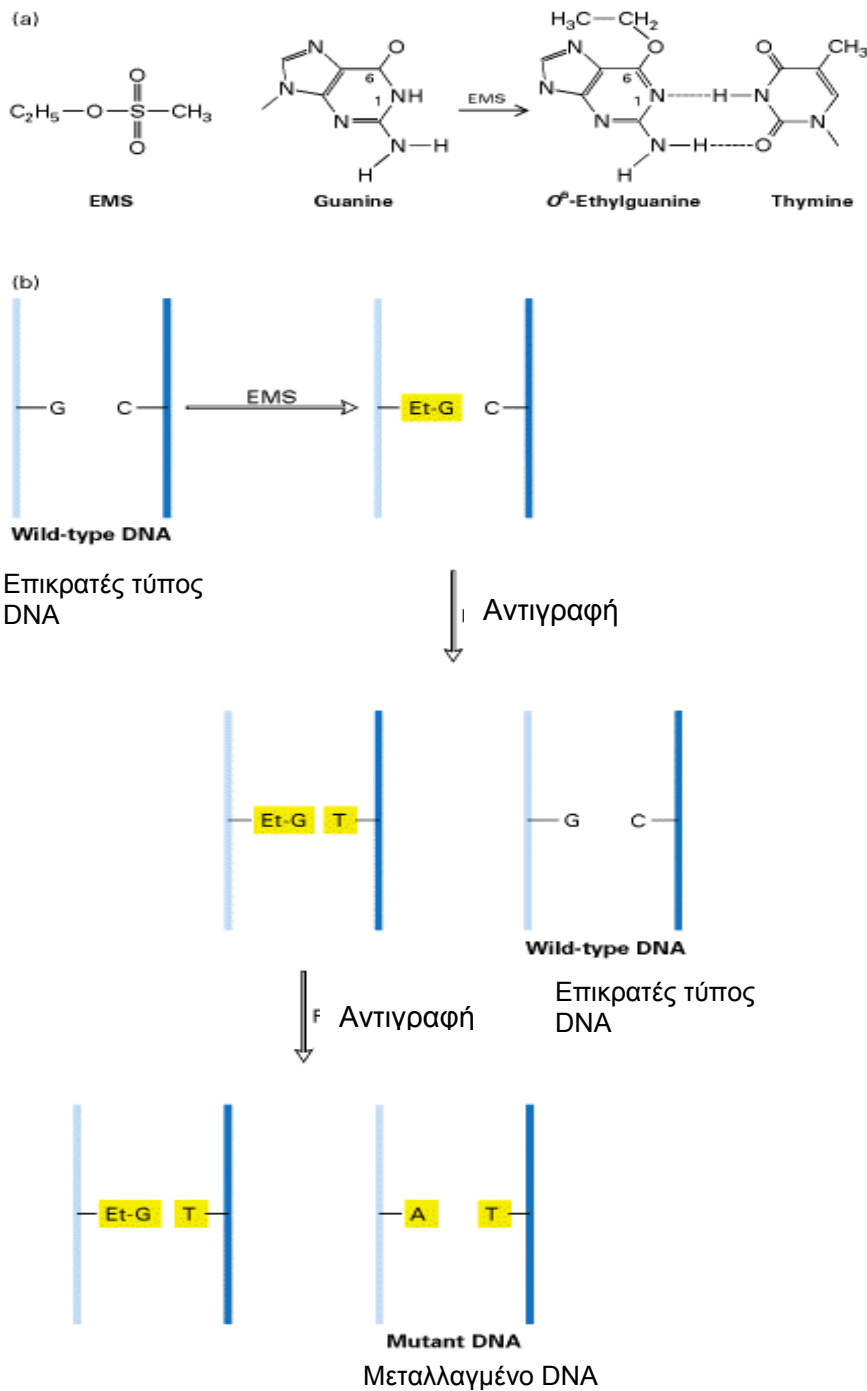


ΕΜΜΕΣΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΩΝΑ



**Εικόνα 1. Δομές χημικών καρκινογόνων (γονοτοξικά καρκινογόνα).** Τα άμεσα ενεργά καρκινογόνα είναι ισχυρές ηλεκτροφιλικές ενώσεις που μπορούν να αντιδράσουν με το DNA. Τα έμμεσα ενεργά καρκινογόνα πρέπει να μεταβολιστούν πριν αντιδράσουν με το DNA. Όλα αυτά τα χημικά δρουν ως μεταλλαξιογόνα.

Τα καρκινογόνα που δεν αντιδρούν με το DNA αλλά δρουν μέσω άλλων μηχανισμών ονομάζονται επιγενετικά. Τα καρκινογόνα αυτά, είναι δυνατόν να προκαλέσουν κυτταροτοξικότητα και χρόνια βλάβη των ιστών, ορμονικές διαταραχές και να επηρεάσουν τον ανοσολογικό μηχανισμό. Στην κατηγορία αυτή υπάγονται πολλές ουσίες που φαίνονται στον πίνακα 2. Η καρκινογόνος δράση των επιγενετικών καρκινογόνων εμφανίζεται μετά την χρόνια έκθεση του ατόμου σε υψηλές συγκεντρώσεις τοξικών ουσιών. Επομένως ο κίνδυνος από την έκθεση του ατόμου στα επιγενετικά καρκινογόνα έχει ποσοτικό χαρακτήρα (Weston and Poirier 1998). Παράδειγμα αποτελούν οι ορμόνες. Συνεπώς με τα επιγενετικά καρκινογόνα θα μπορούσε να θεσπιστεί ένας «ασφαλής» ουδός έκθεσης των ατόμων σε αυτά, αφού προηγουμένως έχει διαλευκανθεί ο μηχανισμός δράσης τους.



**Σχήμα 3. Επαγωγή σημειακής μετάλλαξης** από το sulfonate ethylmethane (EMS), ένα κοινό χρησιμοποιούμενο μεταλλαξιογόνο. (α) Το EMS αλκυλοποιεί τη γουανίνη στο οξυγόνο στη θέση 6 δαχτυλίου της πουρίνης, σχηματίζοντας  $O^6$ -αιθυλγουανίνη (et-g), που έχει ζευγάρι βάσεις με τη θυμίνη. (β) Δύο κύκλοι αντιγραφής DNA ενός κλώνου που περιέχει το Et-G παράγουν ένα μεταλλαγμένο DNA, στο οποίο ένα ζευγάρι βάσεων G-C αντικαθίσταται με ένα ζευγάρι A-T. Τα κύτταρα έχουν επίσης ένζυμα επιδιόρθωσης που μπορούν να αφαιρέσουν την αιθυλική ομάδα από το Et-G.

## Πίνακας 2. Ταξινόμηση των χημικών καρκινογόνων

Κατηγορία	Χημικές ουσίες-παραδείγματα
<b>A. Αντιδρώντα με το DNA καρκινογόνα (γονοτοξικά)</b>	
1. Χωρίς ενεργοποίηση	Αλκυλιωτικοί παράγοντες
2. Με ενεργοποίηση (προκαρκινογόνα)	Πολυκυκλικοί αρωμ. Υδρογονάνθρακες, Αρωματικές αμίνες, Νιτροζαμίνες, Αλογονωμένοι υδρογονάνθρακες, Μυκοτοξίνες (αφλατοξίνες)
3. Ανόργανες ενώσεις	Μέταλλα (Ουράνιο, Χρώμιο, Μόλυβδος, Αρσενικό)
<b>B. Επιγενετικά καρκινογόνα</b>	
1. Προαγωγοί	Χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες (DDT, Chlordane, PCBs) Σακχαρίνη Εστέρες φορβόλης (κροτωνέλαιο)
2. Κυτταροτοξικοί παράγοντες	Χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες Νιτριλοτριοξεικό οξύ
3. Ορμόνες	Οιστρογόνα, Ανδρογόνα
4. Ανοσοκατασταλτικά	Ενώσεις της πουρίνης
5. στερεές ουσίες	PCBs, Αμίαντος, Υαλοβάμβακας
<b>Γ. Αταξινόμητα καρκινογόνα</b>	
1. Ουσίες που πολλαπλασιάζουν τα υπεροξυσωμάτια	Υπολιπιδαιμικά φάρμακα, Φθαλικοί εστέρες
2. Διάφορα	διοξάνιο, βενζόλιο, αλογονωμένοι υδρογονάνθρακες, (χλωροφόρμιο, τριχλωραιθυλένιο)

### 3.3. Ρυθμιστικοί παράγοντες καρκινογένεσης

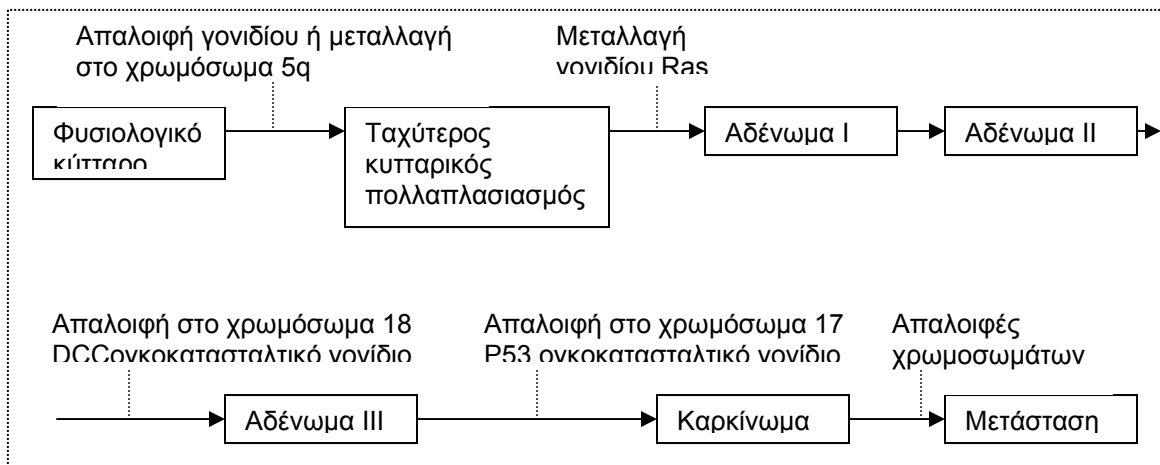
#### 3.3.1. Ενδογενείς παράγοντες

Ο καρκίνος του ανθρώπου αρχικά σχετίστηκε με τη χρόνια έκθεση στα χημικά καρκινογόνα. Ο λανθάνων χρόνος -ο χρόνος μέχρι να γίνει κλινικά έκδηλος ο καρκίνος-, διαφέρει από άτομο σε άτομο και σχετίζεται με τον τρόπο ζωής, όπως το κάπνισμα ή η διατροφή. Ευτυχώς όμως δεν επηρεάζονται όλοι οι κάτοικοι μιας περιοχής κατά τον ίδιο τρόπο, καθώς υπάρχουν και οι συνεργικοί παράγοντες. Η ηλικία και το φύλο κατέχουν σημαντική θέση στην καρκινογένεση. Για παράδειγμα νεογέννητα ζώα εκτίθενται σε μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο από ότι ηλικιωμένα ζώα. Συμπεραίνεται ότι περίοδοι αυξανόμενης σύνθεσης DNA και μίτωσης αυξάνουν την ευαισθησία στην καρκινογένεση. Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι μερικά είδη καρκίνου εμφανίζονται συχνότερα στους άνδρες από ότι στις γυναίκες (American cancer society 1990). Η διαφορετική αυτή επίπτωση του καρκίνου ανάλογα με το φύλο, πιθανόν να οφείλεται στη διαφορετική αναλογία ενζύμων. Για παράδειγμα το γλυκουρονικό οξύ βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία στα θηλυκά από ότι στα αρσενικά.

Το ενδοκρινικό σύστημα έχει σημαντική σχέση με την ανάπτυξη όγκων σε ορμονοεξαρτώμενους ιστούς, όπως οι γονάδες τα επινεφρίδια, ο θυρεοειδής, ο προστάτης και ο μαστός. Επίσης η αλλαγή στην ορμονική ισορροπία π.χ. η γοναδεκτομή, πιθανόν να συμβάλει στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Οι ανοσολογικοί παράγοντες έχει βρεθεί ότι επιτρέπουν την αύξηση ενός όγκου. Νεώτερες έρευνες έδειξαν ότι πιθανόν ευθύνονται όχι τόσο για τη δημιουργία του όγκου, όσο για τη μετάστασή του.

### Ρόλος γονιδίων ως ενδογενείς συμπαράγοντες

Τα προϊόντα έκφρασης των πρωτο-ογκογονιδίων προάγουν την ανάπτυξη και τη διαίρεση των κυττάρων, ενώ τα προϊόντα έκφρασης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων καταστέλλουν τη διαδικασία της μεταλλαγής. Η ικανότητα των ογκοκατασταλτικών γονιδίων αίρεται μόνο όταν απαλειφθούν ή μεταλλαχτούν και τα δύο αλληλία, όπου βρίσκονται αυτά τα γονίδια. Η εξελικτική διαδικασία της μεταλλαγής ενός φυσιολογικού σωματικού κυττάρου σε νεοπλασματικό και μεταστατικό φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



**Σχήμα 4.** Στάδια και εξέλιξη της διαδικασίας νεοπλασματικής μεταλλαγής από ενδογενείς παράγοντες

Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου εξαρτάται και από τη συχνότητα των μεταλλακτικών γεγονότων σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε χρωμοσωμικές απώλειες και σε προαγωγή του όγκου. Η συχνότερη γενετική αλλαγή σε ποικίλους ανθρώπινους κακοήθεις όγκους είναι η μεταλλαγή στην κωδικοποιούσα αλληλουχία του p53 ογκοκατασταλτικού

γονιδίου. Το P53 έχει τουλάχιστον δύο λειτουργίες (έλεγχος κυτταρικού κύκλου και απόπτωσης). Η O(6)-αλκυλγουανίνη στο DNA οδηγεί σε πολύ υψηλά ποσοστά G:C σε A:T μεταβάσεων στο p53 γονίδιο. Αυτές οι αλλαγές διαμορφώνουν την έκφραση του p53 γονιδίου και προκαλούν αλλαγή στην επιδιόρθωση του DNA, στην κυτταροδιαίρεση, και στον κυτταρικό θάνατο από απόπτωση. Επίσης, οι αλλαγές στην έκφραση του γονιδίου bcl-2 οδηγούν σε εκτεταμένη βιωσιμότητα των κυττάρων με την αγνόηση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) που προκαλείται υπό διαφορετικές συνθήκες. Η παρατεταμένη διάρκεια ζωής αυξάνει τον κίνδυνο των επίκτητων γενετικών αλλαγών με συνέπεια τον κακοήγη μετασχηματισμό. Η ισορροπία των bax-bcl2 είναι σημαντική στον έλεγχο της απόπτωσης καθώς επίσης και στην απώλεια έκφρασης της εύθραυστης ιστιδίνης. Η O(6)-μεθυλγουανίνη-DNA μεθυλτρανσφεράση φαίνεται να είναι σημαντική στον έλεγχο επιδιόρθωσης του DNA, ο υποδοχέας RARbeta στη διαφοροποίηση, και η cadherin H και E και διάφορες μεταλλοπρωτεάσες στη μετανάστευση των κυττάρων (Brambilla, Fievet et al. 2003; Sheweita and Tilmisany 2003).

### **3.3.2. Εξωγενείς παράγοντες**

Πολλά καρκινογόνα αποτελούν φυσικά συστατικά των τροφίμων, όπως η σαφρόλη, η ισοσαφρόλη και άλλες αρωματικές ουσίες. Κάποια άλλα αποτελούν φυσική ρύπανση των τροφίμων, όπως οι μυκοτοξίνες και τα αντιβιοτικά, αφού έχει αποδειχθεί ότι συνδέονται με το DNA (Westendorf, Marquardt et al. 1983). Η τεχνητή ρύπανση των τροφίμων περιλαμβάνει τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων, καθώς και τα βαρέα μέταλλα. Στα καρκινογόνα υπάγονται και οι προσθετικές ουσίες των τροφίμων, όπως οι χρωστικές που περιέχουν αζωχρώματα, που διασπώνται προς αρωματικές αμίνες, οι γλυκαντικές ουσίες, αλλά και οι νιτροζαμίνες, που παράγονται από την αντίδραση των δευτεροταγών αμινών των τροφών με τα νιτρώδη άλατα. Διατροφή πλούσια σε λιπαρά συστατικά, οδηγεί στην αύξηση της ροής των χολικών οξέων και δρουν ως προαγωγοί για τον καρκίνο καρκίνου παχέως εντέρου, μαστού, προστάτη, ωοθηκών και ενδομητρίου. Όσο αφορά τους ορμονο-εξαρτώμενους καρκίνους, έχει αποδειχθεί ότι διατροφή

πλούσια σε λιπαρές ουσίες προκαλεί ορμονικές διαταραχές, οι οποίες δρουν ως προαγωγοί στην καρκινογένεση (Rogers, Sullivan et al. 1999).

Το τσιγάρο περιέχει ένα πολύπλοκο μείγμα χημικών ουσιών από καρκινογόνα, συν-καρκινογόνα, επαγωγούς και προαγωγούς του καρκίνου. Τα τσιγάρα που κυκλοφορούν σήμερα έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πίσσα, αλλά δεν εκμηδενίζουν τον κίνδυνο του καρκίνου (Bartsch, Nair et al. 2000). Ο αμίαντος προκαλεί μεσοθηλίωμα των πνευμόνων στον άνθρωπο που εκτίθεται χρονίως σε αυτόν. Δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός καρκινογένεσης του αμιάντου, δεδομένου ότι δε βιομετατρέπεται και δεν απεκκρίνεται από τον οργανισμό. Για την εμφάνιση του μεσοθηλιώματος αρκεί ακόμα και μικρή μη επαγγελματική έκθεση. Καρκίνος των πνευμόνων παρουσιάστηκε ακόμη και σε άτομα τα οποία έπλεναν τα ρούχα των ατόμων που εργάζονταν στον αμίαντο. Από αυτά συμπεραίνεται ότι ο αμίαντος είναι πιο επικίνδυνος από τις οργανικές καρκινογόνες ουσίες, αν και οι τελευταίες είναι γονοτοξικές (Williams 1986). Πολλά φάρμακα έχουν καρκινογόνο δράση, π.χ. τα κυτταροστατικά, ή μετατρέπονται σε καρκινογόνα, όπως τα παράγωγα του νιτροφουρανίου. Το φυσικό οιστρογόνο οιστραδιόλη χορηγούμενο χρονίως και σε υψηλές δόσεις, έχει καρκινογόνο δράση, έχοντας ρόλο προαγωγού, μεταβάλλοντας τις ορμόνες της υπόφυσης και συγκεκριμένα την προλακτίνη και την αυξητική ορμόνη, καθώς και τις ορμόνες των επινεφριδίων και του θυρεοειδούς.

### **Αναστολείς καρκινογόνων**

Η βιταμίνη Α αναστέλλει την εμφάνιση καρκίνου σε διάφορα όργανα και ιδιαίτερα στο μαστό και στην ουροδόχο κύστη. Η βιταμίνη Ε και άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες τροποποιούν την καρκινογόνο δράση διαφόρων τοξικών ουσιών και σε υψηλές δόσεις μπορούν ακόμα και να την αναστείλουν. Επίσης οι βιταμίνες C και E εμποδίζουν το σχηματισμό νιτροζαμινών και νιτροζαμιδίων και μειώνουν ή αποκλείουν την περίπτωση εμφάνισης καρκίνου. Διατροφή πλούσια σε φυτικές ίνες δημητριακών μειώνουν τον κίνδυνο καρκίνου, γιατί δρουν ως ειδικές απορροφητικές ουσίες χολικών οξέων. Επίσης τροφή πλούσια σε πρωτεΐνες και ριβοφλαβίνη μειώνει σημαντικά ή αναστέλλει την καρκινογόνο δράση των αζωχρωμάτων.



## **4. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ-ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

### **4.1. Βιομετατροπή χημικών καρκινογόνων**

Με τον όρο βιομετατροπή ορίζεται το σύνολο των βιοχημικών διεργασιών μέσω των οποίων μια ξενοβιοτική ουσία εισερχόμενη στον οργανισμό υπόκειται σε διάφορες χημικές μετατροπές που έχουν ως τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό υδατοδιαλυτών προϊόντων. Τα τελευταία αυτά προϊόντα απεκκρίνονται ευχερέστερα από τον οργανισμό (Guengerich 2000).

Ο όρος βιομετατροπή μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντί του όρου μεταβολισμός. Ο όρος μεταβολισμός υποδηλώνει όλες εκείνες τις διεργασίες που έχουν ως σκοπό τη μετατροπή βιολογικά απαραίτητων ουσιών ή την εξασφάλιση της απαραίτητης ενέργειας για την ομαλή και απρόσκοπτη λειτουργία του κυττάρου, διεργασίες διάφορες από εκείνες που αναφέρονται σε ξενοβιοτικές ουσίες. Η αυξημένη υδατοδιαλυτότητα των προϊόντων βιομετατροπής έχει ως αποτέλεσμα: την ελάττωση της ικανότητας κατανομής στους διάφορους ιστούς, την ελάττωση της νεφρικής επαναπορρόφησης, την ελάττωση της εντερικής επαναπορρόφησης, την προαγωγή της απέκκρισης.

Οι συνέπειες αυτές εκφράζουν στην πραγματικότητα και την έννοια της αποτοξίνωσης, της όσο το δυνατό δηλαδή ταχύτερης απαλλαγής του οργανισμού από τον τοξικό παράγοντα. Ταύτιση όμως των όρων δεν είναι δυνατόν να συμβεί, διότι τα προϊόντα της βιομετατροπής συχνά συμβαίνει να είναι τοξικότερα της μητρικής ουσίας, γεγονός το οποίο δε συμβιβάζεται με την έννοια της αποτοξίνωσης.

#### **4.1.1. Φάσεις βιομετατροπής καρκινογόνων**

Η βιομετατροπή μιας καρκινογόνου ουσίας συντελείται σε δύο φάσεις:

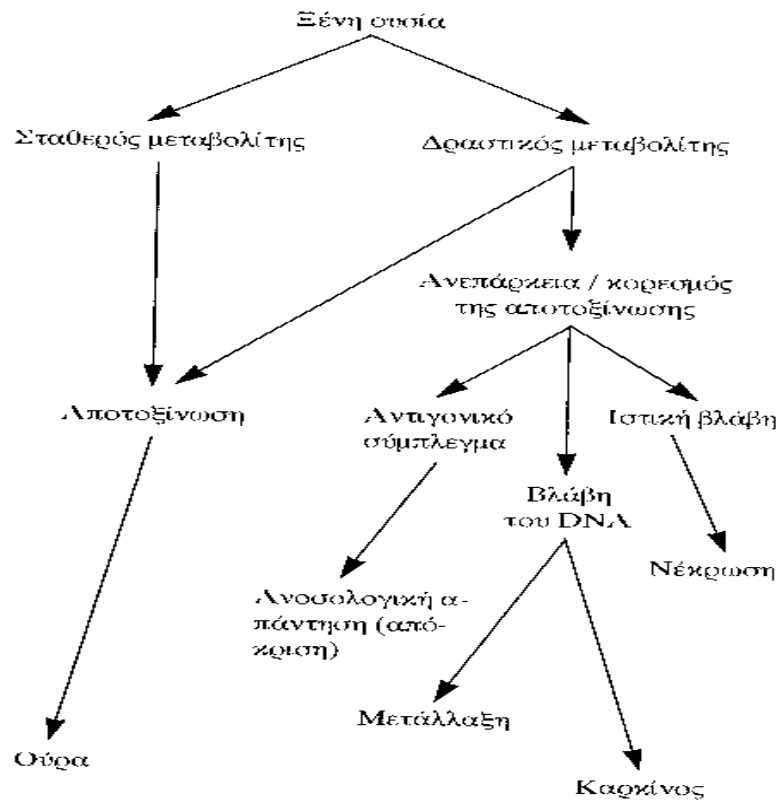
Κατά τη φάση I λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις σύζευξης -οξειδωσης, αναγωγής, υδρόλυσης- αποκαλύπτοντας προϋπάρχουσες λειτουργικές ομάδες στο μόριο της ουσίας ή προστίθενται λειτουργικές ομάδες (-OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, -COOH) στο μόριο της ουσίας. Η οξειδωση είναι ο πλέον κοινός τρόπος βιομετατροπής των χημικών ουσιών και συμπεριλαμβάνει τύπους αντιδράσεων

που παρατίθενται στον Πίνακα 3. Οι οξειδωτικές αυτές αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα με τη βοήθεια του ενζυμικού συστήματος του κυτοχρώματος P450. Κατά τη φάση II η πολική αυτή ομάδα προστίθεται είτε σε μια ήδη υπάρχουσα ομάδα είτε σε μια άλλη που προέκυψε κατά τη διαδρομή μιας αντίδρασης φάσης I, μέσω ενζυμικών συστημάτων όπως οι γλουταθειόνη-S-τρανσφεράσες και οι N-ακετυλοτρανσφεράσες. Η πολική ομάδα καθιστά το ξένο μόριο περισσότερο υδατοδιαλυτό, γεγονός το οποίο καθιστά την απέκκριση από τον οργανισμό ευκολότερη και τη δυνατότητα τοξικής δράσης λιγότερο πιθανή.

**Πίνακας 3. Αντιδράσεις βιομετατροπής**

<b>Φάσης I</b>	<b>Φάσης II</b>
Οξείδωσης (Αλειφατική, αρωματική, N-υδροξυλίωση, N-, S- οξείδωση, εποξειδωση, N-, O-, S- αποαλκυλίωση, απαμίνωση, αποθείωση, κ.α.)	Θείωση Σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ
Αναγωγής (αζω-, νιτρο-ομάδας, καρβονυλίου, αναγωγική αφαλογόνωση, κ.α.)	Σύζευξη με γλουταθειόνη Σύζευξη με αμινοξέα
Υδρολύσεις (εστέρων, αμιδίων)	Μεθυλίωση (O, S και N)
Ενυδάτωση	Ακετυλίωση

Είναι προφανές ότι η επαγωγή ή η αναστολή των ενζύμων που καταλύουν τις αντιδράσεις φάσης I και II θα οδηγήσει σε διαφοροποιήσεις στην ταχύτητα ή στο ρυθμό βιομετατροπής των διαφόρων ουσιών. Η ισορροπία μεταξύ της τοξικής δράσης και της αποτοξίνωσης μιας ουσίας είναι σημαντική και παρουσιάζει διαφοροποίηση ανάμεσα στα άτομα. Στο σχήμα 5 γίνεται διαγραμματική αποτύπωση των οδών μέσω των οποίων η βιομετατροπή μιας ουσίας είναι δυνατόν να έχει διαφορετικές συνέπειες εντός του οργανισμού εξαιτίας της αλληλεπίδρασης γονίδιο-περιβάλλον.



**Σχήμα 5.** Σχηματική αποτύπωση διαφορετικών συνεπειών εντός του οργανισμού κατά τη βιομετατροπή μιας ουσίας.

#### 4.2. Γενετική διαφοροποίηση στην ευαισθησία εμφάνισης καρκίνου (genetic variation)

Τα ένζυμα αποτοξίνωσης κατέχουν κεντρικό ρόλο στην προστασία των ατόμων από τις περιβαλλοντικές καρκινογόνες ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) που βρίσκονται στον καπνό τσιγάρου. Αυτά τα ένζυμα έχουν ταξινομηθεί σε δύο ομάδες με βάση τις λειτουργικές τους ιδιότητες. Ένζυμα φάσης I, συμπεριλαμβανομένου του κυτοχρώματος P450s, ενεργοποιούν το μεταβολισμό ξενοβιοτικών, καθώς επίσης και ενδογενών ουσιών σε ιδιαίτερα ηλεκτρονιόφιλα ενδιάμεσα. Τα ένζυμα φάσης II εμποδίζουν τη δράση αυτών των οξειδωτικών ενδιάμεσων και καταλύουν τη μετατροπή τους σε ανενεργές, υδατοδιαλυτές ενώσεις. Είναι η κυτταρική ισορροπία μεταξύ των ενζύμων φάσης I και II που επηρεάζει τον κίνδυνο κάποιου στην ανάπτυξη χημικά επαγόμενου καρκίνου (σχήμα 6).

Διάφορα ενζυμικά συστήματα που περιλαμβάνονται στο μεταβολισμό και την αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών εκθέτουν γενετικούς πολυμορφισμούς που έχουν συνδεθεί με τη διαφορετική ευαισθησία στον καρκίνο. Επιδημιολογικά και κλινικά στοιχεία συνεχίζουν να προτείνουν ότι οι πολυμορφισμοί σε επίλεκτα ένζυμα αποτοξίνωσης φάσης I και II, μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιολογικοί δείκτες του αυξανόμενου κινδύνου για τους χημικά επαγόμενους καρκίνους.

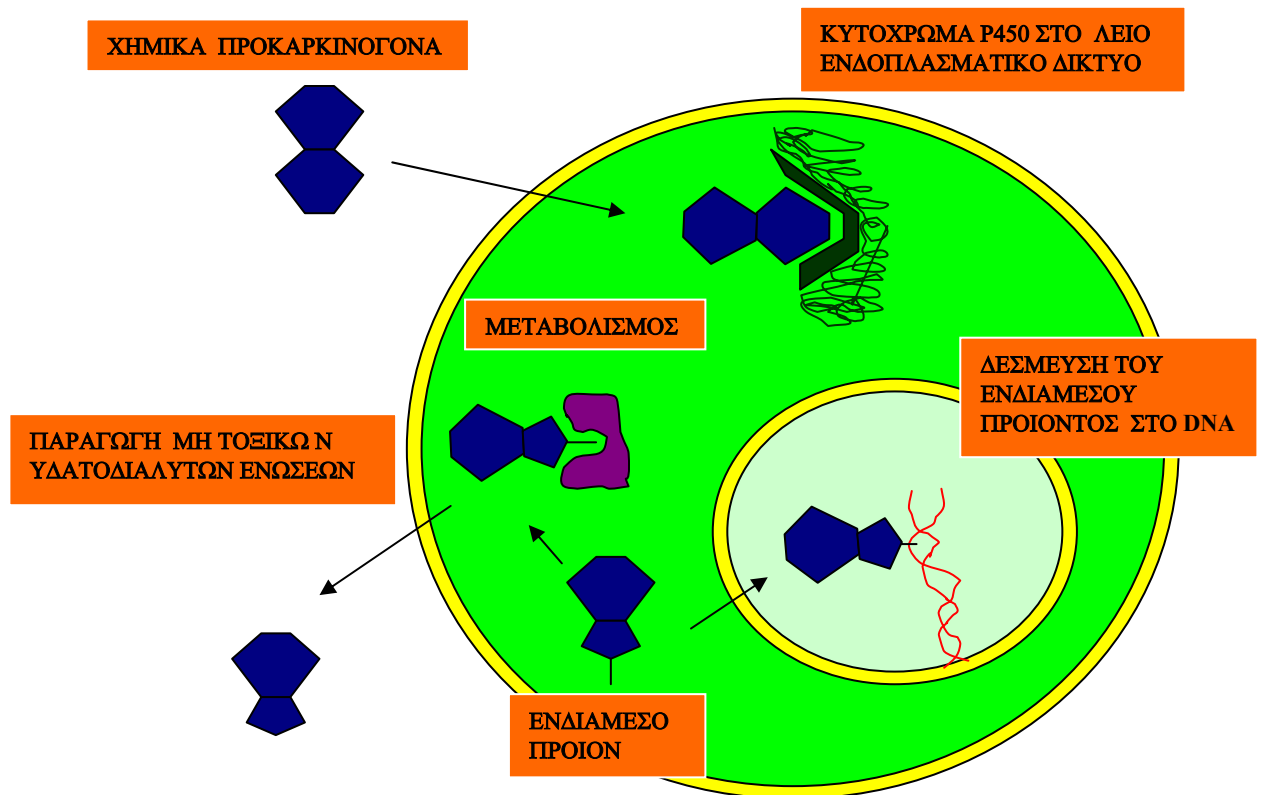
Πολλές από τις διατομικές και διεθνικές διαφορές στις επιδράσεις των φαρμάκων τώρα αποδίδονται σε γενετικές διαφορές στον μεταβολισμό τους. Οι μεταλλαγές στην κωδικοποίηση ενός γονιδίου για ένα ένζυμο που μεταβολίζει τις ουσίες, μπορούν να δημιουργήσουν παραλλαγές του ενζύμου με υψηλότερη, χαμηλότερη ή καθόλου ενεργότητα (λειτουργικές μεταλλαγές) ή ίσως δεν έχουν καμία επίδραση στην ενεργότητα του ενζύμου. Αν η μεταλλαγή συμβαίνει με συχνότητα τουλάχιστον 1% στον φυσιολογικό πληθυσμό και προκαλεί διαφορετική απόκριση στην ουσία ή φαινότυπο, αυτό το φαινόμενο ονομάζεται γενετικός πολυμορφισμός (Meyer 1994).

Οι πολυμορφισμοί εντοπίζονται με την παρατήρηση των διαφορών ανάμεσα στα άτομα ή τους πληθυσμούς στην λειτουργία των ενζύμων (φαινότυπος) και/ή στο γονίδιο για το ένζυμο (γονότυπος). Στις φαινοτυπικές *in vivo* μελέτες, για παράδειγμα ενός φαρμάκου που χορηγείται σε άτομα, παρακολουθείται ο μεταβολισμός του και αξιολογείται με τον καθορισμό των αναλογιών του αρχικού φαρμάκου προς τον μεταβολίτη, στα ούρα ή στο αίμα. Εναλλακτικώς, αν είναι διαθέσιμα δείγματα ιστών, ο φαινοτυπικός προσδιορισμός περιλαμβάνει καθορισμό της ενεργότητας των μικροσωματικών ενζύμων για συγκεκριμένα υποστρώματα ενζυματικής πρωτεΐνης και εντοπίζονται με ανοσολογικές μεθόδους καθώς και επίπεδα mRNA μετρώμενα από διάφορες μεθόδους υβριδιοποίησης νουκλεϊκού οξέος ή από αντίστροφη μεταγραφή μαζί με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR). Στις μελέτες γονότυπου, οι μεταλλαγές στα γονίδια συνήθως εντοπίζονται με την χρήση μεθόδων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), ανάλυση πολυμορφισμού τεμαχίου με περιοριστική πέψη (RFLP), ή ανάλυση πολυμορφισμού καθορισμού μονόκλωνης αλληλουχίας (SSCP), ακολουθούμενη από ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing). Οι γενετικές μεταλλάξεις που χαρακτηρίζονται, περιλαμβάνουν

απαλοιφή ενός ολόκληρου γονιδίου, μεταλλαγή σημείου μέσα στο γονίδιο, απαλοιφή ή εισαγωγή τμημάτων DNA μέσα στα γονίδια, και πολλαπλά αντίγραφα των γονιδίων, που οδηγούν σε απύση, ελαττωματική ή βελτιωμένη ενζυματική δραστηριότητα (Hong and Yang 1997; Linder, Prough et al. 1997). Σε κάποιες περιπτώσεις, όμως, έχουν παρατηρηθεί γενετικές παραλλαγές που δεν έχουν καμία λειτουργική σημασία και αυτό τονίζει την σημασία του να μπορεί να συνδεθεί μια γενετική παραλλαγή με έναν παραλλαγμένο φαινότυπο. Μια κοινή στρατηγική υπολογισμού της πιθανής λειτουργικής σημασίας των μεταλλαγών που παρατηρούνται στα ένζυμα μεταβολισμού αφορά μελέτες, του μεταβολισμού συγκεκριμένων υποστρωμάτων *in vitro*, χρησιμοποιώντας το μεταλλαγμένο cDNA σε ένα ετερόλογο σύστημα έκφρασης.

Οι πολυμορφισμοί των ενζύμων μεταβολισμού χωρίζουν τον πληθυσμό σε τουλάχιστον 2 φαινότυπους, αργούς και γρήγορους μεταβολίτες (Meyer 1994) δημιουργώντας μια κατανομή διπλής συχνότητας για δείκτες του βαθμού του μεταβολισμού. Πολυμορφισμοί έχουν εντοπιστεί σε πολλά ένζυμα που μεταβολίζουν ξενοβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων των κυτοχρωμάτων P450 (CYP), σε γονοτυπικά και φαινοτυπικά επίπεδα. Ενώ κάποιες παραλλαγές, όπως το CYP2D6\*5 (απαλοιφή γονιδίου), είναι κοινές σε όλους τους υπό μελέτη πληθυσμούς (π.χ. Αφρικανοί, Καυκάσιοι και Ανατολικοί), άλλες μοιάζουν να είναι χαρακτηριστικές σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό, δηλ. CYP2D6\*10 στους ανατολικούς (Johansson, Yue et al. 1991) και CYP2D6\*17 στους Αφρικανούς (Masimirembwa, Persson et al. 1996). Ο τύπος και η επικράτηση των παραλλαγών που υπάρχουν σε ένα άτομο ή σε ένα πληθυσμό οδηγούν σε διατομικές και διεθνικές διαφορές στις επιδράσεις των φαρμάκων και άλλων ξενοβιοτικών (Kalow 1982). Αυτό είναι σημαντικό για την ατομική φαρμακευτική θεραπεία, για κλινικές δοκιμές που ταιριάζουν σε μια συγκεκριμένη εθνική ομάδα και επίσης στην έρευνα για πιθανές σχέσεις ανάμεσα στους γονότυπους και την ευπάθεια σε καρκίνο και άλλες ασθένειες που σχετίζονται με ένζυμα που μεταβολίζουν ξενοβιοτικά.

Σχήμα 6. Μεταβολική ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών μη πολικών χημικών ενώσεων στα κύτταρα των θηλαστικών



### **4.3. Αλληλεπίδραση ‘γονίδιο-περιβάλλον’ και διατομική διαφοροποίηση (gene-environment interaction and inter-individual variation)**

Ακρογωνιαίος λίθος της ανθρώπινης χημικής καρκινογένεσης είναι η έννοια των αλληλεπιδράσεων γονιδίου-περιβάλλοντος. Η πιθανή διατομική ευαισθησία στη χημική καρκινογένεση μπορεί να καθοριστεί από τις γενετικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ατόμων. Μεταξύ των ανθρώπων, οι λειτουργικοί πολυμορφισμοί των πρωτεϊνών, οι οποίοι έχουν, ή μπορούν να έχουν, ένα ρόλο στη χημική καρκινογένεση, περιλαμβάνουν τα ένζυμα που μεταβολίζουν τις ξενοβιοτικές ουσίες, ένζυμα που αποκαθιστούν τη ζημία στο DNA, κυτταρικοί υποδοχείς, οι οποίοι ενεργοποιούν την ακόλουθη φωσφορυλίωση, και τα γονίδια ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (π.χ. ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια).

Όταν οι χημικές ουσίες ή τα ξενοβιοτικά συναντούν τα βιολογικά συστήματα, μετατρέπονται μέσω των μεταβολικών διαδικασιών. Αυτό είναι μια αρχική άποψη της αλληλεπίδρασης γονιδίου–περιβάλλοντος. Από τέτοιες διαδικασίες προκύπτουν η διαφοροποίηση των ατόμων στο μεταβολισμό των καρκινογόνων καθώς και ο μακρομοριακός σχηματισμός συμπλόκων, και τα οποία αναγνωρίστηκαν πριν από 20 έως 25 έτη (Harris 1989). Η υπερ-οικογένεια γονιδίων του κυτοχρώματος P- 450 (CYP genes) και η οικογένεια των ενζύμων της γλουταθειόνη-S-τρανσφεράσης είναι κατά μεγάλο μέρος αρμόδια για τη μεταβολική ενεργοποίηση και αποτοξίνωση πολλών διαφορετικών χημικών καρκινογόνων ουσιών στο περιβάλλον του ανθρώπου (Gonzalez 1997; Guengerich 1998; Guengerich and Shimada 1998). Τα μονοπάτια της διαδικασίας της ενεργοποίησης και αποτοξίνωσης είναι συχνά ανταγωνιστικά, παρέχοντας έτσι την περαιτέρω δυνατότητα για ατομικές διαφορές όσο αφορά το μεταβολισμό των καρκινογόνων. Αυτό το σενάριο περιπλέκεται ακόμα περισσότερο με τη διαδικασία της ενζυμικής επαγωγής ή παρεμπόδισης, όπου γονίδια αρμόδια για το μεταβολισμό καρκινογόνων μπορούν να υπερ-ρυθμίζονται ή να καταστέλλονται από συγκεκριμένες εκθέσεις σε χημικά (Windmill, McKinnon et al. 1997).

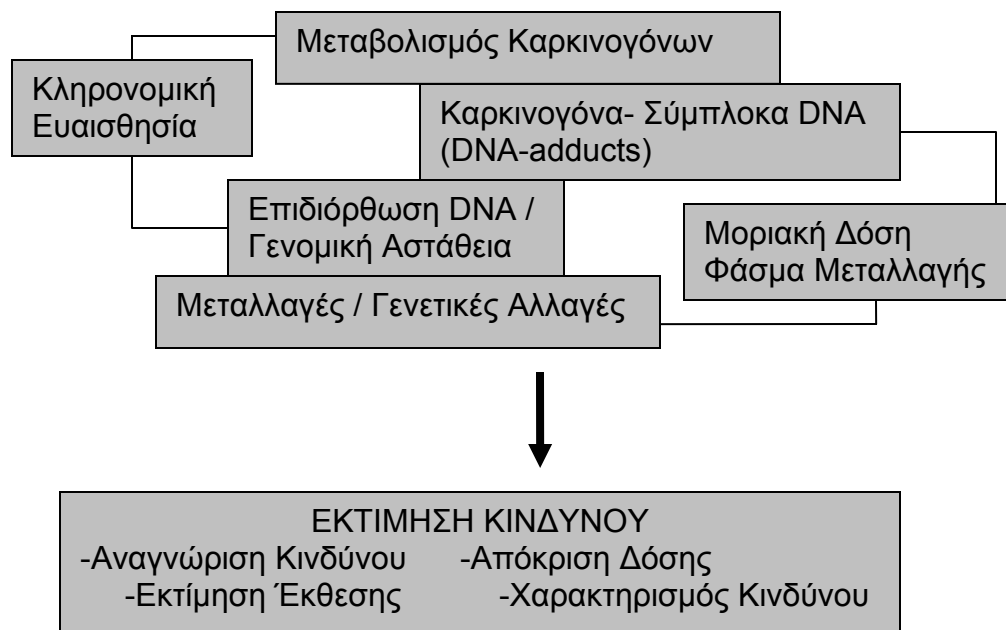
Μια δεύτερη άποψη της αλληλεπίδρασης γονιδίου–περιβάλλοντος απαντάται όταν οι χημικές ουσίες παρεμβαίνουν και μεταβάλλουν το γονίδιο (σχήμα 6). Μόλις ένα προκαρκινογόνο υποστεί μεταβολική ενεργοποίηση προς τελικό καρκινογόνο, μπορεί να ενωθεί ομοιοπολικά με κυτταρικά μακρομόρια,

συμπεριλαμβανομένου του DNA. Αυτή η βλάβη στο DNA μπορεί να αποκατασταθεί από διάφορους μηχανισμούς (Weston and Poirier 1998). Οι διαφορές στο βαθμό και την πιστότητα της επιδιόρθωσης του DNA επηρεάζουν ενδεχομένως την έκταση σχηματισμού καρκινογόνων συμπλεγμάτων (π.χ. βιολογικά αποτελεσματική δόση) και, κατά συνέπεια, το συνολικό ποσό της γενετικής βλάβης που συσσωρεύεται. Οι συνέπειες των πολυμορφισμών σε γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο (κινάσες σερίνης/θρεονίνης, παράγοντες μεταγραφής, κυκλίνες, κυκλινο-εξαρτώμενοι ανασταλείς κινασών, και κυτταρικοί υποδοχείς) είναι λιγότερο σαφής. Παρόλα αυτά, μοριακά επιδημιολογικά στοιχεία προτείνουν ότι ορισμένες κοινές παραλλαγές αυτών των τύπων γονιδίων έχουν έναν ρόλο στην ευαισθησία στη χημική καρκινογένεση (Weston and Godbold 1997; Sun, Keshava et al. 1999). Η μοριακή επιδημιολογία ασχολείται με την αξιολόγηση των πολυμορφισμών ως πιθανούς βιολογικούς δείκτες ευαισθησίας στον ανθρώπινο πληθυσμό (σχήμα 7).

#### **4.3.1. Εμπλοκή της Μοριακής Επιδημιολογίας στην αξιολόγηση του κινδύνου και την πρόληψη του καρκίνου**

Επιδημιολογικές και γενετικές μελέτες προσφέρουν δυνατότητα για προσδιορισμό χαρακτηριστικών προτύπων γενετικού κινδύνου. Μπορούν να οδηγήσουν σε ταυτοποίηση διαφορετικών τύπων πληθυσμών 'σε κίνδυνο', είτε αποτελούμενων από άτομα με βαριά έκθεση σε καρκινογόνα, όπως οι καπνιστές και οι εκτεθειμένοι εργαζόμενοι, είτε φορέων προκαθορισμένων μεταλλαγών στα γονίδια που λόγω της υψηλής διεισδυτικότητας παρέχουν έναν πολύ υψηλό κίνδυνο για τον καρκίνο αυτό καθ' εαυτό.





**Σχήμα 7.** Απόψεις της μοριακής επιδημιολογίας που ερευνούν τις αλληλεπιδράσεις γονιδίου-περιβάλλοντος. Μόλις μεταβολιστούν οι χημικές καρκινογόνες ουσίες σε ενεργά ενδιάμεσα, προκαλούν βλάβη στο DNA (carcinogen-DNA adducts). Η έμφυτη δυνατότητα να αποκατασταθεί η βλάβη του DNA μπορεί να μειώσει ή να αφαιρέσει το γενικό φορτίο ζημίας. Εναλλακτικά, γενετικές μεταλλαγές μπορούν να εμφανιστούν. Ο μεταβολισμός καρκινογόνων και η επισκευή DNA είναι κατηγοριοποιήσιμα γενετικά γνωρίσματα (host factors). Τα συμπλέγματα του DNA (molecular dose) και τα μεταλλακτικά φάσματα είναι μέτρα της έκθεσης. Οι πληροφορίες από έρευνες που μελετούν τα γενετικά γνωρίσματα, καθώς και το μέτρο έκθεσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την αξιολόγηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου στον άνθρωπο.

Στόχος της μοριακής επιδημιολογίας είναι να προσδιοριστούν παράγοντες κινδύνου για την ασθένεια και την έκβασή της. Διαφοροποιήσεις μεταξύ των ανθρώπων όσο αφορά τη βιοκατανομή και το μεταβολισμό καρκινογόνων, το σχηματισμό DNA συμπλεγμάτων, την επιδιόρθωση του DNA, και την πιθανή απόκριση σε προαγωγείς όγκων, έχουν σημαντικές επιπτώσεις στον καθορισμό του κινδύνου εμφάνισης του καρκίνου (risk factors). Οι αυξανόμενες πληροφορίες για την κατανόηση της μοριακής βάσης αυτών των διαφορών και της σύνδεσής τους με τα κρίσιμα βήματα της καρκινογένεση μπορούν να βοηθήσουν σε μελλοντικές προβλέψεις ως προς τον κίνδυνο σε ασθένειες πριν από την κλινική εμφάνιση της ασθένειας.

Οι απόψεις της μοριακής επιδημιολογίας για τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου είναι η αξιολόγηση της έκθεσης σε καρκινογόνους παράγοντες και οι κληρονομήσιμοι και επίκτητοι παράγοντες ευαισθησίας ως προς τον καρκίνο

(Perera and Santella 1993). Η αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των παραγόντων καθορίζει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Όταν συνδυάζεται με τις εργαστηριακές δοκιμές σε καρκινογόνα και την κλασική επιδημιολογία, η μοριακή επιδημιολογία μπορεί να συμβάλει στις τέσσερις παραδοσιακές απόψεις αξιολόγησης του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου: (1) προσδιορισμός κινδύνου, (2) αξιολόγηση της σχέσης δόσης-απόκρισης, (3) αξιολόγηση της έκθεσης, και (4) χαρακτηρισμός κινδύνου. Σημαντικές βιο-ηθικές εκτιμήσεις συνοδεύουν τον προσδιορισμό των ατόμων σε υψηλό κίνδυνο και περιλαμβάνουν αυτονομία, εχεμύθεια, νομιμότητα και αμεροληψία. Τα οφέλη της γνώσης του κινδύνου ενός ατόμου μπορούν να συμψηφισθούν με την ευθύνη του ατόμου εκείνου προς τα μέλη της οικογένειας και την ψυχο-κοινωνική ανησυχία όσο αφορά τον γενετικό έλεγχο των παιδιών. Επομένως, η αβεβαιότητα της αξιολόγησης των σημερινών παραγόντων ατομικού κινδύνου και η περιορισμένη διαθεσιμότητα γενετικών συμβουλευτικών υπηρεσιών υπαγορεύουν ιδιαίτερη προσοχή. Επιπλέον, ευρέως υποστηρίζεται ότι οι γενετικές δοκιμές πρέπει να περιορίζονται σε εκείνες τις καταστάσεις που υπόκεινται στην προληπτική ή θεραπευτική επέμβαση (Kodish 1999).

## 5. ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ P450

### 5.1. Εισαγωγή στο κυτόχρωμα P450

Η βιομηχανία του κυτταρικού μεταβολισμού των θηλαστικών είναι μια πολύπλοκη παράταξη ενζύμων και μεταβολικών προϊόντων, των οποίων ο σκοπός είναι να παράγουν ενέργεια για τη ζωή και να προστατεύουν την αξιοπιστία της αντιγραφής του DNA. Για τους ανθρώπους αυτές οι δραστηριότητες συμβαίνουν σε ένα περιβάλλον, όπου η συνεχόμενη έκθεση σε μια ευρεία ποικιλία ξένων χημικών-ξеноβιοτικών, είναι κάτι το συνηθισμένο.

Κατά την εξέλιξη των ευκαρυωτικών κυττάρων και τη φυλογενετική ποικιλία των οργανισμών, προέκυψαν μηχανισμοί με σκοπό την προστασία του ανθρώπου από τις χημικές προσβολές. Ένα από αυτά τα προστατευτικά συστήματα που αναγνωρίζεται σήμερα και περιέχει ως κεντρικό μέρος μια μοναδική πρωτεΐνη αίμης, ονομάζεται P450. Μέλη αυτής της υπεροικογένειας των αιμοπρωτεϊνών είναι αξιοσημείωτα, λόγω της συντονισμένης δράσης τους και της ευρείας διασποράς τους στην βιολογία. Οι πρωτεΐνες P450 είναι η έκφραση μιας υπεροικογένειας γονιδίων (CYP) που περιέχει πάνω από 40 μέλη στον άνθρωπο (και 1000 στη βιολογία). Στους ανθρώπους (και στα περισσότερα άλλα θηλαστικά) τα P450 παίζουν κρίσιμο ρόλο, καταλύοντας αντιδράσεις λειτουργικές ως προς:

1)τη βιοσύνθεση των στερεοειδικών ορμονών (μετατροπή της χοληστερόλης σε ανδρογόνα, οιστρογόνα, γλυκο- και μέταλλο- κορτικοειδή)

2)το μεταβολισμό ξеноβιοτικών σε ενεργούς μεταβολίτες (ελεύθερες ρίζες) που αλληλεπιδρούν με τα κυτταρικά μακρομόρια (DNA, RNA, πρωτεΐνες) ή υποβάλλονται σε αποτοξίνωση αντιδρώντας με κυτταρικά στοιχεία, όπως η γλουταθειόνη

3)την οξειδωση ακόρεστων λιπαρών οξέων (σύνθεση και καταβολισμό προσταγλανδίνων)

4)το μεταβολισμό λιποδιαλυτών βιταμινών (μετατροπή στις ενεργές μορφές)

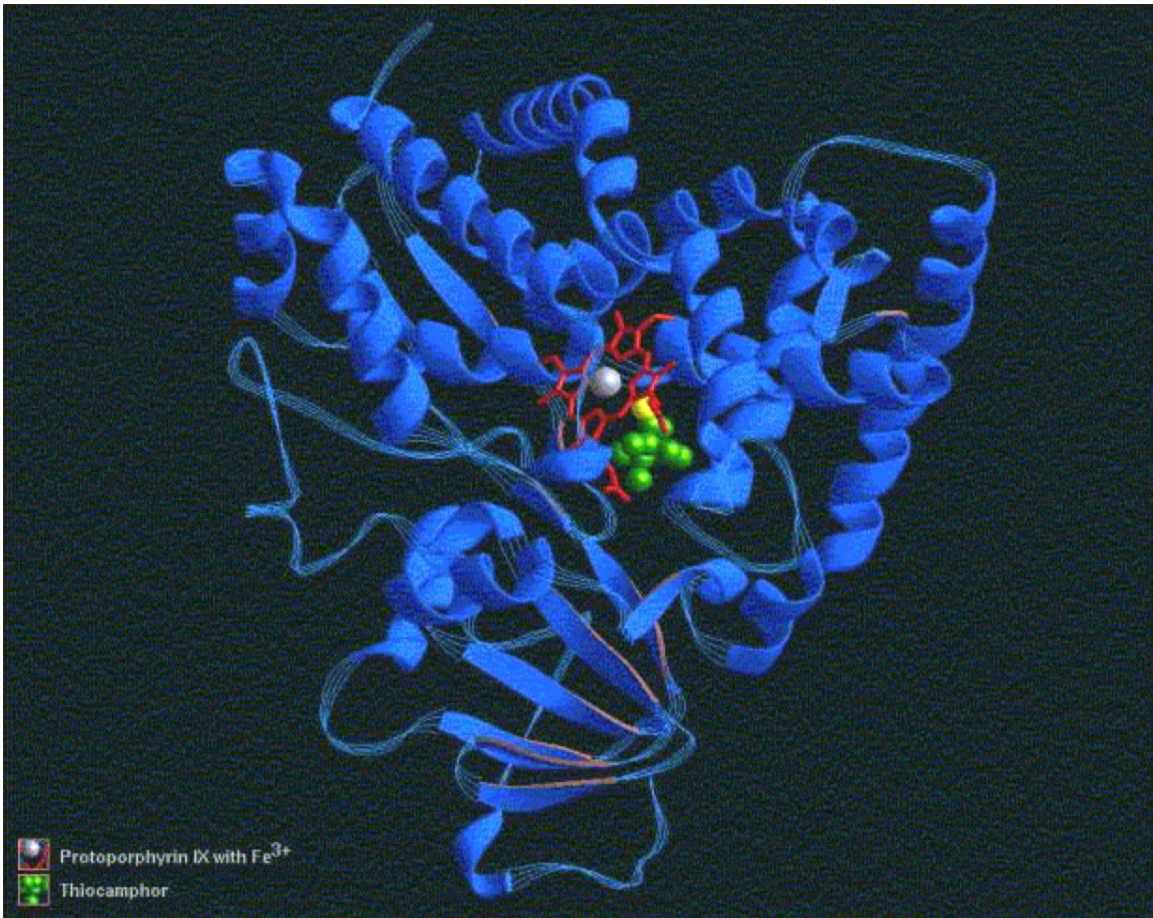
Ξεκάθαρα τα P450 παίζουν βασικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό και την διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης.

## **5.2. Τι είναι τα P450s;**

Τα P450s είναι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες αίμης που ενεργοποιούν το μοριακό οξυγόνο για τον οξειδωτικό μεταβολισμό μιας μεγάλης ποικιλίας λιποφιλικών οργανικών χημικών. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα τα P450s υπάρχουν ως αιμοπρωτεΐνες δεσμευμένες στη μεμβράνη και κάθε μια από τις οποίες περιέχει περίπου 500 αμινοξέα με σίδηρο–πρωτοπορφυρίνη IX ως προσθετική ομάδα. Αυτό που διαφοροποιεί τα P450s από τις άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες αίμης είναι ο ρόλος μιας ομάδας θειόλης από μια κυστεΐνη της πρωτεΐνης, η οποία λειτουργεί ως υποκαταστάτης στο σίδηρο της αίμης. Οι περισσότερες αιμοπρωτεΐνες στα θηλαστικά (π.χ. αιμοσφαιρίνη, κυτόχρωμα b, υπεροξειδάσες) έχουν ένα άζωτο από την ομάδα της ημιδαζόλης της ιστιδίνης που λειτουργεί ως αντίστοιχος σύνδεσμος. Ο ρόλος της ομάδας θειόλης ως υποκαταστάτης διαφοροποιεί την πυκνότητα ηλεκτρονίων του δακτυλίου της πορφυρίνης παρέχοντας έτσι ένα κέντρο ηλεκτρονίων για την ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου (Εικόνα2).

## **5.3. Βιοχημικές ιδιότητες**

Σήμερα έχουμε ευρεία γνώση για το κυτόχρωμα P450. Περίπου 1000 γονίδια για διαφορετικές P450s έχουν κλωνοποιηθεί, αναγνωριστεί οι αλληλουχίες τους και εκφραστεί σε ετερόλογα συστήματα έκφρασης (Nelson, Koymans et al. 1996). Πολλές από τις αντιδράσεις που καταλύονται από το P450 έχουν χαρακτηριστεί, δείχνοντας τη μεγάλη ποικιλία δράσης αυτών των αξιοσημείωτων καταλυτών. Έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 40 διαφορετικοί τύποι αντιδράσεων που καταλύονται από τα P450. Ο αριθμός των χημικών που μπορούν να λειτουργήσουν ως υποστρώματα που μεταβολίζονται από τα P450 είναι τεράστιος και σίγουρα είναι μεγαλύτερος από 1000. Γνωστές ιδιότητες των P450s είναι:



**Εικόνα 2.** Παράσταση στο χώρο, της πολυπεπτιδικής αλυσίδας κυτοχρώματος **P450**. Με μπλε απεικονίζεται η ομάδα της θειόλης και με πράσινο-ροζ η προσθετική ομάδα της σιδηροπρωτοπορφυρίνης IX.

α) Οι πρωτεΐνες P450 περιέχουν περίπου 500 αμινοξέα. Ένα μόριο κυστεΐνης βρίσκεται κοντά στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης παρέχοντας τον απαραίτητο υποκαταστάτη θειόλης για τον σίδηρο της αίμης. Το άμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης είναι πλούσιο σε υδρόφοβα αμινοξέα και πιστεύεται ότι δρα ως βασικό μέρος για τη δέσμευση της πρωτεΐνης στις μεμβράνες.

β) Τα P450s καταλύουν το NADPH και τον οξειδωτικό μετασχηματισμό ενός μεγάλου αριθμού χημικών ενώσεων. Γενικά ένα συγκεκριμένο P450 καταλύει το μεταβολισμό ενός περιορισμένου αριθμού χημικών δομών (όπως τα στεροειδή και τα λιπαρά οξέα) ενώ άλλα P450s έχουν μια ευρεία εξειδίκευση υποστρωμάτων, υποδηλώνοντας ένα ρόλο για μια μοναδική «ενεργή γεωμετρική θέση» για ένα P450.

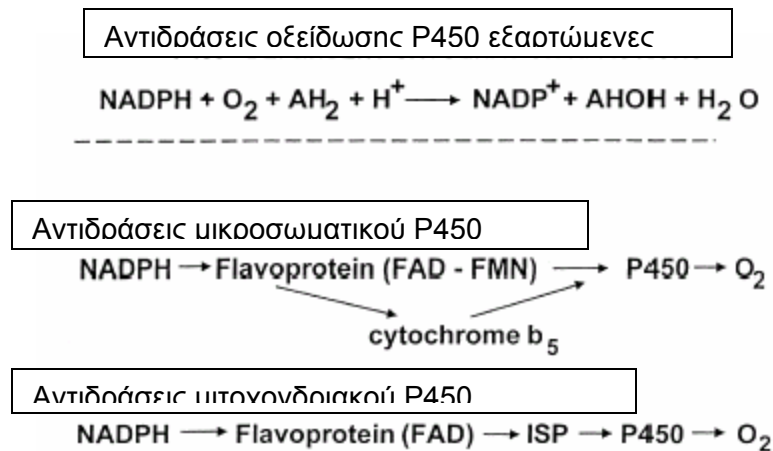
γ) Σε ιστούς όπως το ήπαρ, το έντερο και ο φλοιός του επινεφριδιακού αδένου, η συγκέντρωση των P450s υπερέχει κατά πολύ της συγκέντρωσης άλλων αιμοπρωτεϊνών (όπως τα κυτοχρώματα του μιτοχονδρίου).

δ) Τα P450s διανέμονται σε όλα σχεδόν τα όργανα του ανθρώπινου σώματος, αν και ο τύπος του P450 σε ένα όργανο μοιάζει να είναι συγκεκριμένος.

ε) Η κυτταρική έκφραση πολλών P450s ρυθμίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούνται κατά την έκθεση σε διάφορα χημικά. Η ικανότητα ενός χημικού να λειτουργήσει ως «υποκινητής» γενικά συνδέεται με μια οικογένεια P450s, π.χ. οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες θα υποκινήσουν ένα τύπο P450s ενώ τα βαρβιτουρικά θα υποκινήσουν ένα διαφορετικό τύπο P450s.

#### **5.4. Τι κάνουν τα P450;**

Τα P450s είναι μέλη της τάξης των ενζύμων που ονομάζονται οξυγενάσες. Ειδικότερα, τα P450s είναι μονοοξυγενάσες ή οξειδάσες μεικτής λειτουργίας. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα ένζυμα P450 καταλύουν αντιδράσεις για την οξειδωτική μετατροπή μιας χημικής ένωσης που ακολουθεί την εξίσωση που φαίνεται σχήμα 8. Δύο ηλεκτρόνια που προέρχονται από το NADPH μεταφέρονται στην αιμοπρωτεΐνη από μια φλαβοπρωτεΐνη με την παρουσία ενός οργανικού χημικού και μοριακού οξυγόνου. Η οργανική χημική ένωση οξειδώνεται και ένα άτομο μοριακού οξυγόνου ενσωματώνεται στο χημικό προϊόν. Γενικά τα P450 υποβάλλονται σε μια κυκλική σειρά αντιδράσεων όπου : (α) ο σίδηρος της αιμοπρωτεΐνης αντιδρά με ένα μόριο χημικής για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο, (β) το σύμπλοκο μειώνεται κατά ένα ηλεκτρόνιο που μεταφέρεται από το NADPH, (γ) το νέο σύμπλοκο αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο για να σχηματίσει ένα τριμερές σύμπλοκο σιδηρούχου P450-υποστρώματος-οξυγόνου. (δ) το τριμερές σύμπλοκο μειώνεται περαιτέρω κατά ένα ηλεκτρόνιο που μεταφέρεται από το NADPH. Αυτό δημιουργεί ένα ενδιάμεσο, μειωμένο κατά δύο ηλεκτρόνια (που δεν έχει ακόμη αναγνωριστεί πλήρως), όπου συμβαίνει μια

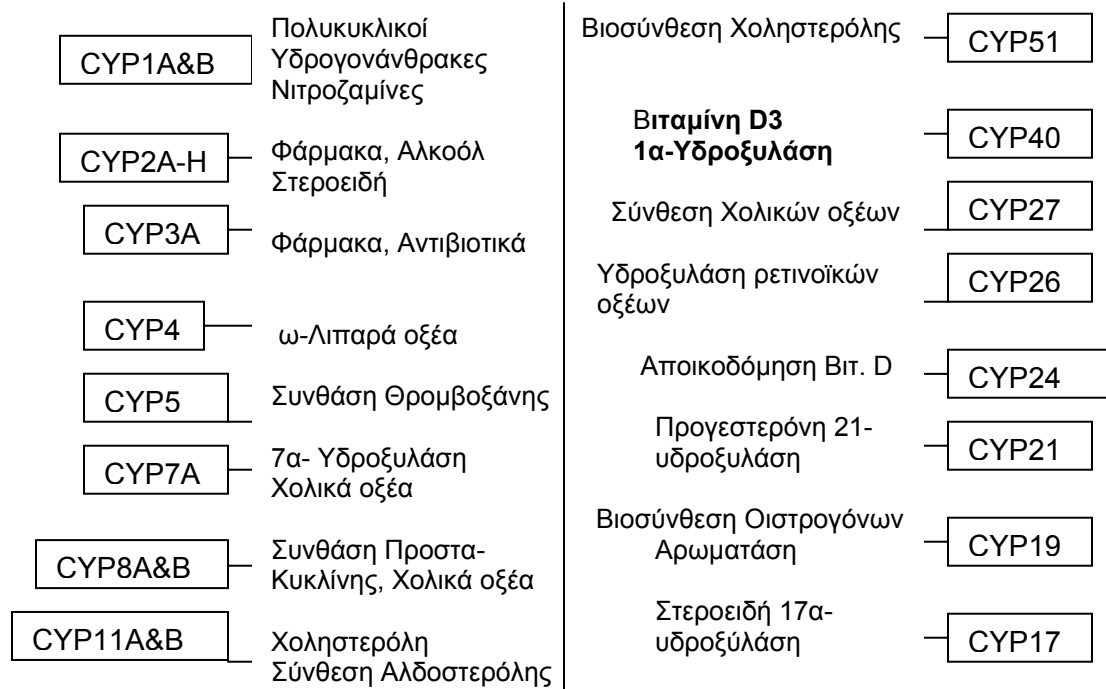


**Σχήμα 8. Η εξίσωση των P450 εξαρτώμενων μεικτών-οξειγενασών αντιδράσεων**

μοριακή αναδιοργάνωση με αποτέλεσμα την ενσωμάτωση του οξυγόνου στο υπόστρωμα του χημικού, (ε)το τελικό σύμπλοκο σταματά την αλληλεπίδραση δημιουργώντας ξανά το μη συμπλοκοποιημένο σιδηρούχο P450 που μπορεί να συμμετέχει στο μεταβολισμό ενός άλλου μορίου του χημικού.

### 5.5. Ονοματολογία της υπερ-οικογένειας των P450

Τα P450s κατηγοριοποιήθηκαν σε οικογένειες και υπο-οικογένειες με βάση την αρχή ότι «η αλληλουχία μιας πρωτεΐνης P450 από μια οικογένεια γονιδίων καθορίζεται συνήθως έχοντας < 40% ομοιότητα με αυτή από κάθε άλλη οικογένεια». Οι υπο-οικογένειες ομαδοποίησαν τις πρωτεΐνες που είχαν ομοιότητα αλληλουχίας <60%. Όταν αυτές οι αρχές εφαρμόστηκαν στα γνωστά P450s απαντάτε μια σχέση δομής όπως φαίνεται στο σχήμα 9. Η εξέταση αυτής της μεθόδου κατηγοριοποίησης των P450s δείχνει ότι υπάρχουν τουλάχιστον 16 οικογένειες P450s και πολλές υπο-οικογένειες. Γονίδια διαφορετικών οικογενειών, υποδηλώνονται με ένα αραβικό αριθμό, π.χ. CYP1, ενώ υπο-οικογενειών με ένα κεφαλαίο λατινικό γράμμα π.χ. CYP1A ή CYP1B. Ο αριθμός ο οποίος καθορίζει το όνομα της οικογένειας καθορίζεται συνήθως από το πότε ανακαλύφθηκε η συγκεκριμένη οικογένεια. Μόνο για δύο οικογένειες τις CYP21 και CYP17 ο αριθμός αυτός έχει ουσιαστική βιοχημική αξία καθώς πρόκειται τις 21-υδροξυλάσες στεροειδών και τις 17-υδροξυλάσες στεροειδών, αντίστοιχα. Μεμονωμένα κάθε CYP ένζυμο ονομάζεται προσθέτοντας ακόμη έναν αραβικό αριθμό π.χ. CYP1A1 (Nelson, Koymans et al. 1996).



**Σχήμα 9. Οικογένειες των γνωστών 40 P450s στον άνθρωπο.**

### **5.6 Ο ρόλος κλειδί των P450 στην ανθρώπινη βιολογία και τα ιατρικά θεραπευτικά**

Τα P450s συμμετέχουν σε ρόλους κλειδιά απαραίτητους για τη διατήρηση της υγείας και της ευημερίας ενός ατόμου. Η μεγαλύτερη ερευνητική έμφαση εστιάζει τον ρόλο που παίζουν τα P450s στον μεταβολισμό των φαρμάκων και άλλων ξеноβιοτικών και στην ικανότητα κάποιων χημικών να προκαλούν καρκίνο. Σε πολλές περιπτώσεις ο σχηματισμός χημικών με υψηλή ηλεκτρονιοφιλικότητα που απαιτείται για τη σύνδεση με το DNA συνέβαινε κατά τον οξειδωτικό μεταβολισμό από τα P450s. Η ενεργοποίηση των διολ-εποξειδίων των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και ο μεταβολισμός των νιτροσαμίνων είναι παραδείγματα όπου τα P450 της οικογένειας CYP1A είναι βασικά για την ενεργοποίηση των ενεργών μεταβολιτών. Ένα δεύτερο μονοπάτι στο οποίο τα P450s μπορούν να συνεισφέρουν στη διαφοροποίηση των κυτταρικών μακρομορίων οδηγώντας σε τοξική απόκριση ή σε μια κυτταρική βλάβη, είναι μέσω του σχηματισμού ιδιαίτερα ενεργών ελεύθερων ριζών, όπως οι ρίζες υπεροξειδίου ή υδροξυλίου, οι οποίες προκύπτουν ως υποπροϊόντα των



αντιδράσεων των P450s. Μια μεγάλη πρόκληση σήμερα είναι η ανάπτυξη μεθόδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην πρόβλεψη δημιουργίας τοξικών (ή καρκινογενετικών) μεταβολιτών που σχηματίζονται κατά το μεταβολισμό από τα P450s.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η κατανόηση των ποικίλων αποκρίσεων στα θεραπευτικά φάρμακα. Έχει αναγνωριστεί ότι κάποια άτομα είναι γρήγοροι μεταβολίτες για κάποια φάρμακα, ενώ άλλα είναι αργοί μεταβολίτες. Η διαφορετική απόκριση οφείλεται, σε πολλές περιπτώσεις, σε διαφορές στην ποσότητα των P450s που εκφράζεται στο έντερο και στο ήπαρ. Η επίδραση της δίαιτας, πριν από την έκθεση σε άλλα φάρμακα που ίσως λειτουργούν ως «υποκινητές», και προσωπικές συνήθειες όπως το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ, είναι αιτίες για την αλλαγή του επιπέδου της έκφρασης των P450s. Πιο πρόσφατα στην εποχή της γενετικής ιατρικής, η παρουσία πολυμορφικών μορφών των P450s με τροποποιημένες δραστηριότητες έχει αναγνωριστεί και λειτουργεί ως βάση των διαφορών στην απόκριση σε ένα φάρμακο.

### **5.7. P450s και καρκίνος- Βιοενεργοποίηση καρκινογόνων**

Τα κυτοχρώματα P450 (CYPs) έχουν την ικανότητα να διαδραματίζουν ρόλους κλειδιά στο μεταβολισμό, όσον αφορά τον καρκίνο ως συνέπεια των ασυνήθιστα ευρέων υποστρωματικών ειδικοτήτων τους. Η πλειονότητα των χημικών καρκινογόνων, τόσο των εξωγενών (ξеноβιοτικών) όσο και των ενδογενών (π.χ. στεροειδών ορμονών), απαιτεί βιομετασχηματισμό σε ενεργοποιημένες μορφές για να είναι καρκινογενετικά. Τα CYPs είναι ουσιώδη στην κατάλυση τέτοιων βιοενεργοποιήσεων. Τα CYPs επιπρόσθετα, παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στον βιομετασχηματισμό των αντικαρκινικών θεραπευτικών φαρμάκων, αυξάνοντας ή μειώνοντας την αποτελεσματικότητά τους, ανάλογα με το πόσο είναι δραστικό το φάρμακο ή οι μεταβολίτες του.

Αρκετά CYPs εμφανίζονται με γονοτυπικές παραλλαγές στους πληθυσμούς, με επακόλουθες φαινοτυπικές διαφορές στην ευπάθεια στα καρκινογόνα και πιθανά στην θεραπευτική δράση των αντικαρκινικών φαρμάκων. Η διαφορετική έκφραση των CYPs μεταξύ καρκινικού και φυσιολογικού ιστού

μπορεί να παρέχει μια βάση για την εκλεκτική ευαισθησία σε αντικαρκινικά φάρμακα, δηλαδή τον περιορισμό της δράσης των φαρμάκων στον όγκο.

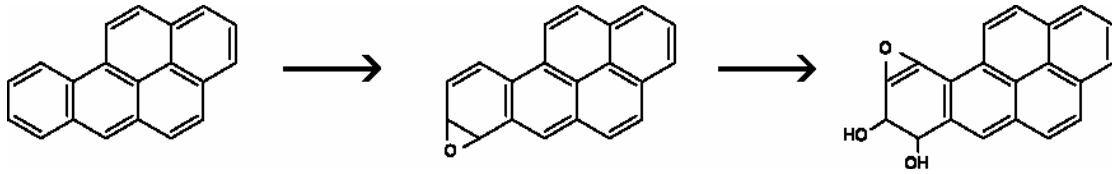
Η ικανότητα των ανθρώπινων CYPs να καταλύουν τη βιοενεργοποίηση αρκετών τάξεων ξενοβιοτικών προκαρκινογόνων (σχήμα 10) έχει διερευνηθεί σε *in vitro* συστήματα.

Αρκετά μεταβολικά βήματα συμπεριλαμβανομένης της υδρόλυσης, από την υδρολάση του εποξειδίου, των ενδιάμεσων του εποξειδίου ή της σύζευξης από ένζυμα της φάσης II θα μπορούσαν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο καθορίζοντας, τελικά, κατά πόσον η αρχική βιοενεργοποίηση του ξενοβιοτικού έχει θετικές ή αρνητικές συνέπειες στην καρκινογένεση.

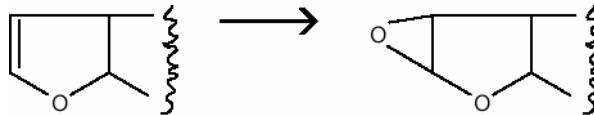
Εκτεταμένες έρευνες σε τρωκτικά έχουν εδραιώσει ότι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), με το βενζο[α]πυρένιο ως πρωτότυπο, αρχικά εποξειδώνονται από το CYP1A1, μετά υδρολύονται από την υδρολάση του εποξειδίου στο αντίστοιχο εγγύς καρκινογόνο, διυδροδιόλη, και τελικά οξειδώνονται ξανά από το CYP1A1, παράγοντας την τελική καρκινογόνο μορφή του διολεποξειδίου. Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει εάν τα προερχόμενα από τον άνθρωπο ένζυμα καταλύουν παρόμοιες βιοενεργοποιήσεις.

Βιοενεργοποιήσεις των PAHs σε εξωηπατικούς ιστούς απαιτούν τη συμμετοχή CYP ενζύμων, πιθανά του CYP1A1 και 1B1, της υδρολάσης του εποξειδίου και της NADPH-εξαρτώμενης αναγωγής και οι σχετικές συγκεντρώσεις των mRNAs για αυτά τα ένζυμα καθορίστηκαν στα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα. Στα κύτταρα από καπνιστές το CYP1A1 mRNA εκφράστηκε σε εξαπλάσια υψηλότερα επίπεδα από το CYP1B1 mRNA, αλλά αυτές οι μορφές

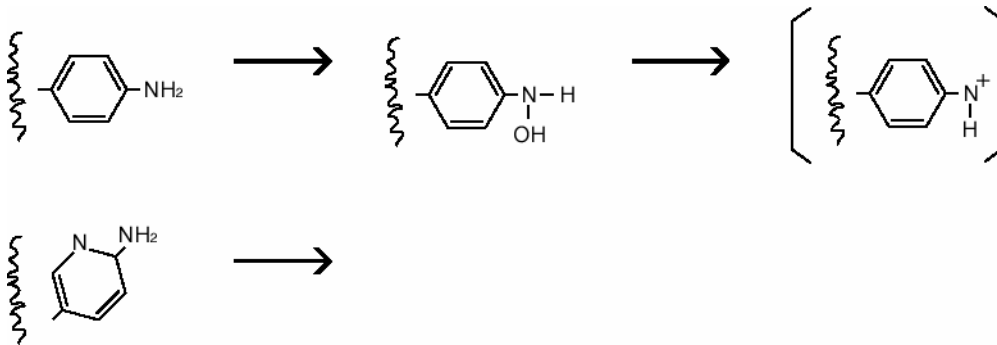
### Εποξειδωση δύο βημάτων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων



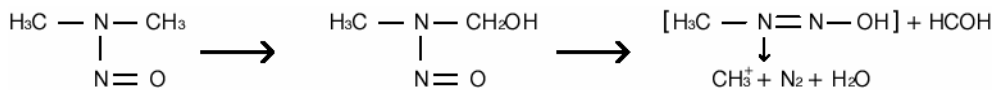
### Άμεση εποξειδωση ετεροκυκλικών αρωματικών ενώσεων



### N-υδροξυλίωση αρυλ-αμινο ομάδων των ετεροκυκλικών ενώσεων



### C-υδροξυλίωση νιτροδοαμινών



### Σχήμα 10. CYP - καταλυόμενες βιοενεργοποιήσεις προκαρκινογόνων

ανιχνεύθηκαν στα κύτταρα στο 10% των μη καπνιστών. Τα επίπεδα του mRNA των άλλων ενζύμων δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών. Η ποικιλία μεταξύ ατόμων στα επίπεδα του mRNA θα μπορούσε να αντανακλά μια παρόμοια ποικιλία στα επίπεδα των ενζύμων και στην ποικιλία στην ευπάθεια στον καρκίνο.

## 5.8. Ευπάθεια στον καρκίνο

Ο εδραιωμένος ρόλος των CYPs στην βιοενεργοποίηση προκαρκινογόνων ξενοβιοτικών και ενδογενών ορμονών σε καρκινογόνες μορφές και η πολυμορφική φύση πολλών CYPs στους ανθρώπινους πληθυσμούς έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι οι αλληλικές παραλλαγές ορισμένων CYPs θα μπορούσαν να προσδώσουν ευπάθεια κατά την έκθεση σε καρκινογόνα κατά τη διάρκεια της ζωής των ατόμων.

Η σχέση των πολυμορφισμών των CYPs με την "ευπάθεια" έχει μελετηθεί σε πολλές μελέτες ελέγχου περιστατικών, (case control studies) που συγκρίνουν περιστατικά καρκίνου με μάρτυρες. Αυτές οι μελέτες υποδήλωναν συσχετίσεις, αλλά δεν μπορούν να διασαφηνίσουν τις χρονικές ή αιτιολογικές σχέσεις μεταξύ των ξενοβιοτικών εκθέσεων, του πολυμορφισμού των CYPs και της νόσου. Μόνο cohort μελέτες (ή προκαρκινικών βλαβών) επαναλαμβανόμενες στο χρόνο και αναλυόμενες για την ανάπτυξη της νόσου μπορούν να διακρίνουν τον 'ευπαθή' φαινότυπο οριστικά.

Σκοπός μελετών είναι να μπορέσουν να συνδυάσουν τους πολυμορφικούς γονότυπους των γονιδίων με την ευαισθησία ορισμένων ατόμων στην εμφάνιση καρκίνου.

Η ενδογενής ουσία, που συνδέεται συχνότερα με τον καρκίνο, είναι το φυσικό οιστρογόνο, 17β-οιστραδιόλη. Δύο CYP-καταλυόμενοι μεταβολίτες των οιστρογόνων έχουν προταθεί να είναι καρκινογόνοι. Ο 16α-υδροξυλιωμένος μεταβολίτης της οξειδωμένης μορφής του οιστρογόνου, οιστρόνη επάγει γενεοτοξική πρόσδεση στο DNA ομοιοπολικά (Osborne, Bradlow et al. 1993) και παράγει έκφραση ενός μετασχηματισμένου φαινοτύπου. Ο 4-ύδροξυ μεταβολίτης του οιστρογόνου έχει ενοχοποιηθεί στον καρκίνο του μαστού εξαιτίας της δυνατότητάς του να συμμετέχει στο μεταβολικό οξειδο-αναγωγικό κύκλο (Yager and Liehr 1996). Δηλαδή, δυο ξεχωριστά μονοπάτια του οιστρογονικού μεταβολισμού που καταλύονται από διαφορετικά CYPs, θα μπορούσαν να ενοχοποιηθούν στον καρκίνο του μαστού.

## 5.9. Το γονίδιο CYP1A1

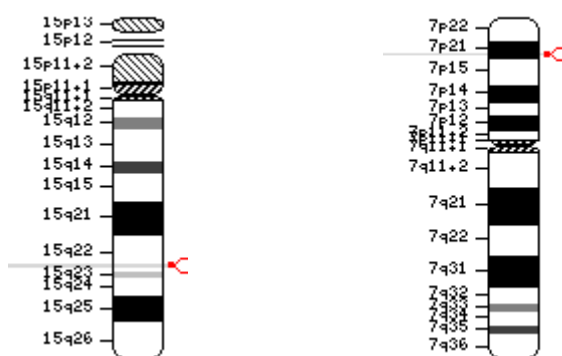
Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για την πολυπεπτιδική αλυσίδα του κυτοχρώματος P450 1A1 (ή P450c ή P<sub>1</sub>-450), ένα P450 ισοένζυμο που σχετίζεται με τη δραστικότητα της αρυλ-υδρογονανθρακικής υδροξυλάσης (AHH). Εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 15q22-q24 (εικόνα 3). Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του αποτελεί ότι καταλύει το πρώτο βήμα του μεταβολισμού των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) παράγοντας ηλεκτρονιόφιλα καρκινογόνα, εποξειδία. Δεν είναι ξεκάθαρος ο μοριακός μηχανισμός αν και έχει αναφερθεί ότι ίσως προκύπτει από πολυμορφισμούς στον υποδοχέα του υποδοχέα των αρωματικών υδρογονανθράκων Ah (Fujii-Kuriyama, Ema et al. 1995). Μια πιθανή σχέση του υψηλού γονιδίου φαινότυπου υποκίνησης του CYP1A1 και των γενετικών πολυμορφισμών μέσα στην περιοχή του υποκινητή CYP1A1 και μέσα στον υποδοχέα του γονιδίου Ah ερευνάται ακόμα (Daly, Fairbrother et al. 1998). Οι πολυμορφισμοί για το γονίδιο αυτό, στις περισσότερες μελέτες, συνεξετάζονται με εκείνους των ενζύμων της φάσης II, GSTs.

Αρκετές αλληλικές παραλλαγές του CYP1A1 έχουν αναφερθεί. Η πρώτη *CYP1A1- 3'UTR* περιλαμβάνει τη μετάθεση της θυμίνης σε κυτοσίνη (T→C) στη θέση 6235 του γενομικού DNA παρέχοντας μια νέα θέση ενδονουκλεάσης πολυμερισμού για αποκοπή από MspI. (Kawajiri, Nakachi et al. 1990). Αυτή η υποκατάσταση συμβαίνει στη 3' μη κωδικοποιούμενη περιοχή, στην κατεύθυνση από το εξόνιο 7 του CYP1A1 δομικού γονιδίου. Οι μεταβολικές επιπτώσεις αντικατάστασης αυτής της μη μεταφραζόμενης περιοχής δεν είναι ξεκάθαρες, αν και υπάρχουν αποδείξεις αυξημένης δραστηριότητας της αιθοξυρεσορουφίνη 0-νιθυλάσης, στα λεμφοκύτταρα αυτών των ατόμων επί απουσίας αυξημένων mRNA επιπέδων (Landi, Bertazzi et al. 1994).

Ενας δεύτερος πολυμορφισμός, *CYP1A1- exon 7 (Ile-Val)*, αφορά μια A→G αντικατάσταση στη θέση 4889 στο εξόνιο 7 του CYP1A1 γονιδίου, με αποτέλεσμα μια αντικατάσταση Ile σε Val, στο κατάλοιπο 462, κοντά στην περιοχή σύνδεσης της αίμης στη CYP1A1 πρωτεΐνη.

### Υποδοχέας αρωματικών υδρογονανθράκων (AhR)

Ο υποδοχέας αρωματικών δέκτης υδρογονανθράκων είναι ένας παράγοντας μεταγραφής που ενεργοποιείται ως υποκαταστάτης. Εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 7q15 (εικόνα 3). Συμμετέχει στη ρύθμιση των βιολογικών αποκρίσεων στους διδιάστατους αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Ο AHR έχει αποδειχθεί ρυθμίζει τη λειτουργία των ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών, όπως το κυτόχρωμα P450. Οι υποκαταστάτες AHR περιλαμβάνουν ποικίλους αρωματικούς υδρογονάνθρακες



**Εικόνα 3.** Το CYP1A1 στο χρωμόσωμα 15 και ο AhR στο χρωμόσωμα 7

### 5.10. Έκφραση των CYPs σε όγκους και χημειοευαισθησία των καρκίνων

Μια δυνητική αντικαρκινική θεραπευτική προσέγγιση βασίζεται στη διαφορετική έκφραση των CYPs μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού. Δηλαδή, αυξημένα επίπεδα CYPs σε όγκους σχετικά με τα επίπεδα στο φυσιολογικό ιστό θα μπορούσαν να αποδώσουν αυξημένη εκλεκτικότητα και ευαισθησία σε αυτά τα προ-φάρμακα που εξαρτώνται από την CYP-μεσολαβούμενη βιοενεργοποίηση. Αυτή η δυνατότητα διερευνήθηκε πιο λεπτομερώς σε μια *in vitro* μελέτη με ανθρώπινα MCF-7 καρκινικά κύτταρα μαστού. Διαμόλυνση ηπατικών CYP2B1 σε αυτά τα κύτταρα τα ευαισθητοποιεί πολύ στην τοξικότητα της κυκλοφωσφαμίδης και της ιφοσφαμίδης, δια της αυξημένης βιοενεργοποίησης (Chen, Waxman et al. 1996). Σε *in vivo* εξωμυτεύματα σε ποντίκια τα CYP2B1 διαμολυσμένα κύτταρα επέδειξαν ουσιαστικά μεγαλύτερη ευαισθησία στις αντικαρκινικές επιδράσεις της κυκλοφωσφαμίδης και χωρίς αυξημένη τοξικότητα στον ξενιστή. Αυτό το παράδειγμα, υποστηρίζει τη γονιδιακή θεραπεία, παρά τις φυσικές διαφοροποιήσεις της έκφρασης των CYPs. Μελέτες που βασίστηκαν στις φυσικές

διαφοροποιήσεις της έκφρασης των CYPs ή της επαγωγιμότητας θα έπρεπε να προσφέρουν καρποφόρα προσέγγιση για τη ανάπτυξη της αντικαρκινικής θεραπείας.

Οι θέσεις έκφρασης του πιο πρόσφατα αναγνωρισμένου μέλους της οικογένειας CYP1, του CYP1B1 είναι αμφιλεγόμενη. Αν και δείξαμε ότι το mRNA του CYP1B1 εκφραζόταν ισχυρά και στο φυσιολογικό ιστό του μαστού (Huang, Fasco et al. 1996), σε μια άλλη μελέτη η CYP1B1 πρωτεΐνη αναφέρθηκε να εκφράζεται μόνο στους όγκους του μαστού. Το CYP1A1 εκφραζόταν σε σημαντικά μεγαλύτερη έκταση σε οισοφαγικούς όγκους από μη καρκινικό οισοφαγικό ιστό (Nakajima, Yokoi et al. 1994).

Διαφορετική έκφραση των CYPs σε καρκινικό και μη καρκινικό ιστό μπορεί επίσης να είναι καταστρεπτική στην αντικαρκινική θεραπεία. Έχει υποτεθεί ότι η μειωμένη ευαισθησία στη θεραπεία με φάρμακα που σχετίζεται με πολυφαρμακευτικά ανθεκτικούς όγκους μαστού θα μπορούσε να είναι συνέπεια μειωμένης CYP-μεσολαβούμενης βιοενεργοποίησης αντικαρκινικών φαρμάκων σε αυτούς του όγκους.

Μεταφορά ενζύμων που βιοενεργοποιούν αντικαρκινικά χημειοθεραπευτικά προφάρμακα σε όγκους έχει εκληφθεί, ως μέσο αύξησης της κυτταροτοξικότητας αυτών των φαρμάκων, με ένα τρόπο που δεν επηρεάζει μη κακοήγη κύτταρα. Η χρήση χημειοευαισθητοποιητών στρατηγικών διαμόλυνσης που χρησιμοποιούν τα CYPs στον ανθρώπινο καρκίνο έχει ξεκινήσει σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και μοντέλα ζώων, αλλά δεν έχει ακόμη προχωρήσει στη φάση I κλινικών δοκιμών.

## **6. Γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση**

### **6.1. Εισαγωγή στα GSTs**

Οι γλουταθειόνη S-τρανσφεράσες ανήκουν σε μια υπέρ οικογένεια ισοενζύμων που καταλύουν τη σύζευξη του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης με μια μεγάλη ποικιλία ξενοβιοτικών καθώς επίσης και ενδογενών υποστρωμάτων, όπως παράγωγα χρωμάτων (bilirubin), στεροειδή, καρκινογόνες ουσίες και μερικές οργανικές ενώσεις. Μερικές συζεύξεις της γλουταθειόνης είναι γνωστές να εμπλέκονται άμεσα στην καρκινογένεση αλλά επίσης και στην αποτοξίνωση αυτών των υποστρωμάτων. Η απόκριση στα φάρμακα που προκαλείται από τα GSTs έχει αναφερθεί σε έντομα, φυτά και επίσης στους όγκους και τα παράσιτα.

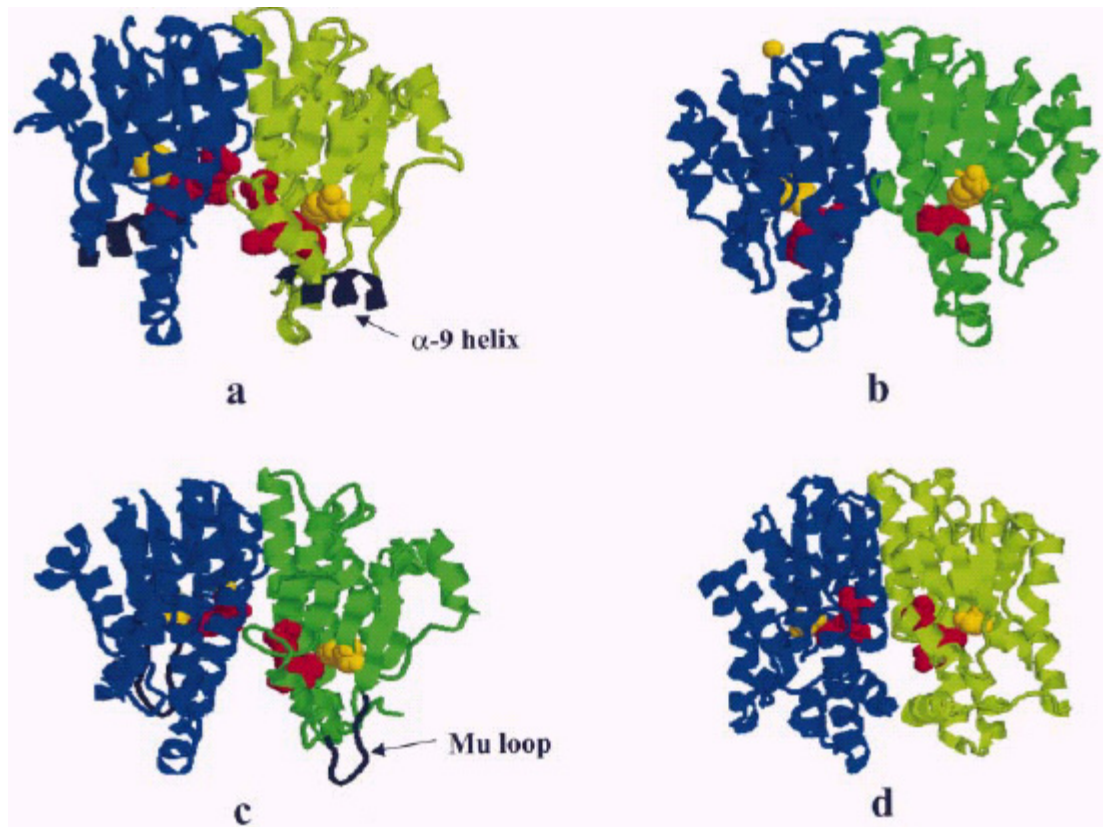
Οι κυτταροπλασματικές GSTs είναι όμο- και ετεροδιμερή που αποτελούνται από δύο υποομάδες των 24-28 kDa, συνδεόμενες με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες με βάση τις αμινοξικές τους αλληλουχίες μπορούν να διακριθούν σε πέντε κλάσεις γνωστές σαν α, μ, π, σ και θ (Hayes and Pulford 1995). Η ομοιότητα μεταξύ των κατηγοριών δεν υπερβαίνει το 30% και βρίσκεται κυρίως μέσα στην N-τερματική περιοχή, που αποκαλείται επίσης περιοχή σύνδεσης της γλουταθειόνης (G-site). Η μη ειδική υδρόφοβη C-τερματική περιοχή (H-site), που προσαρμόζει το ηλεκτρονιόφιλο υπόστρωμα, έχει πολύ μεγαλύτερη μεταβλητότητα από την G-περιοχή (εικόνα 4).

Τα GSTs είναι ευρέως διαδεδομένα ένζυμα. Αν και η ενζυματική δραστηριότητα είναι προφανώς υπεύθυνη για τη γενική λειτουργία των κυττάρων, εμφανίζεται να έχει ποικιλία σημαντικών και μερικές φορές που εκπληκτικών ρόλων στην ανοσία (Ouaisi, Ouaisi et al. 2002).

### **6.2. Ο ρόλος των GSTs στην ενζυματική αποτοξίνωση**

Η δραστικότητα της κυτταροπλασματικής γλουταθειόνης S-τρανσφεράσης στους ευκαρυωτικούς ιστούς οφείλεται στην παρουσία των πολλαπλών ισοενζύμων. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν πολλές χημικές αντιδράσεις ανάμεσα στη γλουταθειόνη και λιπόφιλα μόρια με ηλεκτρονιόφιλα κέντρα, τυπική αντίδραση της φάσης II του μεταβολισμού, παράγοντας υδατοδιαλυτούς και λιγότερο τοξικούς μεταβολίτες, όπως η αναγωγική μορφή της γλουταθειόνης





**Εικόνα 4. Δομές GST.** Οι υπομονάδες διακρίνονται με πράσινο και μπλε και οι δομές παρουσιάζονται ώστε να τονίζουν τις σχετικές ρυθμίσεις γύρω από τα ενεργή περιοχή της δεξιά υπομονάδας και το εσωτερικό της αριστερής. Τα απαραίτητα για την κατάλυση τμήματα της τυροσίνης και σερίνης διακρίνονται με κίτρινο, ενώ ο υποκαταστάτης με τον οποίο το ένζυμο δημιουργεί σύζευξη φαίνεται με κόκκινο, προσδιορίζοντας τον τόπο της ενεργής πλευράς. Με μαύρο διακρίνονται τα ειδικά χαρακτηριστικά των δομών α και μ κλάσεων. a) α-, b) π-, c) μ-, d) θ-κλάση.

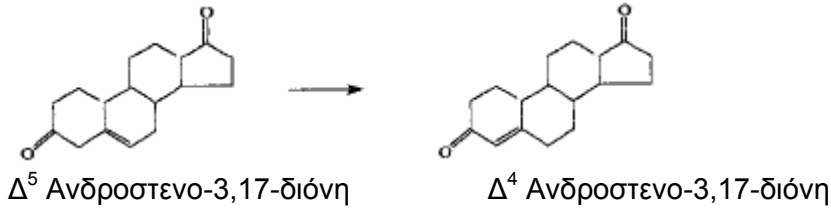
(GSH), που αποβάλλονται ευκολότερα από το κύτταρο.

Ποσοτικά, σύζευξη με τη GSH, που καταλύεται από τα GSTs, είναι η κύρια αντίδραση της φάσης II. Τα GSTs καταλύουν επίσης πυρηνόφιλες αρωματικές υποκαταστάσεις. Αυτή η διαδικασία ενεργοποίησης περιλαμβάνει ένα επιθειώδες ιόν, που αντιδρά με πυρηνόφιλα και πιθανά με το DNA, ειδικά στο N7 της γουανίνης (Hayes and Pulford 1995). Επίσης αντιδράσεις προσθήκης Michael σε α,β-ακόρεστες κετόνες και εποξειδία και αναγωγή υδροπεροξειδίων (σχήμα 11).

Διάφοροι μηχανισμοί μεταφοράς έχουν περιγραφεί για την αποβολή των συμπλόκων της γλουταθειόνης (Sheehan, Meade et al. 2001). Μολαταύτα, η μεταλλαξογόνος δράση πολλών χημικών ενώσεων, με βάση τα Ames tests

(ιδιαίτερα των αλοαλκανίων και αλοαλκενίων) συμπεριλαμβανομένων 1,2,3,4-διεποξυβουτάνιο, επιβρωμουδρίνη, 1,3-διχλωροακετόνη και 1,2-διβρωμοαιθάνιο, αυξάνεται από τη δράση των GSTs (Thier, Pemble et al. 1996).

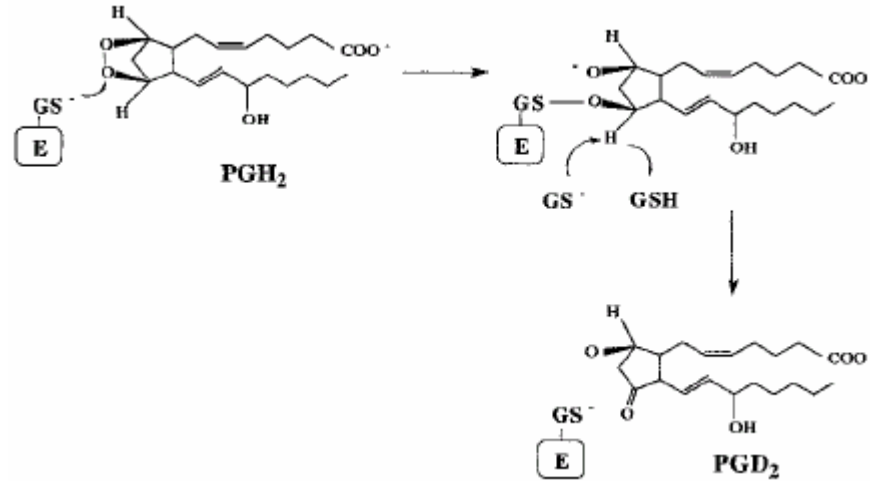
**Ισομερισμός Στεροϊδών**



**Ισομερισμός ρετινοϊκών οξέων**



**Σύνθεση Προσταγλαδίνης**



**Σχήμα 11.** Η δραστικότητα των GSTs οφείλεται στην παρουσία πολλών ισοενζύμων που καταλύουν επιπρόσθετες αντιδράσεις κατά την αποτοξίνωση.

### 6.3. Το γονίδιο GSTM1

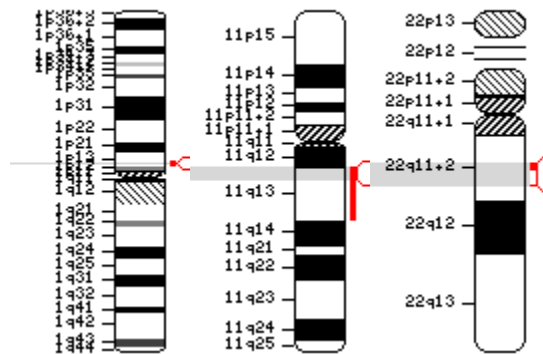
Ανήκει στην τάξη των GSTμ. Εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 1q.13.3 (εικόνα 5). Ανάμεσα στους διάφορους πολυμορφισμούς που έχουν βρεθεί ξεχωρίζει ένα αλληλόμορφο στο οποίο λείπει σχεδόν ολόκληρο το γονίδιο και δεν παράγει λειτουργικό GSTM1 (null allele, GSTM1-0). Η συχνότητα των ομόζυγων ελλείψεων του γονιδίου στους Καυκάσιους πληθυσμούς αγγίζει το 50% (Smith, Stanley et al. 1995). Έτσι οι περισσότεροι φαινοτυπικά ενεργοί GSTM1 είναι στην πραγματικότητα ετερόζυγοι παρά μη φέροντες απαλοιφή ομόζυγοι φορείς. Ωστόσο μεγάλες διαφοροποιήσεις ως προς τις παραπάνω συχνότητες υπάρχουν σε διαφορετικές εθνολογικές ομάδες. Τα περισσότερα από τα υποστρώματά του αδρανοποιούνται πλήρως, δείχνοντας έτσι πιθανό προστατευτικό χαρακτήρα απέναντι στην καρκινογένεση. Τέτοια υποστρώματα είναι πολλά διολεποξειδία των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων.

### 6.4. Το γονίδιο GSTP1

Ανήκει στην τάξη GSTπ. Εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 11q13 (εικόνα 5). Η πρωτεΐνη αυτή είναι η πιο διαδεδομένη GST πρωτεΐνη στους ιστούς του πνεύμονα, στους οποίους το GSTM1 εκφράζεται ασθενώς. Σχετίζεται με την ανενεργοποίηση μιας ποικιλίας καρκινογόνων που οφείλονται στο καπνό του τσιγάρου, όπως το ενεργοποιημένο από τα κυτοχρώματα BP, σε βενζο(α)πυρένιο-7,8-διολ-9,10-εποξειδίο (BPDE) ή η ακρολεΐνη (Hayes and Pulford 1995). Εμφανίζεται επίσης σύμφωνα με κάποιες εργασίες υπερεκφραζόμενο σε κάποιους τύπους καρκίνου του πνεύμονα, σχετιζόμενο έτσι και με ανθεκτικότητα του όγκου σε χημειοθεραπευτικά πρωτόκολλα. Μια θέση πολυμορφισμού αποτελεί η μεταστροφή A→G στο κωδικόνιο 104 με αποτέλεσμα την αντικατάσταση μιας βαλίνης από ισολευκίνη (Val-Ile). Η θέση αυτή εντοπίζεται στην τεταρτοδιάταξη της πρωτεΐνης σε μια υδροφοβική θέση δέσμευσης του υποστρώματος. Έχει μάλιστα δείχτει πως η ισολευκίνη στο 104 αμινοξικό κατάλοιπο έχει σαν αποτέλεσμα χαμηλότερη δραστηριότητα απέναντι σε αρκετά καρκινογόνα.

## 6.5. Το γονίδιο GSTT1

Ανήκει στην κλάση GSTθ. Εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 22q11.2 (εικόνα 5). Παρόμοια με το GSTM1, το γονίδιο αυτό χαρακτηρίζεται από μια μεγάλη απαλοιφή σχεδόν ολόκληρης της κωδικής του περιοχής. Ο ομόζυγος μηδενικός γονότυπος του GSTT1 είναι γενικά σπανιότερος του GSTM1 (Hengstler, Arand et al. 1998). Μεταβολικά το GSTT1 διαφέρει επιπρόσθετα από το GSTM1 καθώς το τελευταίο αποτοξινώνει τα περισσότερα από τα υποστρώματά του, ενώ το GSTT1 ενεργοποιεί τα αλοαλκάνια σε καρκινογόνα.



**Εικόνα 5.** Το GSTM1, GSTP1 και GSTT1 στα χρωμοσώματα 1,11 και 22 αντίστοιχα

## **7. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ**

### **7.1. ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **7.1.1. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από περιφερικό αίμα**

Συλλέγονται περίπου 5 ml περιφερικού αίματος σε σωληνάριο με αντιπηκτικό (K-Na EDTA) και διατηρούνται σε θερμοκρασία 4°C. Γίνεται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (απύρηνα) με επώαση του αίματος σε ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer A). Ακολουθεί ήπια ανάδευση του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση σε 2500 rpm. Το κυτταρικό ίζημα συλλέγεται, επαναδιαλύεται σε διάλυμα (Buffer B) και επωάζεται στους 37°C για 30 min. Στη συνέχεια προστίθεται 1/ 4 του όγκου NaOCl<sub>4</sub> και το διάλυμα επωάζεται στους 65°C για 40 min. Ακολουθεί εκχύλιση του DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο και λαμβάνεται το υπερκείμενο. Το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 2.5 όγκων απόλυτης αιθανόλης σε θερμοκρασία -20°C, φυγοκέντριση στους 4°C σε 13.000 rpm, έκπλυση του κατακρημνισμένου DNA με 70% αιθανόλη και επανάληψη της φυγοκέντρισης. Το DNA επαναδιαλύεται σε 50 μl TE διάλυμα και ετοιμάζονται διαλύματα εργασίας με 10-πλάσια αραιώση σε δις απεσταγμένο νερό.

#### **7.1.2. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από ιστό**

Ο ιστός τεμαχίζεται και ομογενοποιείται σε διάλυμα λύσης (Buffer B). Στη συνέχεια προστίθεται πρωτεϊνάση K σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml και επωάζεται στους 60°C. Ακολουθεί εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) με το πρωτόκολλο φαινόλης/ χλωροφορμίου, όπως περιγράφηκε παραπάνω, και αποδόμηση του RNA με RNάση (100μg/ml) για μια ώρα στους 37°C. Η κατακρήμνιση του DNA πραγματοποιείται με την προσθήκη 2.5 όγκων απόλυτης αιθανόλης και 0.5 όγκου οξικού αμμωνίου (ή 1/ 20 όγκου NaCl 5M). Η καθαρότητα και συγκέντρωση του DNA προσδιορίζεται με φωτομέτρηση στα 260 nm. Ηλεκτροφόρηση σε 1% αγαρόζη και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί η ακεραιότητα του DNA.

### **7.1.3. Απομόνωση ολικού RNA από ιστό**

Η απομόνωση ολικού RNA από ιστό πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του διαλύματος Trizol σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (29). Το διάλυμα αποτελεί παραλλαγή της μεθοδολογίας που έχει προταθεί από τους Chomczynski and Sacchi (1987) και βασίζεται στη λύση των κυττάρων με θειοκυανιούχο γουανίδιο και η απομάκρυνση των λιπιδίων, πρωτεϊνών και DNA με όξινη φαινόλη. Το ίζημα RNA, (όπως αυτό σχηματίζεται μετά την ομογενοποίηση και λύση του ιστού, προσθήκη 1/ 10 όγκου  $\text{CHCl}_3$ , επώαση σε πάγο για 15 min και κατακρήμνιση με ίσο όγκο ισοπροπανόλης), εκπλένεται με 75% αιθανόλη. Όλα τα υδατικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του RNA και την τελική επαναιώρησή του έχουν προηγουμένα κατεργαστεί με DEPC για 7 h σε θερμοκρασία δωματίου σε συγκέντρωση 0.1% για αδρανοποίηση των RNασών του ιστού. Το DEPC αδρανοποιείται με αποστείρωση του διαλύματος. Η καθαρότητα και συγκέντρωση του RNA προσδιορίζεται με φωτομέτρηση στα 260 nm και 280 nm. Ηλεκτροφόρηση σε 1% αгарόζη και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί η ακεραιότητα του RNA.

### **7.1.4 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR)**

#### **Αρχή μεθόδου**

Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση επινοήθηκε το 1985 από τον Mullis *et al* (Saiki *et al*, 1985) και έφερε πραγματική επανάσταση στη μοριακή βιολογία με εφαρμογές από τη βασική έρευνα στην κλινική πράξη. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται σε μικρό χρόνο (2-3h) η ειδική ενίσχυση με εκθετικό τρόπο συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, ώστε να είναι δυνατή η μελέτη και περαιτέρω χειρισμός τους. Το υπόστρωμα DNA επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει τη θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση, μείγμα δεσόξυριβονουκλεοτιδίων και ζεύγος εκκινητών (primers). Αρχικά γίνεται θερμική αποδιάταξη του DNA στους  $95^{\circ}\text{C}$  για 5 min και ακολουθούν 30-35 κύκλοι (επαναλήψεις) των σταδίων:  $95^{\circ}\text{C}$  –αποδιάταξη,  $55-60^{\circ}\text{C}$  –υβριδισμός των εκκινητών και  $72^{\circ}\text{C}$  –πολυμερισμός, διάρκειας περίπου 30 sec το καθένα. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του

DNA σύμφωνα με την εξίσωση  $N=n(1+e)^c$ , όπου N η τελική ποσότητα του προϊόντος, n η αρχική ποσότητα του υποστρώματος, e η απόδοση της αντίδρασης και c ο αριθμός των κύκλων της PCR. Η μεγάλη απόδοση της αντίδρασης κάνει δυνατή την ενίσχυση αλληλουχιών, ακόμα και με ελάχιστο αριθμό αρχικών αντιγράφων ή όταν το DNA έχει υποστεί σχετική αποδιάταξη.

Η ειδικότητα της PCR αντίδρασης ως προς την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί εξαρτάται από τους εκκινητές. Στατιστικά έχει βρεθεί ότι όταν μια αλληλουχία DNA έχει μέγεθος τουλάχιστον 20 bp (base pairs), είναι μοναδική στο γονιδίωμα. Κατά συνέπεια για να επιτευχθεί ειδική ενίσχυση αλληλουχιών πρέπει οι εκκινητές να είναι τουλάχιστον 20-μερή. Το μέσο αυτό μήκος των εκκινητών τους δίνει τέτοια θερμοδυναμική σταθερότητα, ώστε να αναδιατάσσονται στη θερμοκρασία των 55°C περίπου.

Η επίτευξη ικανοποιητικής απόδοσης και ειδικότητας της αντίδρασης πολυμερισμού εξαρτάται κυρίως από:

- την επιλογή κατάλληλου ζεύγους εκκινητών
- τη συγκέντρωση ιόντων Mg, (απαραίτητος συν-παράγοντας για τη δράση της πολυμεράσης)
- τον προσδιορισμό ακριβούς θερμοκρασίας αναδιάταξης των εκκινητών

Με δεδομένο ζεύγος εκκινητών, η κανονικοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης περιλαμβάνει πειράματα με βαθμωτές τιμές θερμοκρασίας και ιόντων μαγνησίου, ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό.

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων απαραίτητη προϋπόθεση είναι να τερματιστεί η αντίδραση ενώ ακόμα βρίσκεται στην εκθετική της φάση. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει γραμμική αντιστοίχιση της τελικής ποσότητας προϊόντος στην αρχική ποσότητα υποστρώματος. Συνήθως επιτελούνται προκαταρκτικά πειράματα με διαδοχικές αραιώσεις αρχικού υποστρώματος (δημιουργία πρότυπης καμπύλης), ώστε να βρεθούν οι συνθήκες εκείνες όπου διατηρείται η γραμμική σχέση.

Ακόμα περισσότερο αξιόπιστη είναι η συνενίσχυση με την αλληλουχία στόχο, σταθερής ποσότητας υποστρώματος, στο οποίο οι θέσεις αναγνώρισης των εκκινητών ταυτίζονται με αυτή της αλληλουχίας-στόχου (Siebert and Larrick, 1992). Έτσι επιτελείται συναγωνισμός ανάμεσα στις δύο αλληλουχίες που

συνενισχύονται. Η αφθονία των αρχικών αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου εκφράζεται ως ο λόγος της έντασης της ζώνης της ως προς την ένταση της ζώνης του συναγωνιστή.

#### **7.1.5. Πέψη με περιοριστικά ένζυμα (Restriction Fragment Length Polymorphisms- RFLPs)**

Κάποια άτομα κληρονομούν ένα διαφορετικό αλληλόμορφο από τον κάθε γονιό παράγοντας το χαρακτηριστικό πρότυπο των δύο ζωνών. Απόκλιση από τον αναμενόμενο κανόνα μπορεί να οφείλεται σε φυσιολογική γενετική παραλλαγή ή μπορεί να είναι αποτέλεσμα παραγόμενα από αναλυτικές καταστάσεις.

Για τον πολυμορφισμό CYP1A1 m1 το 340 bp PCR προϊόν υφίσταται πλήρη πέψη με το περιοριστικό ένζυμο with *MspI* (New England Biolabs Inc., U.S.A) (30). Αν το προϊόν παραμείνει άκοπο τότε το δείγμα χαρακτηρίζεται ως wt (wild type, επικρατές τύπος) και ως wt/m1 αν το προϊόν της πέψης παράγει πρότυπο που αποτελείται από δύο κλάσματα DNA μεγέθους 134 bp και 206 bp, ακολουθούμενα από το 340 bp PCR προϊόν. Εάν παρατηρούνται μόνο τα κλάσματα DNA μεγέθους 134 bp και 206 bp, τότε το πρότυπο χαρακτηρίζεται ως m1.

#### **7.1.6. Μέθοδος ανάστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (RT-PCR)**

Στη μέθοδο αυτή το αρχικό υπόστρωμα είναι το RNA, όπου αρχικά μετατρέπεται σε cDNA, το οποίο χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την αντίδραση πολυμερισμού με τη χρήση του ενζύμου Thermoscript Reverse Transcriptase.

Εκτελέστηκε αντίδραση από 3 µg ολικού RNA για 1h στους 52°C, χρησιμοποιώντας 15 U Thermoscript reverse transcriptase, 40 U RNaseOut, 50 ng random hexamers και 1.0 mM από κάθε dNTP σε τελικό όγκο 20 µl με 1x First Strand cDNA Synthesis Buffer που περιέχει 5 mM dithiothreitol (DTT), ακολουθώντας επώαση για 20 min στους 37°C με 2 U of *E. coli* RNaseH προς αποφυγή RNA επιμόλυνσης του cDNA, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Life Technologies Ltd., U.K.). Το προϊόν της αντίδρασης μπορεί να



χρησιμοποιηθεί απευθείας για την ενίσχυση κωδικών αλληλουχιών γονιδίων με τη χρήση της PCR.

#### **7.1.7. Ηλεκτροφόρηση DNA**

Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% ή/και πολυακρυλαμιδίου 8%. Η επιλογή του πηκτώματος εξαρτάται αφενός από το μέγεθος του DNA προϊόντος και αφετέρου από τη διακριτική ικανότητα που προσδοκείτε να επιτευχθεί. Και οι δύο τύποι πηκτωμάτων σχηματίζονται σε υδατικό μέσο που περιέχει 1X TBE ρυθμιστικό διάλυμα. Η πήξη επιτυγχάνεται για την αγαρόζη με πτώση της θερμοκρασίας, αφού πρώτα έχει βράσει, ενώ το ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται με την προσθήκη TEMED και υπερθειϊκού αμμωνίου 10%.

#### **7.1.8. Χρώση με νιτρικό άργυρο**

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου τοποθετείται σε διάλυμα αιθανόλης 10% και οξικό οξύ 0.5% για μονιμοποίηση (10 min). Στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε διάλυμα  $\text{AgNO}_3$  0.1% (w/v) (20 min) σε ημίφως. Εκπλένεται με νερό και προστίθεται 0.4 N NaOH και 0.15% (v/v) φορμαλδεΰδη. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος  $\text{NaCO}_3$  0.75% (w/v).

#### **7.1.9. Ψηφιακή επεξεργασία αποτελεσμάτων**

Το αποτέλεσμα των πηκτωμάτων αποτυπώνονται σε ηλεκτρονική μορφή με τη χρήση scanner Agfa SnapScan 1212u (Agfa-Gevaert N.V., Belgium). Η αμιγής πυκνότητα (integrated density,  $ID=(\text{mean OD}-\text{background OD}) \cdot \text{pixels}$ ; OD optical density) των ζωνών χρησιμοποιήθηκε ως ποσοτική παράμετρος σύγκρισης και υπολογίστηκε με ψηφιακή επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος Adobe Photoshop 6.0 software (Adobe Systems Inc., U.S.A.).

### 7.1.10. Στατιστική ανάλυση

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και των στατιστικά σημαντικών διαφορών στην ανάλυση των γενετικών πολυμορφισμών στο πληθυσμό χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό μοντέλο λογιστικής εξάρτησης (logistic regression) και υπολογίστηκαν οι λόγοι σχετικού κινδύνου (odd ratios) και τα 95% όρια εμπιστοσύνης (confidence interval), ώστε να γίνει εκτίμηση των δεικτών κινδύνου (risk estimate factors) και να διαπιστωθεί αν κάποιος πληθυσμός με συγκεκριμένο γονότυπο παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία ως προς την εμφάνιση της νόσου του καρκίνου. Εφαρμόστηκαν μη παραμετρικές διαδικασίες (Non-parametric procedures), ANOVA, test of homogeneity, δοκιμασία  $\chi^2$  ( $\chi^2$ -test) για τη σύγκριση των γονότυπων μεταξύ των ασθενών και των φυσιολογικών δειγμάτων και Mann-Whitney test. Η στατιστική ανάλυση για τα επίπεδα έκφρασης mRNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Student t-test ή ανάλυση διακύμανσης,  $\chi^2$ -test. Όλοι οι στατιστικοί υπολογισμοί εκτελέστηκαν με τη χρήση του προγράμματος SPSS 11.0 (SPSS Inc., U.S.A.).

Η εκτίμηση των γονότυπων βασισμένων σε ατομικές συχνότητες αλληλομόρφων έγινε με βάση τη θεωρία της γενετικής πληθυσμού Hardy-Weinberg ισορροπία (equilibrium Hardy-Weinberg). Το μοντέλο αυτό δηλώνει ότι υπάρχει προβλεπόμενη σχέση μεταξύ συχνότητας αλληλομόρφων και συχνότητας γονότυπου σε μια θέση χρωμοσώματος.

## **7.2. ΔΕΙΓΜΑΤΑ**

### **7.2.1. Δείγματα για τη μελέτη στον καρκίνο του μαστού**

Συλλέχθηκε περιφερικό αίμα από 207 Ελληνίδες ασθενείς με διαγνωσμένο καρκίνο μαστού, ηλικίας 31-79 ( $56,3 \pm 12,5$ ) και από 171 υγιείς Ελληνίδες, ηλικίας 29-82 ( $56,7 \pm 14,1$ ) από το διαγνωστικό και ερευνητικό κέντρο μαστού 'Πρόληψις', Αθήνα. Το οικογενειακό ιστορικό των υγιών ατόμων ήταν ελεύθερο καρκίνου.

Για να μελετηθεί ο λειτουργικός ρόλος των CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 και GSTT1 ως προς τα mRNA μεταγραφικά τους πρότυπα, αναλύθηκαν 31 δείγματα όγκων από ασθενείς με καρκίνο μαστού, ηλικίας 36-76 ( $56,0 \pm 10,3$ ) ετών, και αντίστοιχος παρακείμενος φυσιολογικός ιστός, από το διαγνωστικό και ερευνητικό κέντρο μαστού 'Πρόληψις', Αθήνα. Όλα τα δείγματα αντιστοιχούσαν σε πρωτογενείς όγκους και χαρακτηρίστηκαν ως σποραδικοί. Τα κλινικά στοιχεία τους ήταν διαθέσιμα (στάδιο, βαθμός, ιστολογικός τύπος, ηλικία).

### **7.2.2. Δείγματα για τη μελέτη στον καρκίνο του πνεύμονα**

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής συλλέχθηκε περιφερικό αίμα από 122 έλληνες ασθενείς, ηλικίας  $64.6 \pm 10.5$ , πρόσφατα διαγνωσμένοι με καρκίνο του πνεύμονα, από τους οποίους 107 ήταν άντρες και 17 γυναίκες. Επίσης συλλέχθηκε αίμα από 178 υγιείς έλληνες, ηλικίας  $58.8 \pm 12.8$ , από τους οποίους 148 ήταν άντρες και 30 γυναίκες. Το οικογενειακό ιστορικό των υγιών ατόμων ήταν ελεύθερο καρκίνου. Η συλλογή πραγματοποιήθηκε στο Νοσοκομείο 'Σωτηρία', Αθήνα, και έτσι ώστε τα δείγματα των υγιών ατόμων να είναι αντίστοιχης ηλικίας και φύλλου. Κλινικοί παράμετροι, όπως στάδιο και ιστολογικός τύπος, καθορίστηκαν με ιστολογική εξέταση των μετεγχειρητικά δειγμάτων όγκου. Κατά τη διάρκεια της αιμοληψίας ζητήθηκε από τα άτομα που συμμετείχαν η συμπλήρωση ερωτηματολογίου με κοινωνικό-δημογραφικές πληροφορίες, πληροφορίες έκθεσης σε προκαρκινογόνα, οικογενειακό ιστορικό καρκίνου και ατομικό αναμνηστικό.

### 7.2.3. Ερωτηματολόγιο

Για τη συλλογή των δειγμάτων καρκίνου του πνεύμονα χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ερωτηματολόγιο

Όνοματεπώνυμο	Ηλικία
Επάγγελμα Καταγωγή και τόπος διαμονής κατά τη διάρκεια της ζωής Κάπνισμα (έναρξη, ποσότητα, διακοπή) Οικογενειακό Ιστορικό Καρκίνου σε γονείς, αδέρφια και παιδιά	
Ατομικό Αναμνηστικό (φυματίωση, ΧΑΠ, άλλα) Φάρμακα (χρόνια λήψη) Διάγνωση (ιστολογικός τύπος καρκίνου πνεύμονα) Στάδιο / Μεταστάσεις / Διαφοροποίηση Θεραπεία (χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, εγχείρηση, συνδυασμός)	
Ημερομηνία: Διάγνωσης καρκίνου πνεύμονα Έναρξης Θεραπείας Δειγματοληψίας	
Επιβίωση	

### 7.3. ΥΛΙΚΑ

#### 7.3.1. Εκκινητές

Τα παρακάτω ζεύγη εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν για την εκλεκτική ενίσχυση των αντίστοιχων γονιδίων:

#### Ανάλυση γενετικών πολυμορφισμών

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή
CYP1A1	FP: CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT RP: TAGGAGATCTTGTCTCATGCCT
GSTM1	FP: GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC RP: GTTGGGGTCAAATATACGGTGG
GSTT1	FP: ATGACCCCCACACCCACAGT RP: CCACATTCCCAGCCTCACCT
β-globin	FP: CAACTTCATCCACGTTCCACC RP: GAAGAGCCAAGGACAGGTAC

FP, forward primer; RP, reverse primer.

#### Ανάλυση σε μεταγραφικό επίπεδο και γενομικής διαφοροποίησης

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή	bp
CYP1A1	FP: CTCTTAGGTGCTTGAGAGCCC RP: CATCAGCATCTATGTGGCCC	244
AhR	FP: GTCTATTTATCTCTATCCTG RP: TTTTACTATCTTGAAAGAGCCC	212
GSTM1	FP: TGAGAAACTGAAGCCAAAGT RP: AGCAGTTGGGCTCAAATATA	164
GSTP1	FP: AGAAAGGAAGGCAAACCTCTGC RP: TGATCCATGAGGTCCTAGCC	194
GSTT1	FP: ATGACCCCCACACCCACAGT RP: CCACATTCCCAGCCTCACCT	187
β2- microglobulin	FP: TCCAACATCAACATCTTGGT RP: TCCCCCAAATTCTAAGCAGA	122

FP, forward primer; RP, reverse primer.

### 7.3.2. Υλικά και εταιρείες προέλευσης

Αγαρόζη-Gibco BRL	Πρωτεΐνάση K-Sigma
Αιθανόλη-BDH	Ριβονουκλεάση A-Sigma
Ακρυλαμίδιο-BDH	SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)-BDH
Ανθρακικό νάτριο-Sigma	Thermoscript RT-Gibco BRL
Βορικό οξύ-BDH	Ταq πολυμεράση-Gibco BRL
Βρωμιούχο αιθίδιο-Sigma	TEMED-Sigma
Γλυκερόλη-Gibco BRL	Tris base-BDH
Διθειοτρεϊτόλη-Sigma	Triton-X-100-Sigma
Δεσοξυριβινουκλεοτίδια- Gibco BRL	Trizol-Gibco BRL
Ένζυμα περιορισμού-New England Biolabs	Tween-20-Sigma
Ισοπροπανόλη-BDH	NaOH-Sigma
Κυανό της βρωμοφαινόλης-Sigma	HCl-BDH
Μεθανόλη-BDH	Φαινόλη-BDH
Μεμβράνες διαπήδησης πόρων-Sigma	Φορμαλδεΰδη-BDH
Νιτρικός άργυρος-Sigma	KCl-Sigma
Οξεικό αμμώνιο-Sigma	MgCl <sub>2</sub> -Sigma
Οξεικό οξύ-BDH	NaCl-Sigma
	CHCl <sub>3</sub> -BDH

### 7.3.3. Διαλύματα

Ammonium Persulfate: 10% w/v, 4<sup>0</sup>C

Buffer A: 10 mM Tris HCl (pH 8.0), 320 mM σουκρόζη, 5 mM MgCl<sub>2</sub> και 1% Triton-X-100, θερμοκρασία δωματίου

Buffer B: 400 mM Tris HCl (pH 8.0), 60 mM EDTA, 150 mM NaCl και 1% SDS, θερμοκρασία δωματίου

Βρωμιούχο αιθίδιο: 10 mg/ml H<sub>2</sub>O, 4<sup>0</sup>C

Διάλυμα φόρτωσης στην ηλεκτροφόρηση: Πριν την ηλεκτροφόρηση του δείγματος, αναμειγνύεται με τις χρωστικές μπλε της βρωμοφαινόλης (0.25%), κυανό του ξυλένιου (0.25%) και φυκόλη (25%).

Πολυακρυλαμίδιο (30%): 29% ακρυλαμίδιο, 1% δις-ακρυλαμίδιο σε ddH<sub>2</sub>O. Φιλτράρεται και φυλάσσεται στους 4<sup>0</sup>C

TE: 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

TBE(10X): 0.9 M Tris-HCl, 0.9 M βορικό οξύ, 25 mM EDTA pH 8.3, 4<sup>0</sup>C

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ I

### 8. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

#### 8.1. Γενετική ανάλυση

Σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των συχνοτήτων των γενετικών πολυμορφισμών των γονιδίων αποτοξίνωσης του κυττάρου (CYP1A1- ένζυμο φάσης I, και GSTM1 και GSTT1, ένζυμα φάσης II) με αντικειμενικό στόχο τον καθορισμό ενός απλού προγνωστικού πρωτοκόλλου ικανού να προσδιορίζει την πιθανότητα ή την ευαισθησία στην εμφάνιση του καρκίνου του μαστού σε άτομα του γενικού πληθυσμού. Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν ήταν ο CYP1A1-3'-UTR m1 για το γονίδιο CYP1A1, και η απαλοιφή (null deletion) των γονιδίων GSTM1 και GSTT1.

Αναλύθηκαν 207 δείγματα γενομικού DNA, το οποίο απομονώθηκε από περιφερικό αίμα ασθενών με σποραδικό καρκίνο του μαστού και 171 φυσιολογικά δείγματα αντίστοιχης ηλικίας και φύλλου.

Μετά από δοκιμές σε διαφορετικές θερμοκρασίες αναδιάταξης των εκκινητών και διαφορετικές συγκεντρώσεις ιόντων μαγνησίου ( $Mg^{+}$ ), εκτελέστηκε η τεχνική της PCR με την εισαγωγή 100 ng γενομικού DNA σε μείγμα PCR αντίδρασης που περιείχε 1X PCR buffer, 200  $\mu$ M dNTPs, 2.0 mM  $MgCl_2$ , 0.3  $\mu$ M από κάθε εκκινητή και 0.35U *Taq* DNA πολυμεράση σε τελικό όγκο αντίδρασης 15  $\mu$ l. Οι παράμετροι ενίσχυσης της αντίδρασης ήταν: αρχική θερμική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 3 min και ακολουθούν τα στάδια: 94°C για 30 sec (αποδιάταξη), 30 sec στη θερμοκρασία αναδιάταξης των εκκινητών και 72°C για 30 sec (πολυμερισμός), αυτά τα στάδια επαναλαμβάνονται για τους ενδεικνυόμενους κύκλους και τελικό βήμα παράτασης στους 72°C για 10 min. Στον πίνακα 8.1.1 παρουσιάζονται τα PCR προϊόντα, οι θερμοκρασίες αναδιάταξης και οι κύκλοι για την ενίσχυση της αντίδρασης. Η  $\beta$ -σφαιρίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός θετικός μάρτυρας στα GSTM1 και GSTT1.

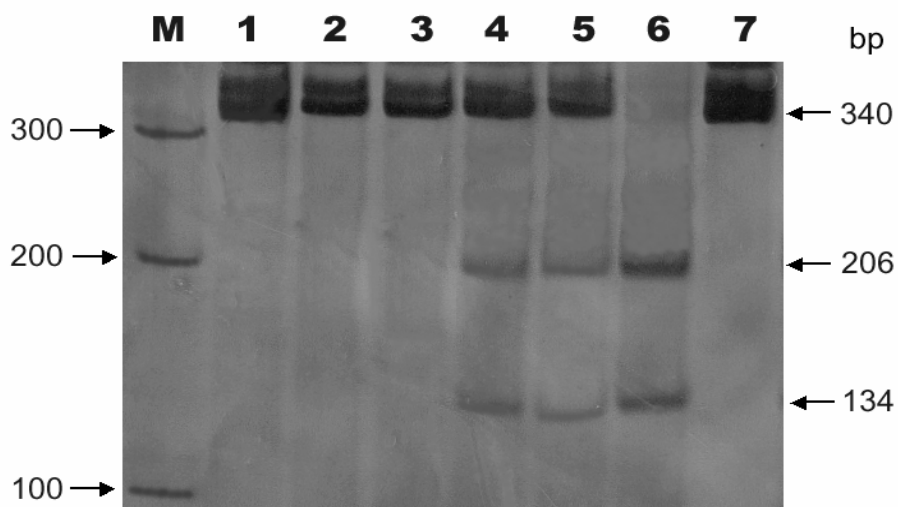


**Πίνακας 8.1.1.** Παράμετροι για την ενίσχυση της PCR

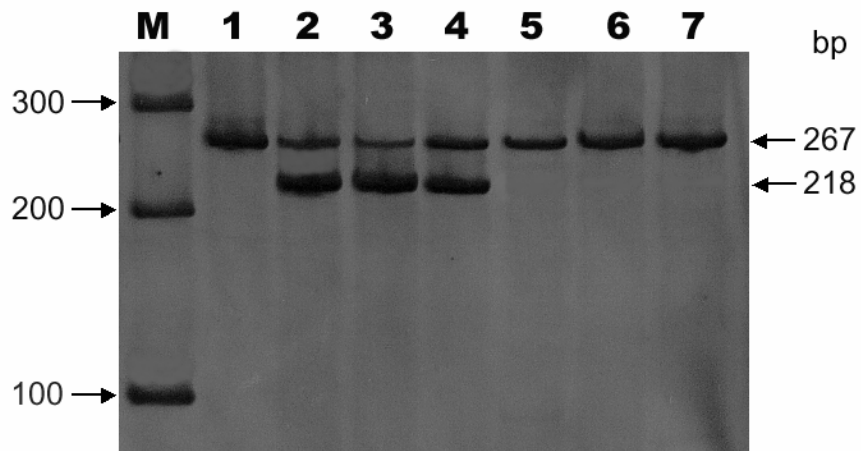
<b>Γονίδιο</b>	<b>bp</b>	<b>Ta (°C)<sup>a</sup></b>	<b>κύκλοι</b>
CYP1A1	340	65	30
GSTM1	218	55	36
GSTT1	187	55	36
β-globin	267	55	36

<sup>a</sup>θερμοκρασία αναδιάταξης.

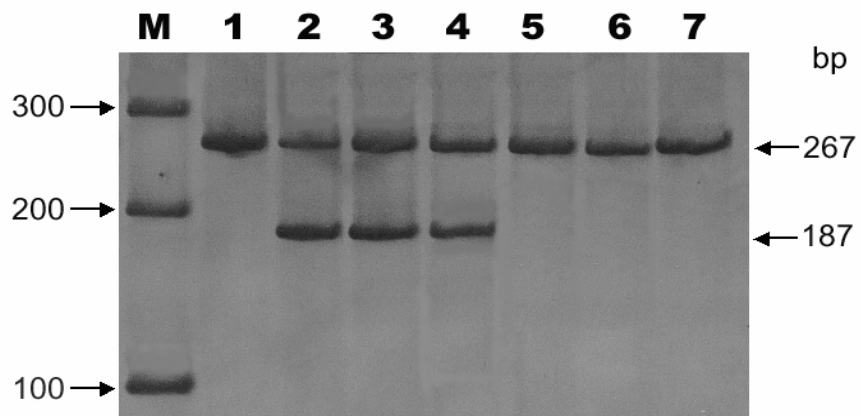
Χαρακτηριστικά παραδείγματα των παραπάνω πειραμάτων φαίνονται στις εικόνες 8.1. έως 8.3.



**Εικόνα 8.1.** Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα της ανάλυσης του πολυμορφισμού CYP1A1 MspI 3'-UTR. M, πρότυπο DNA μοριακό μέγεθος. Λωρίδες 1 και 7, άκοπο CYP1A1 PCR προϊόν. Λωρίδες 2 και 3, wt πρότυπο. 4 και 5, wt/m1. 6 m1/m1.



**Εικόνα 8.2.** Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα της multiplex PCR του GSTM1 πολυμορφισμού και της β-σφαιρίνης. M, πρότυπο DNA μοριακό μέγεθος. Λωρίδα 1, β-σφαιρίνη (singleplex). Λωρίδες 2-4, GSTM1(+).Λωρίδες 5-7, GSTM1(-).



**Εικόνα 8.3.** Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα της multiplex PCR για τον GSTT1 πολυμορφισμό και τη β-σφαιρίνη. M, πρότυπο DNA μοριακό μέγεθος. Λωρίδα 1, β-σφαιρίνη (singleplex). Λωρίδες 2-4, GSTT1(+).Λωρίδες 5-7, GSTT1(-).

### Ανάλυση ατομικών γονότυπων

Η κατανομή των γονότυπων παρατίθεται στον πίνακα 8.1.2. Ο κυρίαρχος ομόζυγος (wt), ο ετερόζυγος (wt/m1) και ο σπάνιος ομόζυγος (m1) γονότυπος βρέθηκαν αντίστοιχα σε 123 (74.11%), 45 (23.21%) και 3 (2.68%) άτομα ανάμεσα στον υγιή πληθυσμό. Αυτό το αποτέλεσμα είχε καλή προσαρμογή στην ισορροπία Hardy-Weinberg με συχνότητα αλληλόμορφου 0.85 για το wt και 0.15 για το m1. Από την άλλη πλευρά, οι τύποι (wt), (wt/m1) και (m1) βρέθηκαν σε 156 (69.42%), 48 (29.75%) και 3 (0.83%) άτομα αντίστοιχα, ανάμεσα στις ασθενείς με καρκίνο μαστού με συχνότητα αλληλόμορφου 0.87 για το wt και 0.13 για το m1.

Η συχνότητα του m1 γονότυπου που παρατηρήθηκε στην ομάδα ελέγχου ήταν 1.75%, έναντι 1.45% στην ομάδα των ασθενών, δείχνοντας μια μείωση στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου με στατιστική σημαντικότητα  $p < 0.1$  ( $\chi^2 = 0.57$ ,  $df = 1$ ). Η απουσία του GSTM1 ήταν αρκετά συχνή και στους δύο πληθυσμούς με τη συχνότητα του GSTM1(-) να αγγίζει το ποσοστό 52% στις δύο ομάδες. Αντίθετα περισσότερη κοινή είναι η παρουσία του GSTT1 στους πληθυσμούς φτάνοντας τα ποσοστά 85.5% και 90.1% σε ασθενείς και φυσιολογικά δείγματα αντίστοιχα. Η απαισιοφύλη του GSTT1 (-) παρατηρήθηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα (0.14) στα παθολογικά δείγματα σε σχέση με τα φυσιολογικά (0.10).

**Πίνακας 8.1.2.** Κατανομή ατομικών γονότυπων στο καρκίνο του μαστού

	Ασθενείς με καρκίνο μαστού (%)	Ομάδα ελέγχου (%)	Odd ratio (95% CI)
<b>Γονότυπος CYP1A1</b>			
wt	156 (75.36)	123 (71.93)	1.00 <sup>α</sup>
wt/m1	48 (23.19)	45 (26.32)	0.84 (0.52-1.35)
m1	3 (1.45)	3 (1.75)	0.79 (0.16-3.98)
<b>Γονότυπος GSTM1</b>			
GSTM1(+)	99 (47.83)	82 (47.95)	1.00
GSTM1(-)	108 (52.17)	89 (52.05)	1.01 (0.67-1.51)
<b>Γονότυπος GSTT1</b>			
GSTT1(+)	177 (85.51)	154 (90.06)	1.00
GSTT1(-)	30 (14.49)	17 (9.94)	1.54 (0.82-2.89)
<b>Σύνολο</b>	207 (100)	171(100)	

α, od αναφοράς

Οι λόγοι σχετικού κινδύνου (odd ratios, OR) των δύο ομάδων υπολογίστηκαν και παρατίθενται στον ίδιο πίνακα. Ως λόγος αναφοράς θεωρήθηκε ο μη μεταλλαγμένος γονότυπος του κάθε γονιδίου. Ο ομόζυγος και ετερόζυγος μεταλλαγμένος τύπος του m1 πολυμορφισμού παρουσιάζει μια 21% και 16% μείωση του κινδύνου καρκίνου μαστού (OR=0.79, 95%CI:0.16-3.98 και OR=0.84, 95%CI:0.52-1.35 αντίστοιχα,  $p < 0.05$ ). Ο GSTM1(-) γονότυπος παρουσιάζεται σε ίδια ποσοστά στις δύο ομάδες, χωρίς να αποδίδεται αυξημένος κίνδυνος σε καμία από αυτές (OR=1.01, 95%CI:0.67-1.51,  $p < 0.05$ ). Ο GSTT1(+) γονότυπος παρουσιάζεται προστατευτικός για τον καρκίνο του μαστού, καθώς ο GSTT1(-) γονότυπος παρουσιάζει οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά με OR=1.54 και  $p < 0.05$  ( $\chi^2=1.9$ ,  $df=1$ ).

#### **Ανάλυση συνδυασμένων γονότυπων ανά δύο γονίδια**

Οι δώδεκα γονότυποι μπορούν να αναλυθούν συνδυάζοντας τους τρεις γονότυπους του CYP1A1 με τους δύο του GSTM1 και με τους δύο του GSTT1 καθώς και οι δύο του GSTM1 με τους δύο του GSTT1 και να συγκριθούν οι συχνότητες συνδυασμών ανάμεσα στις περιπτώσεις καρκίνου μαστού και ομάδας ελέγχου. Αναλυτικά τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των συνδυασμένων γονότυπων ανά δύο παρατίθενται στον πίνακα 8.1.3.

Κατά τη στατιστική ανάλυση των συνδυασμών των γονότυπων του CYP1A1 και GSTM1 επικρατεί και στις δύο ομάδες ο γονότυπος CYP1A1wt, GSTM1(-) με 39.61% στις ασθενείς και 38.60% στα υγιή άτομα. Οι μεταλλαγμένοι γονότυποι των CYP1A1 και GSTM1 σε συνδυασμό δείχνουν μια τάση μείωσης του κινδύνου στον καρκίνο του μαστού (OR<1), χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντικές οι διαφορές.

Επικρατέστερος συνδυασμένος γονότυπος μεταξύ CYP1A1 και GSTT1 είναι αυτός που έχει το μη μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του CYP1A1 και εκφράζει και το GSTT1 με ποσοστό περίπου 64.5% και για τις δύο ομάδες. Από τους λόγους σχετικού κινδύνου φαίνεται μια τάση για προστασία στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού στους φορείς του GSTT1(+), έστω κι αν το CYP1A1 παρουσιάζεται στο μεταλλαγμένο του τύπο.

**Πίνακας 8.1.3.** Κατανομή συνδυασμένων γονότυπων ανά δύο γονίδια στον καρκίνο του μαστού

Συνδυασμένοι γονότυποι ανά 2	Ασθενείς με καρκίνο μαστού (%)	Ομάδα ελέγχου (%)	Odd ratio (95% CI)
<b>CYP1A1-GSTM1</b>			
wt (+)	74 (35.75)	57 (33.33)	1.00
wt (-)	82 (39.61)	66 (38.60)	0.96 (0.57-1.54)
wt/m1 (+)	23 (11.11)	23 (13.45)	0.77 (0.39-1.51)
wt/m1 (-)	25 (12.08)	22 (12.87)	0.88 (0.45-1.71)
m1 (+)	2 (0.97)	2 (1.17)	0.77 (0.10-5.63)
m1 (-)	1 (0.48)	1 (0.58)	0.77 (0.05-12.58)
<b>CYP1A1-GSTT1</b>			
wt (+)	134 (64.73)	110 (64.33)	1.00
wt (-)	22 (10.63)	13 (7.60)	1.39 (0.67-2.88)
wt/m1 (+)	40 (19.32)	41 (23.98)	0.80 (0.48-1.32)
wt/m1 (-)	8 (3.86)	4 (2.34)	1.64 (0.48-5.60)
m1 (+)	3 (1.45)	3 (1.75)	0.82 (0.16-4.15)
m1 (-)	0 (0.00)	0 (0.00)	-
<b>GSTM1-GSTT1</b>			
(+)(+)	85 (41.06)	76 (44.44)	1.00
(+)(-)	14 (6.76)	6 (3.51)	2.09 (0.76-5.70)
(-)(+)	92 (44.44)	78 (45.61)	1.05 (0.68-1.62)
(-)(-)	16 (7.73)	11 (6.43)	1.30(0.57-2.98)
<b>Σύνολο</b>	<b>207 (100)</b>	<b>171(100)</b>	

Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς παρουσίασε ο γονότυπος που χαρακτηρίζεται από την παρουσία του GSTM1 αλλά σύγχρονη απουσία του GSTT1 (OR=2.09, 95%CI 0.76-5.7,  $\chi^2=2.2$ , df=1  $p>0.01$ ). Επίσης οι πιο συχνοί γονότυποι εκφράζουν το GSTT1 και είτε εκφράζουν το GSTM1 (41.06% στους ασθενείς) είτε όχι (44.44% στους ασθενείς) με παρόμοια ποσοστά και στο φυσιολογικό πληθυσμό.

### **Ανάλυση συνδυασμένων γονότυπων ανά τρία γονίδια**

Στην προσπάθεια ανάδειξης γονότυπου ευαίσθητου στην εμφάνιση καρκίνου μαστού, ακολούθησε ανάλυση της συχνότητας πολυμορφισμών σε συνδυασμό και των τριών γονιδίων φάσης I και II. Τα ποσοστά καθώς και οι λόγοι σχετικού κινδύνου παρατίθενται στον πίνακα 8.1.4. Ο πιο συχνά εμφανιζόμενος συνδυασμός γονότυπων ήταν ο CYP1A1 wt, GSTM1(-), GSTT1(+) με ποσοστά 34.3% στις ασθενείς και 33.3% στον υγιή πληθυσμό, ακολουθούμενος από τον CYP1A1 wt, GSTM1(+), GSTT1(+) με ποσοστά 34.3% και 33.3% σε γυναίκες με καρκίνο μαστού και μη, αντίστοιχα. Αν και είναι μικρός ο αριθμός των περιπτώσεων που έχουν το γονότυπο CYP1A1 wt, GSTM1(+), GSTT1(-), παρουσιάστηκε στατιστική διαφορά αναδεικνύοντας τις παρουσίες του μη μεταλλαγμένου CYP1A1 και του GSTM1 με ταυτόχρονη απαλοιφή του GSTT1 ως αυξημένου κινδύνου για τον καρκίνο του μαστού γονότυπο (OR=2.31, 95%CI 0.70-7.69,  $\chi^2=2.0$ , df=1,  $p>0.01$ ). Η συχνότητα του συνδυασμένου γονότυπου που χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη απαλοιφή των GSTM1 και GSTT1 και από τον ετερόζυγο τύπο του CYP1A1 ήταν 1.17% στην ομάδα ελέγχου. Από την άλλη πλευρά η συχνότητα του ίδιου συνδυασμένου γονότυπου ήταν 2.42 (OR=2.10, 95%CI 0.39-11.28) ανάμεσα στους ασθενείς, χωρίς όμως να παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ( $\chi^2=0.8$ , df=1). Ο ετερόζυγος και ο σπάνιος ομόζυγος φορέας του CYP1A1m1, που συγχρόνως εκφράζει το GSTT1, αλλά είτε εκφράζει, είτε όχι το GSTM1 δείχνει μια προστατευτική τάση για την εμφάνιση καρκίνου μαστού με ποσοστά 16-20% (OR<1).

**Πίνακας 8.1.4.** Κατανομή συνδυασμένων γονότυπων των CYP1A1, GSTM1 και GSTT1 στον καρκίνο του μαστού

Συνδυασμένοι γονότυποι ανά 3	Ασθενείς με καρκίνο μαστού (%)	Ομάδα ελέγχου (%)	Odd ratio (95% CI)
<b>CYP1A1-GSTM1-GSTT1</b>			
wt (+) (+)	63 (30.43)	53 (30.99)	1.00
wt (+) (-)	11 (5.31)	4 (2.34)	2.31 (0.70-7.69)
wt (-) (+)	71 (34.30)	57 (33.33)	1.05 (0.63-1.74)
wt (-) (-)	11 (5.31)	9 (5.26)	1.03 (0.40-2.67)
wt/m1 (+) (+)	20 (9.66)	21 (12.28)	0.80 (0.39-1.64)
wt/m1 (+) (-)	3 (1.45)	2 (1.17)	1.26 (0.20-7.84)
wt/m1 (-) (+)	20 (9.66)	20 (11.70)	0.84 (0.41-1.73)
wt/m1 (-)(-)	5 (2.42)	2 (1.17)	2.10 (0.39-11.28)
m1 (+) (+)	2 (0.97)	2 (1.17)	0.84 (0.12-6.18)
m1 (+) (-)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
m1 (-) (+)	1 (0.48)	1 (0.58)	0.84 (0.05-13.78)
m1 (-) (-)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
<b>Σύνολο</b>	<b>207 (100)</b>	<b>171(100)</b>	

#### Συσχέτιση συχνότητας γονότυπων με ατομικά χαρακτηριστικά

Σύμφωνα με το Mann-Whitney's U test, η ηλικία των ασθενών που εμφάνισαν τη νόσο δεν έδειξε δεν έδειξε διαφορές στους γονότυπους είτε ατομικά είτε σε συνδυασμό,  $p>0.1$ .

Στη συνέχεια οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την εμμηνορροϊκή τους κατάσταση και εφαρμόστηκε το Mann-Whitney's U test. Δεν παρουσιάστηκε διαφορά μεταξύ των διαφορετικών γονότυπων και το αν οι ασθενείς ήταν σε προ- ή σε μετ-εμμηνοπαυσιακή φάση,  $p>0.05$ .

Η κατανομή των συγκεκριμένων πολυμορφισμών δεν έδειξε επίσης διαφορά ανάμεσα στις ασθενείς που είχαν κάνει λήψη αντισυλληπτικών χαπιών κατά τη διάρκεια τη ζωής τους και ανάλογα με τη χρονική διάρκεια ( $p>0.1$ , Mann-Whitney's U test)

Δεν υπήρξε ουσιαστικά καμία στατιστικά σημαντική διαφορά και μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ασθενών με καρκίνο μαστού, κατά την ανάλυση των πολυμορφισμών ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό, σύμφωνα με την ηλικία εμφάνισης της ασθένειας ή την εμμηνορροϊκή κατάσταση ( $\chi^2<1$ ,  $p>0.1$ ).

## 8.2. Ανάλυση σε μεταγραφικό επίπεδο

Για να ερευνηθεί ο λειτουργικός ρόλος των γονιδίων CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 και GSTT1 στον καρκίνο του μαστού, εξετάστηκαν 31 δείγματα όγκων με τους αντίστοιχους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς τους, για τα mRNA μεταγραφικά τους πρότυπα.

Για την εκτέλεση των RT-PCR αντιδράσεων τα παραπάνω γονίδια χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες, ανάλογα με το προϊόν που έδιναν, ώστε να πραγματοποιηθούν multiplex PCR αντιδράσεις (πίνακας 8.2.1.).

**Πίνακας 8.2.1.** Ομάδες multiplex PCR

Γονίδιο	Προϊόν (bp)	Ομάδα <sup>a</sup>
CYP1A1	244	A
AhR	212	B
GSTM1	164	B
GSTP1	194	A
GSTT1	187	C
β2-μικροσφαιρίνη	122	A, B, C

<sup>a</sup>Ομάδα τριπλής και διπλής αντίδρασης.

Ως εσωτερικός δείκτης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η β2-μικροσφαιρίνη. Χαρακτηριστικά παραδείγματα των multiplex RT-PCR παρουσιάζονται στις εικόνες 8.5 έως 8.7.

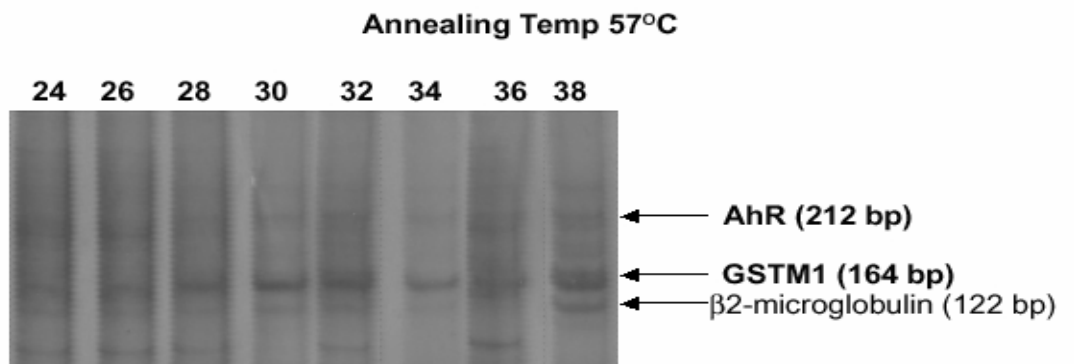
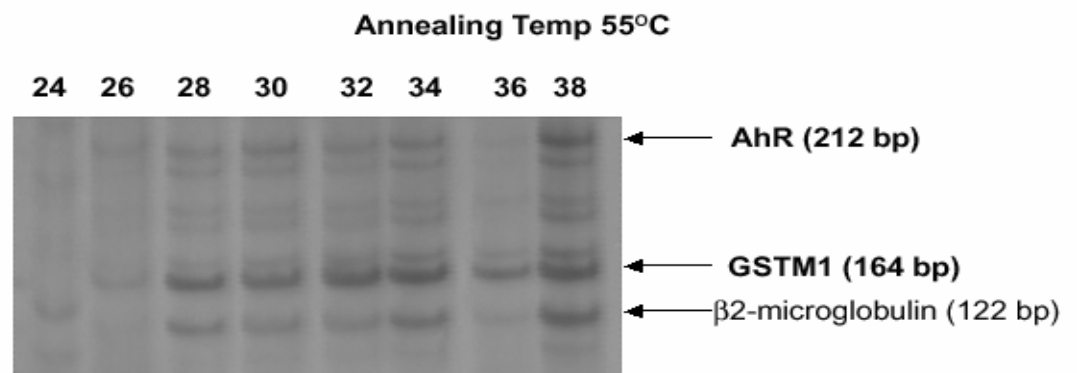
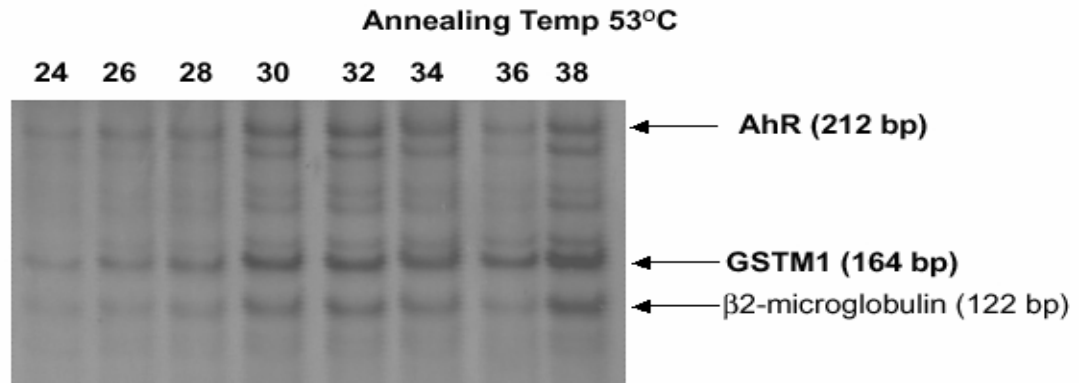
Οι παράμετροι ενίσχυσης της αντίδρασης ήταν: αρχική θερμική αποδιάταξη του DNA στους 94<sup>0</sup>C για 3 min και ακολουθούν τα στάδια: 94<sup>0</sup>C για 30 sec, 55<sup>0</sup>C για 30 sec για την αναδιάταξη των εκκινητών και 72<sup>0</sup>C για 40 sec για τον πολυμερισμό, αυτά τα στάδια επαναλαμβάνονται για 30 κύκλους και τελικό βήμα παράτασης στους 72<sup>0</sup>C για 10 min.

Για τη μείωση τυχόν συναγωνισμού μεταξύ των διαφορετικών ζευγών εκκινητών σε μια multiplex PCR αντίδραση, καθώς και για την αξιολόγηση των παραπάνω συνθηκών για ειδική και τη βέλτιστη ενίσχυση του κάθε ζεύγους σε μια

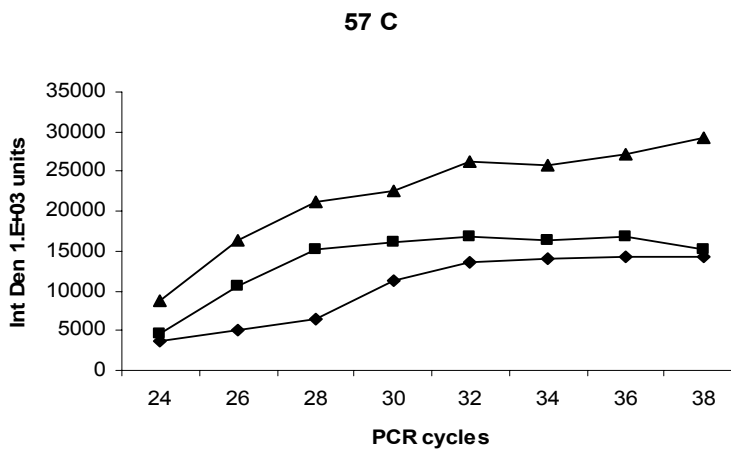
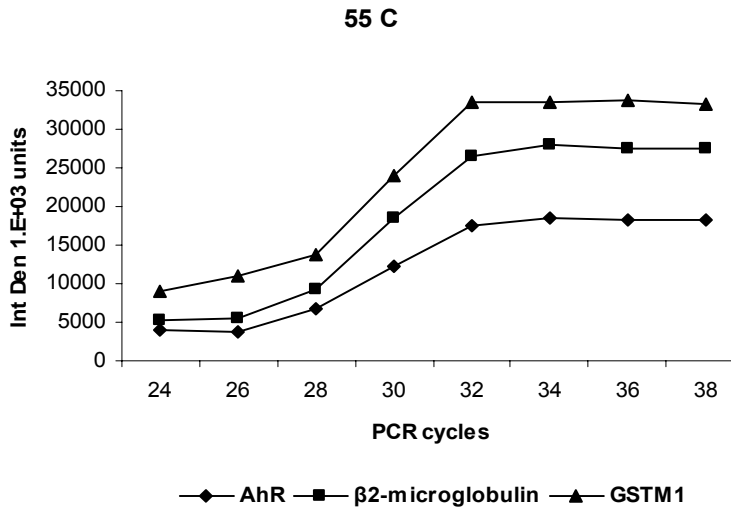
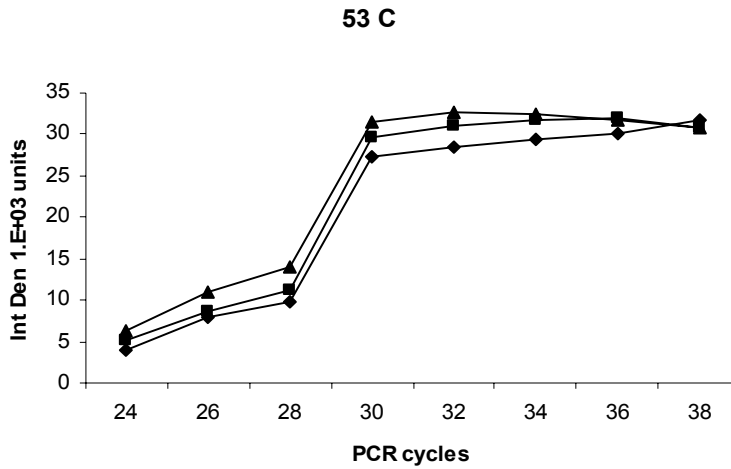


ομάδα, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση. Ένα μείγμα από όλα τα cDNA που προετοιμάστηκαν χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αναφοράς και εκτελέστηκε αντίδραση PCR αυξάνοντας τον αριθμό των PCR κύκλων από 24 μέχρι 38 και ανεβάζοντας τη θερμοκρασία αναδιάταξης των εκκινητών από τους 52<sup>0</sup>C στους 55<sup>0</sup>C και στους 57<sup>0</sup>C (εικόνα 8.4. και διάγραμμα 8.1.). Με αυτό τον τρόπο επιτεύχθηκαν μετρήσεις της αμιγούς πυκνότητας (ID) στην εκθετική φάση.

Ως ποσοτική παράμετρος της έκφρασης κάθε γονιδίου χρησιμοποιήθηκε η αμιγής πυκνότητα (Integrated Density, ID).

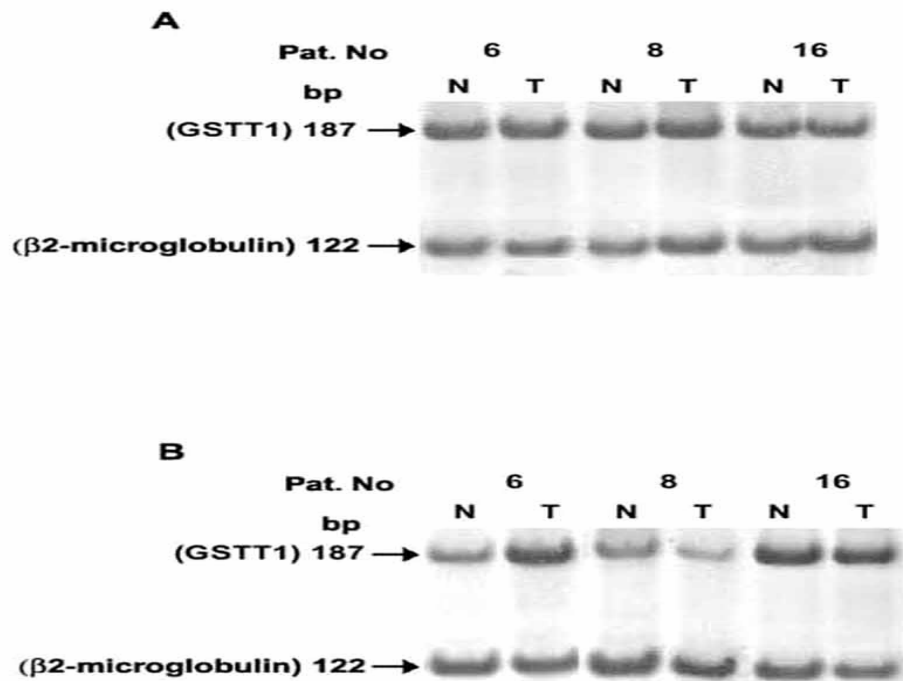


**Εικόνα 8.4.** Χαρακτηριστικό παράδειγμα βαθμωτής multiplex PCR αντίδρασης ως προς θερμοκρασία και κύκλους.

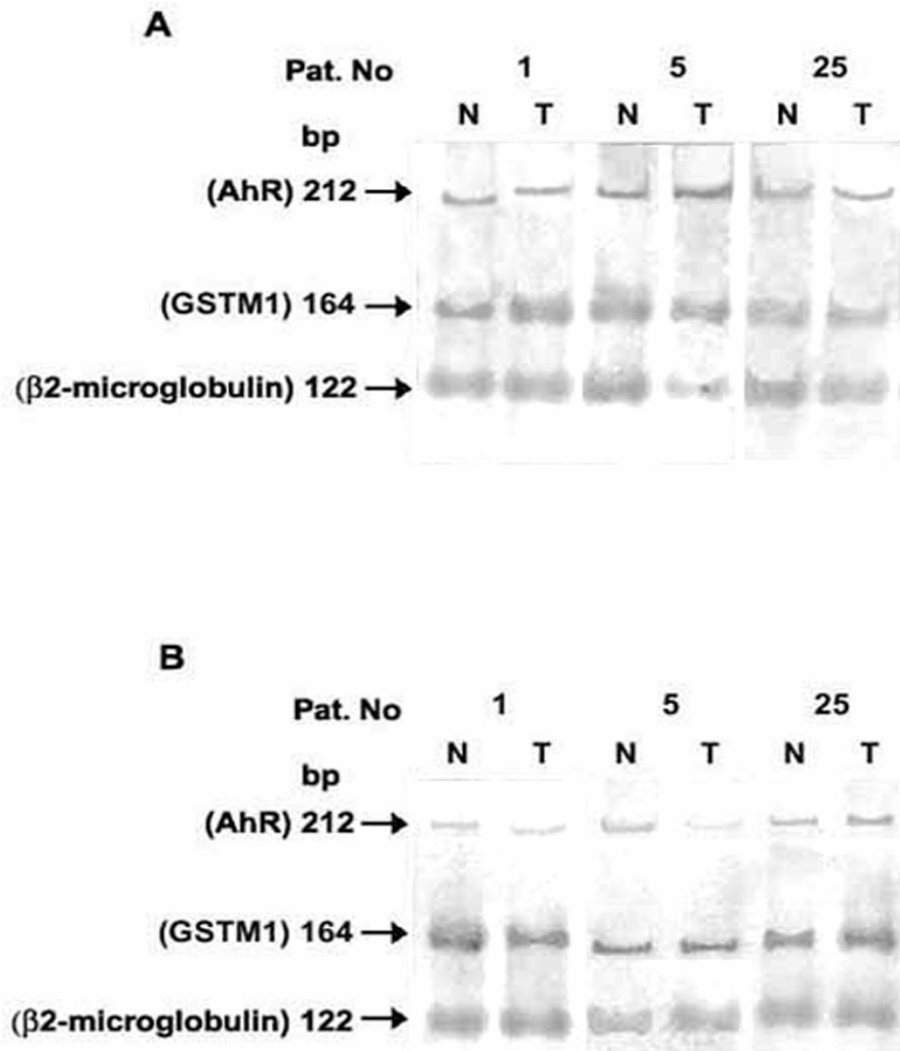


**Διάγραμμα 8.1.** Καμπύλες αμιγούς πυκνότητας βαθμωτής multiplex PCR αντίδρασης ως προς θερμοκρασία και κύκλους για την επιλογή βέλτιστων συνθηκών.

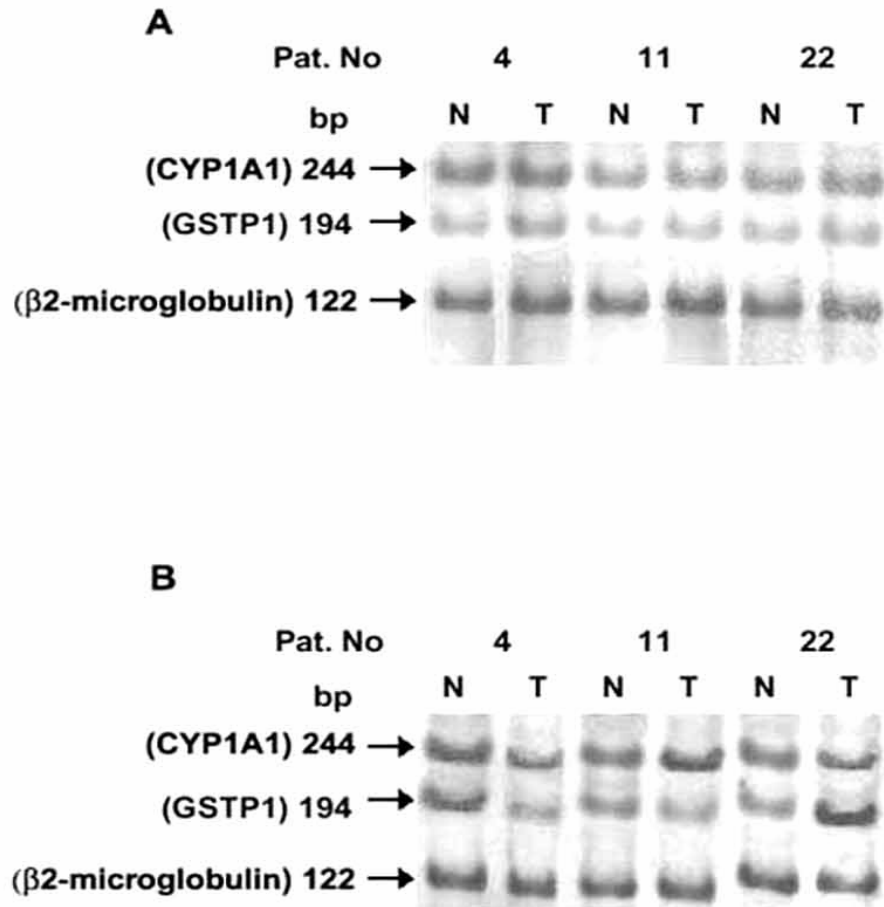
Κατά αυτόν τον τρόπο καθορίστηκε το επίπεδο έκφρασης της  $\beta$ 2-μικροσφαιρίνης για τρία ανεξάρτητα πειράματα από διαφορετικά αρχικά cDNA για την κάθε ομάδα. Υπολογίστηκε η αναλογία του RT-PCR προϊόντος της ως προς τα διαφορετικά πειράματα. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε το Student's t-test 2-tailed, όπου το διάστημα εμπιστοσύνης 99% (99% Confidence Interval) καθορίστηκε μεταξύ 0.82 και 1.20, ενώ η μέση διαφορά ήταν  $1.01 \pm 0.07$  ( $t=13.708$ ,  $df=182$ ,  $p<0.0001$ ). Κατά συνέπεια, κάθε τιμή  $<0.67$  έγινε αποδεκτή ως υποέκφραση (υπο-ρύθμιση, down regulation), ενώ κάθε τιμή  $>1.72$  θεωρήθηκε ως υπερέκφραση (υπερ-ρύθμιση, up regulation).



**Εικόνα 8.5.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα multiplex PCR GSTT1 και  $\beta$ 2-μικροσφαιρίνης A) ανάλυση γενομικής διαφοροποίησης, B) RT-PCR. T, καρκίνος μαστού, N, φυσιολογικός ιστός. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε ασθενείς του πίνακα 8.1.6.



**Εικόνα 8.6.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα multiplex PCR AhR, GSTM1 και β2-μικροσφαιρίνης A) ανάλυση γενομικής διαφοροποίησης, B) RT-PCR. T, καρκίνος μαστού, N, φυσιολογικός ιστός. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε ασθενείς του πίνακα 8.1.6.



**Εικόνα 8.7.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα multiplex PCR CYP1A1, GSTP1 και β2-μικροσφαιρίνης A) ανάλυση γενομικής διαφοροποίησης, B) RT-PCR. T, καρκίνος μαστού, N, φυσιολογικός ιστός. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε ασθενείς του πίνακα 8.1.6.

Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι λόγοι καθ' ενός από τα εξεταζόμενα γονίδια ως προς το γονίδιο αναφοράς. Τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 και GSTT1, παρουσίασαν μεγάλη ποικιλία τιμών και μεταξύ των φυσιολογικών αλλά και μεταξύ των καρκινικών ιστών των ασθενών. Όσο αφορά το φυσιολογικό ιστό παρατηρήθηκε διακύμανση τιμών των mRNA επιπέδων περίπου 11 φορές για το CYP1A1, 24 φορές για τον AhR, 10 φορές για το GSTM1 (εξαιρέθηκαν τα άτομα με γονότυπο GSTM1(-)), 9 φορές για το GSTP1 και περίπου 27 φορές για το GSTT1 (εξαιρέθηκαν τα άτομα με γονότυπο GSTT1(-)). Οι συσχετίσεις αυτές έγιναν με ανεξάρτητο ως προς την ηλικία και το στάδιο των ασθενών, καθώς δεν φάνηκε να έχουν καμία επίδραση. Αντίστοιχα οι διακύμανση των τιμών των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 και GSTT1 στον καρκινικό ιστό ήταν περίπου 13 φορές, 18 φορές, 5 φορές (εξαιρέθηκαν τα άτομα με γονότυπο GSTM1(-)), 5 φορές και 48 φορές (εξαιρέθηκαν τα άτομα με γονότυπο GSTT1(-)), επίσης με ανεξάρτητο τρόπο ως προς την ηλικία των ασθενών και το στάδιο του όγκου.

Υπολογίστηκαν οι αναλογίες των μεταγραφικών επιπέδων κάθε γονιδίου ανάμεσα σε καρκινικό και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό και παρουσιάζονται στον πίνακα 8.1.6.

Το CYP1A1 απορυθμίστηκε σε ποσοστό 51.6%, αλλά επίσης και το AhR απορυθμίστηκε κατά 51.6%. Όμως όπως φαίνεται και στο πίνακα η απορύθμιση δεν ήταν σύμφωνη για τα δύο γονίδια, εκτός από τέσσερις περιπτώσεις. Τα δείγματα 4 και 8 παρουσίασαν σύγχρονη υπο-ρύθμιση, ενώ τα δείγματα 11 και 24 παρουσίασαν σύγχρονη υπερ-ρύθμιση για τα παραπάνω γονίδια. Το GSTP1 απορυθμίστηκε σε ποσοστό 54.8% στα δείγματα καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Το GSTM1 και το GSTT1 σε ποσοστά 34.8% και 44.4%, αντίστοιχα, στους ιστούς που τα εκφράζουν.

Το εύρος των μεταγραφικών προτύπων κυμάνθηκε από έξι φορές υπερ μέχρι 3 φορές υπό.

**Πίνακας 8.2.2.** Ανάλυση σε μεταγραφικό επίπεδο ιστών με καρκίνο μαστού και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό

No	CYP1A1		AhR		GSTM1		GSTP1		GSTT1		Ηλικία	Στάδιο	Grade	Γονότυπος		
	CYP1A1		AhR		GSTM1		GSTP1		GSTT1					CYP1A1	GSTM1	GSTT1
1	1.60	-	0.16	↓	3.84	↑	0.27	↓	1.18	-	50	II	III	wt	+	+
2	2.22	↑	1.08	-	1.03	-	0.39	↓	4.50	↑	49	I	II	wt	+	+
3	0.98	-	0.41	↓	1.96	↑	0.44	↓	0.97	-	56	II	II	wt	+	+
4	0.18	↓	0.21	↓	2.64	↑	0.42	↓	2.18	↑	62	I	I	m1	+	+
5	0.63	↓	8.32	↑	0.75	-	0.85	-	0.80	-	39	II	III	wt	+	+
6	1.62	-	0.31	↓	0.88	-	0.91	-	5.31	↑	67	II	II	wt	+	+
7	0.96	-	0.38	↓	1.10	-	1.08	-	0.75	-	48	II	II	wt	+	+
8	0.63	↓	0.31	↓		Null	2.28	↑	0.79	-	72	II	II	wt	-	+
9	0.84	-	10.64	↑	0.36		2.42	↑	5.34	↑	65	I	II	wt	+	+
10	1.36	-	0.32	↓		Null	3.6	↑	1.36	-	44	I	II	wt	-	+
11	4.22	↑	7.51	↑	0.26	↓	0.94	-	0.27	↓	47	II	II	wt	+	+
12	1.34	-	0.86	-	0.53	↓	2.18	↑	0.97	-	57	II	III	wt	+	+
13	0.51	↓	2.28	↑		Null	2.05	↑	0.96	-	53	I	II	wt	-	+
14	0.30	↓	0.96	-	0.79	-	1.16	-	1.29	-	65	II	III	wt	+	+
15	2.85	↑	0.94	-	1.34	-	0.21	↓	0.73	-	56	I	II	wt	+	+
16	0.60	↓	0.95	-	0.78	-	1.27	-	0.33	↓	76	I	II	wt	+	+
17	3.20	↑	0.29	↓		Null	0.88	-	1.16	-	36	III	II	wt	-	+
18	0.74	-	0.94	-	1.08	-	1.03	-	0.97	-	48	I	II	wt	+	+
19	1.32	-	0.95	-	0.78	-	1.12	-	1.30	-	61	I	II	wt/ml	+	+
20	0.99	-	3.11	↑	0.40	↓	2.35	↑		Null	53	II	II	wt	+	-
21	1.44	-	0.67	-	0.80	-	0.95	-	0.76	-	75	III	II	wt	+	+
22	0.56	↓	0.96	-		Null	3.4	↑	0.64	↓	66	II	II	wt	-	+
23	1.02	-	10.55	↑	1.38	-	0.87	-	4.49	↑	50	II	II	wt	+	+
24	2.85	↑	1.99	↑	0.73	-	0.28	↓	3.94	↑	65	I	II	wt/ml	+	+
25	1.33	-	0.40	↓	0.91	-	1.23	-	7.90	↑	48	II	III	wt	+	+
26	3.39	↑	0.18	↓	1.05	-	0.33	↓	5.27	↑	57	III	III	wt	+	+
27	0.31	↓	1.13	-		Null	3.24	↑		Null	52	I	II	wt	-	-
28	3.64	↑	1.05	-		Null	1.15	-	9.96	↑	62	III	II	wt	-	+
29	1.87	-	1.08	-	1.30	-	1.35	-		Null	40	II	II	wt/ml	+	-
30	0.39	↓	1.05	-	2.22	↑	0.35	↓	0.68	-	59	II	II	wt	+	+
31	0.89	-	0.79	-		Null	2.11	↑		Null	47	I	II	wt	-	+

↑ υπερ-έκφραση, ↓ υπο-εκφραση, - σταθερή έκφραση στους όγκους σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό



Οι συσχετισμοί των παραπάνω μεταγραφικών προτύπων δεν κατάφεραν να δώσουν κάποια ισχυρή συμφωνία ανάμεσα σε όλα τα γονίδια. Παρόλα αυτά, ανάμεσα στα CYP1A1, GSTM1 και GSTP1, παρατηρείται, ότι όταν το CYP1A1 υπερ-εκφράζεται και το GSTM1 είτε δεν εκφράζεται είτε υπο-εκφράζεται ή διατηρεί σταθερή έκφραση, και παράλληλα το GSTP1 υπο-εκφράζεται ή έχει σταθερή έκφραση. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν πιθανή σχέση των τριών γονιδίων, καθώς υπερ[έκφραση του CYP1A1 είναι πιθανή, μόνο όταν ένα από τα GSTM1 ή GSTP1 υπο-εκφράζεται ή δεν εκφράζεται (για το GSTM1) και το άλλο παραμένει σταθερό.

### **8.1.3. Ανάλυση γενομικής διαφοροποίησης για την επισήμανση διαφοροποίησης στον αριθμό αντιγράφων**

Για να καθοριστεί εάν οι διαφοροποιήσεις στην έκφραση των γονιδίων CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 and GSTT1, οφείλονται στην ενίσχυση του γονιδίου, ή είναι αποτέλεσμα άλλων γεγονότων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του DNA που απομονώθηκε από τους ίδιους ιστούς. Η εκτέλεση των multiplex PCR αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο πείραμα, αλλά με την προσθήκη 100 ng DNA. Για να ελαχιστοποιηθεί η επιμόλυνση με mRNA, κατά την απομόνωση του DNA από τους ιστούς, έγινε επεξεργασία με E.coli RNase H, για 20 min στους 37<sup>0</sup> C. Ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η β2-μικροσφαιρίνη. Χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών που αναφέρονται στον πίνακα 8.2.1., καθώς είναι μοναδικές αλληλουχίες στόχων του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα της ανάλυσης γενομικής διαφοροποίησης φαίνονται στις εικόνες 8.5.-8.7 (A).

Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφοροποίηση στον αριθμό αντιγράφων. Από αυτό το αποτέλεσμα συμπεραίνεται ότι οι απορυθμίσεις στα επίπεδα του mRNA που παρατηρήθηκαν, οφείλονται μόνο σε τροποποιήσεις κατά το μεταγραφικό μηχανισμό.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ I

### ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Για τον προσδιορισμό των γονιδίων CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 και GSTT1 στο σποραδικό καρκίνο του μαστού, εφαρμόστηκε η τεχνική της PCR. Η επιλογή αυτών των γονιδίων έγινε με κριτήριο την εμπλοκή τους στο βιοχημικό μονοπάτι ενζύμων φάσης I και II της αποτοξίνωσης του κυττάρου, η οποία είναι κυρίαρχη σε αυτήν τη διαδικασία (Hengstler, Arand et al. 1998; Estabrook 1999), και υπάρχει γενική συμφωνία ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και τα σωματικά γεγονότα είναι οι κύριοι συνεισφέροντες στο σποραδικό καρκίνο (International Agency for Research on Cancer). Όσον αφορά την ευαισθησία καρκίνου του μαστού, η συχνότητα των μεταλλαγών στα γνωστά υψηλού κινδύνου γονίδια, BRCA1 και BRCA2, είναι πάρα πολύ χαμηλή για να εξηγήσει περισσότερο από ένα μέρος των γενετικών αποτελεσμάτων στην ανάπτυξη αυτού του τύπου όγκων (Lichtenstein, Holm et al. 2000).

Προσδιορίστηκαν οι συχνότητες αλληλομόρφων του CYP1A1 3'- UTR MspI γενετικού πολυμορφισμού, ο οποίος ορίζεται ως m1, και εκείνοι των GSTM1 και GSTT1, που χαρακτηρίζονται από την απαλοιφή του γονιδίου (null deletion). Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν και οι συχνότητες των γονότυπων τους σε συνδυασμό ανά δυο και τρία γονίδια. Η συχνότητα m1 του αλληλόμορφου γονιδίου CYP1A1 ήταν 15%, ενώ αυτή του GSTM1(-) ήταν 52% και GSTT1(-) 10%, ανάμεσα σε φυσιολογικά άτομα χωρίς οποιοδήποτε οικογενειακό ιστορικό του καρκίνου. Προηγούμενες μελέτες έχουν υπολογίσει τις ανωτέρω συχνότητες για τους Καυκάσιους πληθυσμούς σε 12%, 50%, και 11-16% αντίστοιχα (Seidegard, Vorachek et al. 1988; Cosma, Crofts et al. 1993; Hengstler, Arand et al. 1998). Υπολογίστηκαν για πρώτη φορά οι συχνότητες αυτές στον ελληνικό πληθυσμό και φαίνεται ότι ανήκουν σε γενικές γραμμές στις αντίστοιχες της Καυκάσιας φυλής. Οι διαφορές στις συχνότητες αλληλομόρφων που παρατηρούνται σε αυτήν την μελέτη και τις προηγούμενες εκθέσεις, αποδίδονται σε εθνική διαφοροποίηση.

Στον ελληνικό πληθυσμό που ανέπτυξε καρκίνο μαστού οι συχνότητες αυτές ήταν 13% για την επίπτωση του m1, ενώ για το GSTM1(-) ήταν 52% και το GSTT1(-) 14%. Η στατιστική ανάλυση των συχνοτήτων των πολυμορφισμών δεν έδειξε σημαντική διαφορά μέσα σε κάθε ομάδα καρκίνου μαστού συμπεραίνοντας την έλλειψη συσχέτισης τους με αυξανόμενο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου μαστού.

Επίσης δεν υπήρξε ουσιαστικά καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ασθενών με καρκίνο μαστού, κατά την ανάλυση των πολυμορφισμών ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό, σύμφωνα με την ηλικία εμφάνισης της ασθένειας ή την εμμηνορροϊκή κατάσταση ή την λήψη αντισυλληπτικών χαπιών. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με προηγούμενες εκθέσεις σχετικά με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού και τους ανωτέρω πολυμορφισμούς (Bailey, Roodi et al. 1998; Helzlsouer, Selmin et al. 1998; Weber and Nathanson 2000).

Για την αξιολόγηση του λειτουργικού ρόλου των γονιδίων CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 και GSTT1 στη βιολογία καρκίνου του μαστού ακολούθησε ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων τους σε 31 σποραδικά δείγματα όγκων σε σύγκριση με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς τους. Οι φυσιολογικοί ιστοί από τις ασθενείς με καρκίνο μαστού εξέθεσαν παραλλαγή κατά 11-φορές στην έκφραση του CYP1A1 mRNA, ενώ οι αντίστοιχοι φυσιολογικοί ιστοί διαφοροποιήθηκαν κατά 13-φορές, και οι δύο ομάδες ανεξάρτητα από την ηλικία, το στάδιο ή το βαθμό. Μια προηγούμενη μελέτη ανέφερε ότι σε μια ομάδα φυσιολογικών δειγμάτων μαστού και από φυσιολογικά αλλά και από άτομα με καρκίνο μαστού, η διαφοροποίηση της μεταγραφής του CYP1A1 είναι περίπου 400-φορές ανεξάρτητα από την ηλικία (Goth-Goldstein, Stampfer et al. 2000). Επιπλέον, η έκφραση του AhR mRNA ήταν μεταβλητή κατά δύο φορές περισσότερο από το CYP1A1. Τα περισσότερο διαφοροποιημένα μεταγραφικά επίπεδα, μεταξύ των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών και των καρκίνου του μαστού, ήταν εκείνα GSTT1, περίπου 28-φορές και 48-φορές, αντίστοιχα. Τα GSTM1 και GSTP1 παρουσίασαν τα λιγότερα διαφοροποιημένα επίπεδα mRNA στο σύνολο των φυσιολογικών ιστών, με 10- και 9-φορές, αντίστοιχα. Αυτά τα

αποτελέσματα προτείνουν τη μικρότερη ανοχή των καρκινικών ιστών του μαστού σε ακραία μεταγραφική απορύθμιση των GSTM1 και GSTP1 σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά ζευγάρια τους.

Τα πρότυπα απορύθμισης στην έκφραση των CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 και GSTT1 μεταξύ του φυσιολογικών και καρκινικών ιστών μαστού είναι αρκετά σύνθετα. Αυτά τα πρότυπα φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της μεταγραφικής ρύθμισης παρά αποτέλεσμα ενίσχυση ή απώλειας γονιδίων, δεδομένου ότι καμία διαφοροποίηση δεν ανιχνεύθηκε στον αριθμό αντιγράφων DNA. Γενικά, 27 από τους 31 όγκους (87%) βρέθηκαν για να εκθέτουν τη μεταγραφική απορύθμιση τουλάχιστον σε ένα από τα παραπάνω γονίδια σε σύγκριση με τους αντίστοιχους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς τους.

Ίσως το μεγαλύτερο μέρος της μηχανιστικής πληροφόρησης επικεντρώνεται στην επαγωγή των CYPs 1A από τον υποδοχέα αρωματικών υδρογονανθράκων (AhR) (Poland, Glover et al. 1976). Η μεταγραφή του CYP1A1 εξαρτάται από τα προϊόντα των γονιδίων AhR και ARNT (AhR nuclear transporter) (Nebert 1989). Δεδομένου ότι AhR είναι συνδεδεμένο στους χημικούς υποκαταστάτες του και μεταφέρεται στον πυρήνα από τον ARNT, δεσμεύεται στον υποκινητή του CYP1A1, όπου επάγει τη μεταγραφή γονιδίων. Εκτός από το CYP1A1, οι AhR και ARNT ρυθμίζουν το CYP1A2 και τέσσερα άλλα μη- P450 γονίδια, τα οποία έχουν επίσης ένα μοτίβο DNA απόκρισης του AhR (AHRE) στους υποκινητές τους (Nebert, Roe et al. 2000). Ο AhR επιδρά και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση, μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο και κύριο ρυθμιστή ρετινοβλάστωμα (pRb) (Ge and Elferink 1998) και από μια έμμεση επίδραση οξειδωτικής πίεσης στην p53 (Nebert, Roe et al. 2000). Ο AhR αλληλεπιδρά με τα στοιχεία απόκρισης του οιστρογόνου προτείνοντας την ανεπιθύμητη παρεμβολή μεταξύ του AhR και του υποδοχέα οιστρογόνων (ER), ένα ζήτημα σπουδαιότητας στη βιολογία καρκίνου του μαστού (Klinge, Bowers et al. 1999; Nguyen, Hoivik et al. 1999).

Στη μελέτη αυτή το CYP1A1 δεν συσχετίζεται με την έκφραση του AhR, εκτός από τέσσερις περιπτώσεις. Αυτό μπορεί να είναι συνέπεια της εξάρτησης του AhR με το φορτίο του υποκαταστάτη, προκειμένου να ενεργοποιηθεί η μεταγραφή του CYP1A1, παρά δέσμευση στον ARNT, δεδομένου ότι τα επίπεδα

του τελευταίου δεν αλλάζουν εντυπωσιακά μεταξύ των διαφορετικών ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του μαστού (Angus, Larsen et al. 1999). Επιπλέον, η λειτουργία του AhR θα μπορούσε να κατασταλεί από το H-ras, μέσω της παρουσίας σημειακής μεταλλαγής και να οδηγήσει στην υπο-έκφραση του CYP1A1 (Reiners, Jones et al. 1997). Επίσης προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι το H-ras υπερ-εκφράζεται σε ποσοστό 37% στους ιστούς με καρκίνο μαστού (Miyakis, Sourvinos et al. 1998). Στις περιπτώσεις καρκινικών ιστών όπου ο AhR υπερεκφράζεται και είναι οιστρογόνο εξαρτώμενοι, θεραπεία με διινδολ-μεθάνιο θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξητική επίδραση της ασθένειας (Chen, McDougal et al. 1998).

Η μεταγραφική απορύθμιση του CYP1A1 συσχετίστηκε με την έκφραση του GSTM1 και του GSTP1. Τα mRNA επίπεδα απορυθμίσθηκαν εξίσου κατά 3-φορές πιο υψηλά ή πιο χαμηλά σε 17.4% των όγκων που εξετάζονται ως προς την έκφραση του GSTM1, ενώ του GSTP1 ήταν επίσης 3-φορές υψηλότερη στο 29.0% ή χαμηλότερη στο 25.8% των περιπτώσεων. Εκτιμώντας ότι τα mRNA επίπεδα του GSTM1 ή του GSTP1 ανυψώθηκαν στους καρκινικούς ιστούς του μαστού έναντι των αντίστοιχων φυσιολογικών, εκείνα του CYP1A1 ήταν σταθερά ή χαμηλότερα. Αν και τα GSTM1 και GSTP1 θα μπορούσαν να παρέχουν προστασία ενάντια στη νεοπλασία, λόγω στη λειτουργία τους ως ένζυμα αποτοξίνωσης φάση II, θα πρέπει να θεωρηθεί ότι στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, ειδικά όταν οι όγκοι είναι οιστρογόνο εξαρτώμενοι, η αυξανόμενη ενεργότητά τους θα μπορούσε να οδηγήσει σε αντίστροφη επίδραση, λόγω της παρατηρηθείσας υπο-έκφρασης του CYP1A1 και της μειωμένης υδροξυλίωσης της 17β-οιστροδιόλης (E2).

Τα mRNA επίπεδα ήταν 5-φορές πιο υψηλά σε 33.3% των όγκων που εξετάστηκαν ως προς την έκφραση του GSTT1, έναντι των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών και τις 2-φορές χαμηλότερα σε 11.1%. Αυτό το γεγονός μαζί με την παρατήρηση της μεταβλητότητάς του και στους δύο τύπους ιστών υποδηλώνει διαφορετικό βαθμό ευαισθησίας σε αλοαλκάνια και αλοαλκένια, όπως τα THMs (brominated-trihalomethanes). Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα που εκθέτουν την ανυψωμένη έκφραση GSTT1 μπορούν να είναι επιρρεπείς σε

ανταλλαγές αδελφών χρωματιδίων, λόγω της μεταβολικής του ενεργότητας (Landi, Hanley et al. 1999).

Λαμβάνοντας υπόψη τη λειτουργική σημασία τους στο μεταβολισμό μιας σειράς χημειοθεραπευτικών ενώσεων και τη ποικιλία των μεταγραφικών προτύπων που παρουσιάστηκαν στους διαφορετικούς καρκινικούς ιστούς μαστού κατά τρόπο ανεξάρτητο ως προς ηλικία, στάδιο ή βαθμό, τα mRNA επίπεδα των CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 και GSTP1 θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα ως μοριακοί δείκτες. Η πολυπλοκότητα των μεταγραφικών προτύπων τους, ενδεχομένως λόγω της ποικιλομορφίας της φυσικής ιστορίας τους, αποδίδεται στις διαφορετικές ιδιότητες των καρκινικών ιστών, σε ένα καλά καθορισμένο βιοχημικό μονοπάτι. Η γνώση αυτών των προτύπων σε κάθε περίπτωση θα μπορούσε να οδηγήσει στην καλύτερη διαχείριση της ασθένειας, όπως η κατάλληλη χρήση των χημειοθεραπευτικών ενώσεων.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ II**

### **9. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

#### **9.1. Γενικά**

Σκοπός και αυτής της μελέτης ήταν αρχικά ο προσδιορισμός των συχνοτήτων των γενετικών πολυμορφισμών των γονιδίων αποτοξίνωσης του κυττάρου (CYP1A1, ένζυμο φάσης I, και GSTM1 και GSTT1, ένζυμο φάσης II) με αντικειμενικό στόχο και πάλι τον καθορισμό ενός απλού προγνωστικού πρωτοκόλλου ικανού να προσδιορίζει την πιθανότητα ή την ευαισθησία στην εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα σε άτομα του γενικού πληθυσμού. Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν ήταν ο CYP1A1-3'-UTR m1 για το γονίδιο CYP1A1, και η απαλοιφή (null deletion) των γονιδίων GSTM1 και GSTT1.

Στη συνέχεια οι πολυμορφισμοί αυτοί συσχετίστηκαν με στοιχεία που συλλέχθηκαν από την συμπλήρωση κατάλληλου ερωτηματολογίου από τους ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα, καθώς και από το γενικό πληθυσμό. Τα στοιχεία αυτά συμπεριλάμβαναν δημογραφικές πληροφορίες, πληροφορίες από τον τρόπο ζωής των ατόμων καθώς και κλινικά στοιχεία. Μελετήθηκε επίσης η πιθανότητα τέτοιων παραγόντων να οδηγούν σε ένα φαινοτυπικό αποτέλεσμα με μεγαλύτερη ευαισθησία κάποιων ατόμων στην ανάπτυξη του καρκίνου.

#### **9.2. Γενετική ανάλυση**

Για τη μελέτη αυτή συλλέχθηκαν 122 δείγματα χρωμοσωμικού DNA, το οποίο απομονώθηκε από περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και 178 φυσιολογικά δείγματα αντίστοιχης ηλικίας και φύλλου.

Εκτελέστηκε η τεχνική της PCR σύμφωνα με της συνθήκες που περιγράφηκαν στην προηγούμενη μελέτη του καρκίνου του μαστού. Η β-σφαιρίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός θετικός μάρτυρας στα GSTM1 και GSTT1. Χαρακτηριστικά παραδείγματα των PCR αντιδράσεων φαίνονται στις εικόνες 8.1-8.3.

### Ανάλυση ατομικών γονότυπων

Η κατανομή των γονότυπων παρατίθεται στον πίνακα 9.1. Ο επικρατής ομόζυγος (wt), ο ετερόζυγος (wt/m1) και ο σπάνιος ομόζυγος (m1) γονότυπος βρέθηκαν αντίστοιχα σε 130 (73.03%), 45 (25.28%) και 3 (1.69%) άτομα ανάμεσα στον υγιή πληθυσμό και σε 89 (72.95%), 28 (22.95%) και 5 (4.10%) άτομα από τους ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα. Το αποτέλεσμα αυτό είχε καλή προσαρμογή στην ισορροπία Hardy-Weinberg με συχνότητα γονιδίου 0.84 για το wt και 0.16 για το m1 στην ομάδα των ασθενών και αντίστοιχα 0.86 για το wt και 0.14 για το m1 στους ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα με στατιστική σημαντικότητα  $p < 0.01$  ( $\chi^2 = 1.6$ ,  $df = 1$ ).

**Πίνακας 9.1.** Κατανομή ατομικών γονότυπων στον καρκίνο του πνεύμονα

	<b>Ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα (%)</b>	<b>Ομάδα ελέγχου (%)</b>	<b>Odd ratio (95% CI)</b>
<b>Γονότυπος CYP1A1</b>			
wt	89 (72.95)	130 (73.03)	1.00
wt/m1	28 (22.95)	45 (25.28)	0.91 (0.53-1.56)
m1	5 (4.10)	3 (1.69)	2.43 (0.57-10.45)
<b>Γονότυπος GSTM1</b>			
GSTM1(+)	59 (48.36)	82 (46.07)	1.00
GSTM1(-)	63 (51.64)	96 (53.93)	0.91 (0.58-1.45)
<b>Γονότυπος GSTT1</b>			
GSTT1(+)	101 (82.79)	158 (88.76)	1.00
GSTT1(-)	21 (17.21)	20 (11.24)	1.64 (0.85-3.18)
<b>Σύνολο</b>	<b>122 (100)</b>	<b>178(100)</b>	

Η συχνότητα του CYP1A1m1, γονότυπου ανάμεσα στις ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα ήταν διαφορετική από αυτή που παρατηρήθηκε στην ομάδα ελέγχου, με τιμή 4.10%, έναντι 1.69 της δεύτερης. Από τους υπολογισμούς των λόγων σχετικού κινδύνου προκύπτει αυξημένος κίνδυνος κατά 2.43 φορές για την ανάπτυξη καρκίνου πνεύμονα στα άτομα με γονότυπο CYP1A1m1, από ότι άτομα με το γονότυπο wt (95%CI: 0.57-10.45).

Η απουσία του GSTM1 ήταν πιο συχνή στον φυσιολογικό πληθυσμό (53.93%) από ότι στους ασθενείς (51.64%), χωρίς όμως να παρουσιάζεται σημαντική διαφορά σε κάποιον από τους γονότυπους (OR=0.91, 95%CI: 0.58-1.45).



Σε σχέση με το GSTM1, η απουσία του GSTT1 είναι πολύ μικρότερη και με ποσοστά 17.21% και 11.24% σε ασθενείς και φυσιολογικά δείγματα αντίστοιχα. Η παρουσία του GSTT1 ήταν αρκετά μεγαλύτερη στα φυσιολογικά δείγματα σε σχέση με τα παθολογικά με συχνότητες 0.89 και 0.83, αντίστοιχα. Ο λόγος σχετικού κινδύνου δίνει την εκτίμηση ότι τα άτομα με γονότυπο GSTT1(-) έχουν περίπου 1.54 φορές ευαισθησία να αναπτύξουν καρκίνο πνεύμονα από εκείνα τα άτομα με γονότυπο GSTT1(+) (95%CI: 0.85-3.18).

### **Ανάλυση συνδυασμένων γονότυπων ανά δύο γονίδια**

Συνδυάζοντας τους τρεις γονότυπους του CYP1A1 με τους δύο του GSTM1 και με τους δύο του GSTT1 καθώς και οι δύο του GSTM1 με τους δύο του GSTT1 έγινε προσπάθεια ανάλυσης των δώδεκα γονότυπων που προκύπτουν και συγκρίθηκαν οι αντίστοιχες συχνότητες ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς. Αναλυτικά τα αποτελέσματα της στατικής ανάλυσης των συνδυασμένων γονότυπων ανά δύο παρατίθενται στον πίνακα 9.2.

Κατά τη στατιστική ανάλυση των συνδυασμών των γονότυπων του CYP1A1 και GSTM1 επικρατεί και στις δύο ομάδες ο γονότυπος CYP1A1wt, GSTM1(-) με ποσοστά περίπου 40%. Ο γονότυπος CYP1A1wt/m1, GSTM1 (-) παρουσιάζει μείωση κατά 29% του κινδύνου εμφάνισης της νόσου. Η συχνότητα του συνδυασμένου γονότυπου CYP1A1m1, GSTM1(-) ήταν 0.56% στην ομάδα ελέγχου. Από την άλλη πλευρά η συχνότητα του ίδιου συνδυασμένου γονότυπου στους ασθενείς ήταν 2.46% ( $p < 0.05$ ,  $\chi^2 = 1.8$ ,  $df = 1$ ). Άτομα, που είναι φορείς του συγκεκριμένου γονότυπου ήταν σε αξιοσημείωτα υψηλό κίνδυνο για καρκίνο πνεύμονα, με λόγο σχετικού κινδύνου 4.28 φορές σε σύγκριση με τον συνδυασμένο γονότυπο CYP1A1wt, GSTM1(+) (95% CI: 0.43-42.60).

Ο συνδυασμένος γονότυπος CYP1A1wt, GSTT1(+) παρουσιάζεται σε αρκετά υψηλό ποσοστό και στις δύο ομάδες ξεπερνώντας το 60 %. Από τους λιγότερο συχνούς συνδυασμένους γονότυπους, ο CYP1A1wt/m1, GSTT1(-) βρέθηκε σε συχνότητα 0.05 στις περιπτώσεις καρκίνου μαστού και μόνο σε συχνότητα 0.02 στην ομάδα ελέγχου.

**Πίνακας 9.2.** Κατανομή συνδυασμένων γονότυπων ανά δύο γονίδια στον καρκίνο του πνεύμονα

Συνδυασμένοι γονότυποι ανά 2	Ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα (%)	Ομάδα ελέγχου (%)	Odd ratio (95% CI)
<b>CYP1A1-GSTM1</b>			
wt (+)	40 (32.79)	57 (32.02)	1.00
wt (-)	49 (40.16)	73 (41.01)	0.96 (0.56-1.45)
wt/m1 (+)	17 (13.93)	23 (12.92)	1.05 (0.50-2.22)
wt/m1 (-)	11 (9.02)	22 (12.36)	0.71 (0.31-1.63)
m1 (+)	2 (1.64)	2 (1.12)	1.42 (0.19-10.54)
m1 (-)	3 (2.46)	1 (0.56)	4.28 (0.43-42.60)
<b>CYP1A1-GSTT1</b>			
wt (+)	75 (61.48)	114 (64.04)	1.00
wt (-)	14 (11.48)	16 (8.99)	1.33 (0.61-2.88)
wt/m1 (+)	22 (18.03)	41 (23.03)	0.82 (0.45-1.48)
wt/m1 (-)	6 (4.92)	4 (2.25)	2.28 (0.62-8.35)
m1 (+)	4 (3.28)	3 (1.69)	2.02 (0.44-9.31)
m1 (-)	1 (0.82)	0 (0.0)	2.52 (2.11-3.00)
<b>GSTM1-GSTT1</b>			
(+)(+)	47 (38.52)	75 (42.13)	1.00
(+)(-)	12 (9.84)	7 (3.93)	2.74 (1.00-7.44)
(-)(+)	54 (44.26)	83 (46.63)	1.04 (0.63-1.71)
(-)(-)	9 (7.38)	13 (7.30)	1.10 (0.44-2.79)
<b>Σύνολο</b>	<b>122 (100)</b>	<b>178(100)</b>	

Από το λόγο σχετικού κινδύνου εκτιμάται ότι άτομα με γονότυπο CYP1A1wt/m1, GSTT1(-) έχουν περίπου 2.28 φορές ευαισθησία στην ανάπτυξη καρκίνου πνεύμονα από ότι οι φορείς του CYP1A1wt, GSTT1(+) γονότυπου (95%CI: 0.62-8.35). Επίσης παρατηρήθηκε μια περίπτωση με γονότυπο CYP1A1m1/ GSTT1(-) στα παθολογικά δείγματα και καμία στα φυσιολογικά. Αυτό όμως δεν οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία καθώς δεν είναι στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p>0.05$ ,  $\chi^2=1.5$ ,  $df=1$ ).

Στατιστικά σημαντική διαφορά με  $p<0.01$  ( $\chi^2=4.1$ ,  $df=1$ ) παρουσιάζει ο γονότυπος GSTM1(+), GSTT1(-) με συχνότητα 9.84% στους ασθενείς και 2.74 φορές κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα από τον γονότυπο GSTM1(+), GSTT1(+).

### Ανάλυση συνδυασμένων γονότυπων ανά τρία γονίδια

Για την εκτίμηση συγκεκριμένου γονότυπου με μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανάπτυξη καρκίνου πνεύμονα έγινε και ανάλυση των συχνοτήτων πολυμορφισμών συνδυάζοντας και τα τρία γονίδια. Τα ποσοστά καθώς και οι λόγοι σχετικού κινδύνου παρατίθενται στον πίνακα 9.3. Ο πιο συχνά εμφανιζόμενος συνδυασμός γονότυπων ήταν ο CYP1A1wt, GSTM1(-), GSTT1(+) με ποσοστό περίπου 34% και για τις δύο ομάδες και ακολουθεί ο CYP1A1wt, GSTM1(+), GSTT1(+) με 27% για τους ασθενείς και 29% για την ομάδα ελέγχου.

Η συχνότητα του συνδυασμένου γονότυπου CYP1A1wt/m1, GSTM1(+), GSTT1(-) ήταν 1.12% στην ομάδα ελέγχου, ενώ στην ομάδα των ασθενών ήταν 4.10% ( $p < 0.05$ ,  $\chi^2 = 2.89$ ,  $df = 1$ ). Ο συγκεκριμένος γονότυπος παρουσιάζει αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο πνεύμονα με σχετικό λόγο κινδύνου 3.94 φορές σε σύγκριση με το συχνό συνδυασμένο γονότυπο CYP1A1wt, GSTM1(+), GSTT1(+) (95%CI: 0.72-21.50). Αυτός ήταν από τους υψηλότερους με στατιστικά σημαντική διαφορά γονότυπους που παρατηρήθηκε.

**Πίνακας 9.3.** Κατανομή συνδυασμένων γονότυπων των CYP1A1, GSTM1 και GSTT1 στον καρκίνο του πνεύμονα

Συνδυασμένοι γονότυποι ανά 3	Ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα (%)	Ομάδα ελέγχου (%)	Odd ratio (95% CI)
<b>CYP1A1-GSTM1-GSTT1</b>			
wt (+) (+)	33 (27.05)	52 (29.21)	1.00
wt (+) (-)	7 (5.74)	5 (2.81)	2.21 (0.65-7.53)
wt (-) (+)	42 (34.43)	62 (34.83)	1.07 (0.54-1.92)
wt (-) (-)	7 (5.74)	11 (6.18)	1.00 (0.35-2.85)
wt/m1 (+) (+)	12 (9.84)	21 (11.80)	0.90 (0.39-2.07)
wt/m1 (+) (-)	5 (4.10)	2 (1.12)	3.94 (0.72-21.50)
wt/m1 (-) (+)	10 (8.20)	20 (11.24)	0.79 (0.33-1.89)
wt/m1 (-) (-)	1 (0.82)	2 (1.12)	0.79 (0.07-9.04)
m1 (+) (+)	2 (1.64)	2 (1.12)	1.58 (0.21-11.74)
m1 (+) (-)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
m1 (-) (+)	2 (1.64)	1 (0.56)	3.15 (0.28-36.15)
m1 (-) (-)	1 (0.82)	0 (0.0)	-
<b>Σύνολο</b>	<b>122 (100)</b>	<b>178(100)</b>	

### 9.3. Κατανομή ασθενών σε σχέση με δημογραφικά στοιχεία και με περιβαλλοντικούς παράγοντες

Τα άτομα και των δύο πληθυσμών, ασθενών με καρκίνο πνεύμονα και γενικό πληθυσμό, ήταν όλα ελληνικής καταγωγής, μέλη της Καυκάσιας φυλής. Τα στοιχεία που συλλέχθηκαν με βάση το ερωτηματολόγιο αναφέρονται στους παρακάτω πίνακες.

**Πίνακας 9.4.** Χαρακτηριστικά των δύο πληθυσμών

Χαρακτηριστικά	Ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα (%)	Ομάδα ελέγχου (%)
<b>Φύλλο</b>		
Άντρες	105 (86.1)	148 (83.1)
Γυναίκες	17 (13.9)	30 (16.9)
<b>Ηλικία</b>	64.6±10.5	57.2±15.4
<b>Διαμονή</b>		
Αγροτική (>75%διάρκεια ζωής)	44 (36.1)	37 (20.8)
Μικτή αγροτική και αστική	45 (36.8)	59 (33.1)
Αστική (>75%διάρκεια ζωής)	33 (27.1)	82 (46.1)
<b>Κάπνισμα</b>		
Μη καπνιστές	23 (20)	48 (27)
Καπνιστές	97 (80)	130 (73)
packs/year	54±20	50±22
<b>Έκθεση σε γνωστά ή ύποπτα καρκινογόνα</b>		
Ποτέ	21 (19.3)	36 (27.1)
Χαμηλή	65 (59.6)	76 (57.1)
Υψηλή	23 (21.1)	21 (15.8)
Άγνωστο	13	45

Η επιλογή της ομάδας ελέγχου έγινε έτσι ώστε να υπάρχει ομοιογένεια ως προς την αναλογία των δύο φύλων. Το ποσοστό των ανδρών που εμφανίζουν καρκίνο πνεύμονα είναι αρκετά μεγαλύτερο (>80%) σε σχέση με τις γυναίκες, αν και τα τελευταία χρόνια ο ρυθμός εμφάνισης των γυναικών που νοσούν είναι επικίνδυνα αυξητικός.

## Ηλικία

Η μέση τιμή της ηλικίας της ομάδας ελέγχου είναι μικρότερη από την αντίστοιχη των περιπτώσεων καρκίνου. Το εύρος των ηλικιών στην πρώτη ομάδα κυμάνθηκε από 28 έως 83 έτη σε αντίθεση με το μικρότερο εύρος για τους ασθενείς (40-86 ετών). Ο καρκίνος του πνεύμονα εμφανίζεται κυρίως σε μεγάλες ηλικίες περιορίζοντας έτσι το εύρος των τιμών. Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι κατανομές των γονότυπων στις διάφορες ηλικίες.

**Πίνακας 9.5.** Κατανομή γονότυπων ανάλογα με την ηλικία

Ομάδα ελέγχου	Ηλικία (Έτη)				
	≤49 (%)	50-59 (%)	60-69 (%)	70-79 (%)	≥80 (%)
<b>CYP1A1</b>					
wt	36 (72)	24 (73.9)	33 (76.7)	15 (68.2)	12 (70.6)
wt/m1 & m1	14 (28)	12 (26.1)	10 (23.3)	7 (37.8)	5 (29.4)
<b>GSTM1</b>					
παρουσία	22 (44)	21 (45.7)	21 (48.8)	10 (55.5)	8 (47.1)
απουσία	28 (56)	25 (54.3)	22 (51.2)	12 (54.5)	9 (52.9)
<b>GSTT1</b>					
παρουσία	46 (92)	41 (88.1)	38 (88.4)	18 (81.8)	15 (88.2)
απουσία	4 (8)	5 (10.9)	5 (11.6)	4 (18.2)	2 (11.8)
Σύνολο	50	46	43	22	17
<b>Ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα</b>	<b>≤49 (%)</b>	<b>50-59 (%)</b>	<b>60-69 (%)</b>	<b>70-79 (%)</b>	<b>≥80 (%)</b>
<b>CYP1A1</b>					
wt	7 (71.4)	25 (80.7)	29 (78.4)	21 (61.8)	6 (66.7)
wt/m1 & m1	2 (28.6)	6 (19.3)	8 (21.6)	13 (38.2)	3 (33.3)
<b>GSTM1</b>					
παρουσία	5 (55.6)	16 (51.6)	19 (51.4)	16 (47.1)	2 (22.2)
απουσία	4 (44.4)	15 (48.4)	18 (48.6)	18 (52.9)	7 (77.8)
<b>GSTT1</b>					
παρουσία	9 (100)	30 (96.8)	26 (70.3)	29 (85.3)	5 (55.6)
απουσία	0 (0)	1 (3.20)	11 (29.7)	5 (14.7)	4 (44.4)
Σύνολο	9	31	37	34	9

Παρατηρήθηκε συγκέντρωση περιπτώσεων που χαρακτηρίζονται από απουσία του GSTT1 (29.7%) στην δεκαετία των 60-69 ετών στα άτομα που εμφάνισαν τη νόσο ( $p < 0.05$ ). Στο φυσιολογικό πληθυσμό το ποσοστό αυτό είναι 11.6%. Η ευαισθησία των ατόμων με GSTT1(-) να εμφανίσουν καρκίνο είναι 11.4 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τις ηλικίες 50-59 ετών  $p > 0.05$ , (95%CI: 0.1-1.1) και 5.4 φορές σε σχέση με τις ηλικίες 70-79,  $p > 0.05$  (95%CI: 0.1-1.7). Αν και σε ηλικίες  $> 80$  ετών είναι σημαντική η απουσία του GSTT1, παρόλα αυτά δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p > 0.1$ ).

Σύμφωνα με το τεστ ομοιογένειας των μεταβλητών (test of homogeneity of variables και ANOVA) η ύπαρξη δύο μεταλλαγμένων γονότυπων από οποιαδήποτε από τα τρία γονίδια είναι πολύ πιο συχνή σε μέσο όρο ηλικίας  $69 \pm 8.8$  ετών με στατιστική σημαντικότητα  $p < 0.017$ .

Οποιαδήποτε προσπάθεια για συσχέτιση ηλικίας και φύλλου δεν έδωσε αποτέλεσμα, συμπεραίνοντας ότι αυτές οι δύο μεταβλητές δεν μπορούν να συσχετιστούν στην συγκεκριμένη περίπτωση.

### **Διαμονή και Έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες**

Η κατανομή των πληθυσμών με βάση την καταγωγή και τον τόπο διαμονής τους κατά τη διάρκεια της ζωής τους δίνει παρόμοια ποσοστά σε εκείνους που επέλεξαν και αγροτική και αστική περιοχή. Οι ασθενείς προέρχονται σε μεγαλύτερη συχνότητα από αγροτική περιοχή σε σχέση το φυσιολογικό πληθυσμό ( $P = 0.004$ ) και σε μικρότερη από αστική. Αντίθετα τα άτομα της ομάδας ελέγχου είναι κυρίως κάτοικοι πόλης που βρέθηκαν στο νοσοκομείο είτε για εξετάσεις ρουτίνας, είτε συνόδευσαν κάποιον οικείο τους ασθενή.

Το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών από αγροτική περιοχή μπορεί να εξηγηθεί και σε συνάρτηση με την επαγγελματική έκθεση σε γνωστές ή ύποπτες καρκινογόνες ουσίες. Υψηλότερο ήταν το ποσοστό των περιπτώσεων καρκίνου πνεύμονα που είχαν εκτεθεί σε γνωστά ή ύποπτα καρκινογόνα κατά τη διάρκεια της ζωής τους ( $p = 0.04$ ). Ένας σημαντικός αριθμός ασθενών ήταν αγρότες είτε ως κύριο επάγγελμα είτε ως δεύτερη ασχολία, το οποίο σημαίνει άμεση επαφή με φυτοφάρμακα και άρα υψηλού κινδύνου έκθεση. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε σύνολο

122 περιπτώσεων καρκίνου πνεύμονα, 19 άτομα (15.6%) είχαν άμεση και χρόνια επαφή με γεωργικές εργασίες ( $p=0.05$ ). Η συχνότητα εμφάνισης του γονότυπου GSTT1(-) ήταν 31% στην κατηγορία αυτή ( $\chi^2=5.6$ ,  $p>0.1$ ). Η συσχέτιση όμως αυτή χάνεται όταν ο συγκεκριμένος γονότυπος συνεξεταστεί με τους γονότυπους των άλλων δύο γονιδίων και κυρίως με του GSTM1, ενισχύοντας την συνεργιστική τους δράση.

Ένα άλλο από τα συχνά επαγγέλματα στην ομάδα των καρκινοπαθών ήταν αυτό του ναυτικού (7.3%). Λόγω των συνθηκών που επικρατούν στα μηχανοστάσια των πλοίων και σε συνδυασμό με τον όχι τόσο υγιεινό τρόπο διατροφής τους, το υψηλό ποσοστό καπνίσματος και το επιβαρημένο ατομικό αναμνηστικό τους, το επάγγελμα του ναυτικού κατατάσσεται στα επαγγέλματα με υψηλή έκθεση σε τοξικούς εξωγενείς παράγοντες. Και σε αυτή τη κατηγορία επαγγέλματος η απουσία του GSTT1 ήταν σε μεγάλο ποσοστό (44%), λόγω όμως του μικρού αριθμού δειγμάτων τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά ( $p>0.1$ ). Υψηλή έκθεση σε γνωστές ή ύποπτες καρκινογόνες ουσίες λόγω επαγγέλματος, τόσο στους ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα, όσο και στην ομάδα ελέγχου, συναντάται σε άτομα που ήταν εργαζόμενοι σε λατομεία, σε ορισμένου είδους βιομηχανίες, καθώς και οι ελαιοχρωματιστές και άλλα επαγγέλματα που έχουν χρόνια έκθεση σε κάποια ή περισσότερες από αυτές τις ουσίες.

Το συγκεκριμένο ποσοστό του GSTT1 (-) στην ομάδα ελέγχου με υψηλή έκθεση σε περιβαλλοντικούς τοξικούς παράγοντες δεν ξεπέρασε το 20% στο σύνολο των περιπτώσεων. Συμπερασματικά φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των φορέων του GSTT1(-) και της χρόνιας έκθεσης σε επαγγελματικά επιβαρημένο περιβάλλον. Ο συσχετισμός όμως αυτός μειώνεται σημαντικά κατά την ανάλυση του συνδυασμού γονότυπων ( $\chi^2=0.7$ ,  $p>0.1$ ).

Όσο αφορά το κάπνισμα το μεγαλύτερο ποσοστό και των δύο ομάδων ήταν χρόνιοι καπνιστές και μάλιστα με μεγάλη κατανάλωση καπνού το χρόνο (>50 πακέτα ανά έτος). Το ποσοστό των καπνιστών ήταν μεγαλύτερο στους ασθενείς από την ομάδα ελέγχου ( $p<0.1$ )

### 9.3.1. Συσχέτιση συχνότητας πολυμορφισμών και καπνίσματος

Οι δύο ομάδες της μελέτης του καρκίνου του πνεύμονα, αφού χωρίστηκαν σε καπνιστές και μη, συσχετίστηκαν με το γονότυπο του κάθε ατόμου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 9.6.

**Πίνακας 9.6.** Κατανομή γονότυπων με βάση τη καπνιστική συνήθεια

Γονίδιο	Καπνιστές		Μη καπνιστές	
	Ασθενείς (%)	Controls (%)	Ασθενείς (%)	Controls (%)
<b>GSTM1</b>				
παρουσία	48 (49)	60 (46)	11 (44)	22 (56)
απουσία	49 (51)	70 (54)	14 (56)	26 (54)
<b>GSTT1</b>				
παρουσία	80 (82)	117 (87)	21 (84)	41 (85)
απουσία	17 (18)	13 (10)	4 (16)	7 (15)
<b>CYP1A1</b>				
wt	76 (78)	107 (82)	13 (52)	23 (48)
wt/m1	19 (20)	20 (15)	9 (36)	25 (52)
m1	2 (2)	3 (2)	3 (12)	0

Παρατηρήθηκε ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό του ετερόζυγου και του ομόζυγου μεταλλαγμένου γονότυπου του CYP1A1 στην ομάδα των μη καπνιστών. Στην ομάδα ελέγχου το ποσοστό αυτό αγγίζει το 52% στον ετερόζυγο τύπο, ενώ δεν βρέθηκε κανένα δείγμα με τον ομόζυγο μεταλλαγμένο τύπο. Στην ομάδα των ασθενών τα ποσοστά αυτά κυμάνθηκαν στο 36% και 12% αντίστοιχα ( $p < 0.05$ ). Αυτό το αποτέλεσμα είναι αξιοσημείωτο αφού ο κύριος ρόλος του CYP1A1 είναι ο μεταβολισμός του βενζο(α)πυρενίου, κύριου συστατικού του καπνού του τσιγάρου. Μεταλλαγή στο συγκεκριμένο γονίδιο θα οδηγούσε κανονικά σε μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου για την αποτοξίνωση της καρκινογόνου ουσίας ή σε υπερέκφραση του γονιδίου και συσσώρευση των κυταρροτοξικών ενδιάμεσων στον οργανισμό. Η μεγάλη συχνότητα του συγκεκριμένου γονότυπου τόσο στην ομάδα των ασθενών όσο και στην ομάδα ελέγχου, δείχνει ότι το κάπνισμα δε δρα συνεργιστικά με το μεταλλαγμένο γονότυπο για την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα.



Η αυξανόμενη τάση που δείχνει η απουσία του GSTM1 στους μη καπνιστές ασθενείς (56%,  $p=0.1$ ) θα μπορούσε να συσχετιστεί με την εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα, καθώς η παρουσία του καταλύει τα γενοτοξικά προϊόντα του CYP1A1. Δηλαδή ο μεταλλαγμένος γονότυπος του CYP1A1 και η απουσία του GSTM1 οδηγεί σε ατελή μεταβολισμό καρκινογόνων ουσιών και συσσωρευση τους στον οργανισμό. Όμως όπως φαίνεται ο συγκεκριμένος αυτός συνδυασμός γονότυπων δε μπορεί όμως να συσχετιστεί με το κάπνισμα, άλλα έχει να κάνει με το μεταβολισμό διαφορετικών καρκινογόνων ουσιών από αυτές που συναντιόνται στον καπνό του τσιγάρου.

Οριακά στατιστικά σημαντική παρουσιάστηκε να είναι η παρουσία του ετερόζυγου μεταλλαγμένου γονότυπου του CYP1A1 στους καπνιστές που εμφάνισαν καρκίνο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ( $\chi^2=2.4$ ,  $p\geq 0.05$ ). Ανάμεσα στους καπνιστές οι φορείς αυτού του γονότυπου είχαν σχεδόν 1.5 φορές υψηλότερο κίνδυνο για καρκίνο από τους φορείς του επικρατούς CYP1A1wt γονότυπου ( $P<0.05$ , τεστ για ομοιογένεια).

Στη συνέχεια η ομάδα των καπνιστών χωρίστηκε σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το πόσο εκτεθειμένοι είναι στο καπνό του τσιγάρου, δηλαδή  $\leq 50$  πακέτα ανά έτος (ελαφρά καπνιστές) και  $>50$  πακέτα ανά έτος (βαριά καπνιστές).

**Πίνακας 9.7.** Συχνότητες πολυμορφισμών στους καπνιστές

	CYP1A1			GSTM1		GSTT1	
	wt	wt/m1	m1	(+)	(-)	(+)	(-)
	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %
ομάδα ελέγχου							
$\leq 50$ p/y (n=63)	51 (81)	10 (16)	2 (3)	32(51)	31 (49)	56 (89)	7 (11)
$>50$ p/y (n=57)	56 (84)	10 (15)	1 (1)	28 (42)	39 (58)	51 (89)	6 (11)
Ασθενείς							
$\leq 50$ p/y (n=33)	27 (82)	6 (18)	0	16 (48)	16 (52)	27 (85)	5 (15)
$>50$ p/y (n=60)	45 (75)	13 (22)	2 (3)	25 (42)	35 (58)	58 (80)	12 (20)

Η κατανομή των συχνοτήτων των πολυμορφισμών των γονιδίων δεν παρουσίασε κάποιον ισχυρό συσχετισμό των δύο παραγόντων κατά των συνδυασμό των γονιδίων. Ανεβασμένο ήταν το ποσοστό του CYP1A1wt/m1 γονότυπου στους βαριά καπνιστές, καθώς επίσης του GSTT1(-) στην ίδια

κατηγορία. Κατά τον υπολογισμό των λόγων σχετικού κινδύνου με ομάδα αναφοράς την ομάδα των μη καπνιστών, άτομα με γονότυπο CYP1A1wt/m1 και m1 που ήταν βαριά καπνιστές είχαν περίπου διπλάσιο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο ( $\chi^2=2.9$ ,  $p=0.05$ ). Αρκετά υψηλή ήταν και η ευαισθησία για εμφάνιση της νόσου στην ίδια ομάδα ασθενών που χαρακτηριζόταν από απουσία του GSTT1. Αυτό είναι αξιοσημείωτο γιατί ο ρόλος του GSTT1 με το κάπνισμα δεν είναι ακόμα καλά καθορισμένος. Αντίθετα δεν παρουσιάστηκε καμία συσχέτιση με το κάπνισμα και το GSTM1, αν και το τελευταίο είναι υπεύθυνο για το μεταβολισμό πολλών καρκινογόνων ουσιών που βρίσκονται στο καπνό του τσιγάρου.

Τα αποτελέσματα των λόγων σχετικών για το κάθε γονίδιο παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 9.8.** Λόγοι σχετικού κινδύνου ανάμεσα σε καπνιστές και μη

	<b>GSTM1</b>				<b>GSTT1</b>			
	<b>(+)</b>		<b>(-)</b>		<b>(+)</b>		<b>(-)</b>	
	n <sup>a</sup>	OR (95%CI)	n <sup>a</sup>	OR (95%CI)	n <sup>a</sup>	OR (95%CI)	n <sup>a</sup>	OR (95%CI)
Μη καπνιστές	11/22	1	14/26	1.1(0.4-2.8)	21/41	1	4/7	1.1(0.3-4.2)
Καπνιστές	48/60	1.6(0.7-3.6)	49/70	1.4(0.6-3.1)	80/117	1.3(0.7-2.4)	17/13	2.6(1.0-6.2)
≤50p/y	16/32	1.0(0.4-2.6)	16/31	1.0(0.4-2.6)	27/56	0.9(0.5-1.9)	5/7	1.4(0.4-4.9)
>50p/y	25/28	1.8(0.7-4.4)	35/39	1.8(0.8-4.2)	58/51	2.2(1.2-4.2)	12/6	3.9(1.3-11.9)

	<b>CYP1A1</b>							
	<b>wt</b>		<b>wt/m1</b>		<b>m1</b>		<b>wt/m1&amp;m1</b>	
	n <sup>a</sup>	OR (95%CI)	n	OR (95%CI)	n	OR (95%CI)	n	OR (95%CI)
Μη καπνιστές	13/23	1	9/25	0.6(0.2-1.8)	3/0	-	12/25	0.8(0.3-2.2)
Καπνιστές	76/107	1.3(0.6-2.6)	19/20	1.7(0.7-4.2)	2/3	1.2(0.2-8.0)	21/23	1.6(0.7-4.0)
≤50p/y	27/51	0.9(0.4-2.1)	6/10	1.1(0.3-3.6)	0/2	-	6/12	0.9(0.3-2.9)
>50p/y	45/56	1.4(0.7-3.1)	13/10	2.3(0.8-6.7)	2/1	3.5(0.3-42.9)	15/11	2.4(0.9-6.8)

<sup>a</sup>ασθενείς/ομάδα ελέγχου

Στη συνέχεια παρουσιάζονται χαρακτηριστικά που αφορούν την κλινική εικόνα των ασθενών.

**Πίνακας 9.9.** Χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο πνεύμονα

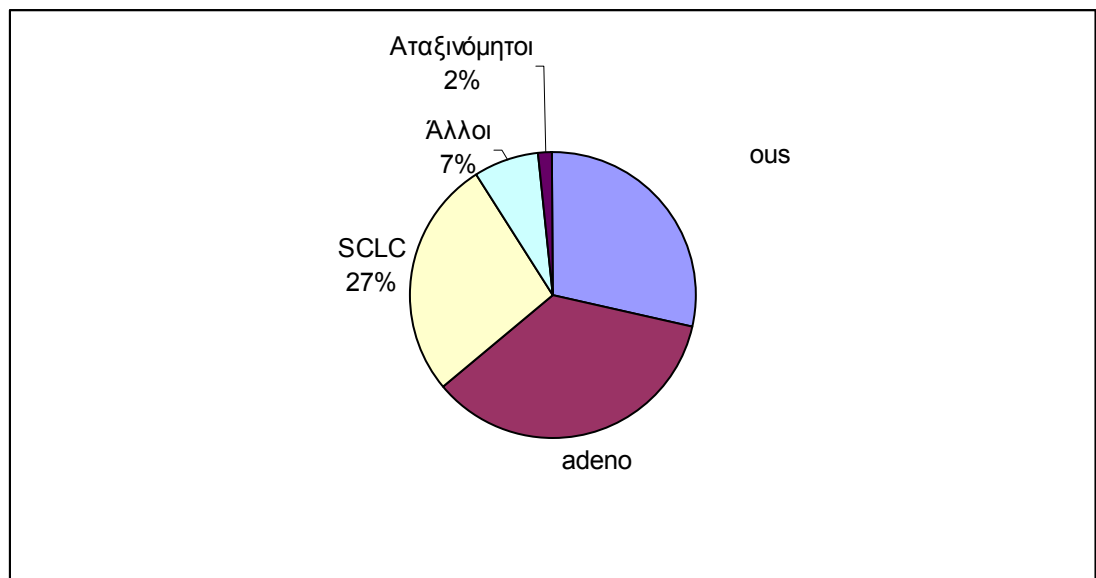
<b>Ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα n=122 (%)</b>	
<b>Διάγνωση</b>	
Μικροκυτταρικό (SCLC)	33 (27.5)
Πλακώδεις (Squamous LC)	35 (29.2)
Αδενοκαρκίνωμα (Adenocarcinoma)	43 (35.8)
Άλλοι τύποι	9 (7.5)
Αταξινόμητοι	2
<b>Οικογενειακό Ιστορικό</b>	
Ναι	16 (17)
Όχι	78 (83)
Άγνωστο	28
<b>Ατομικό Αναμνηστικό</b>	
Όχι	30 (28.6)
ΧΑΠ	21 (20.0)
TBC	3 (2.9)
Πνευμονία	4 (3.8)
Βρογχιεκτασίες	3 (2.9)
Άλλο	44 (41.9)
Άγνωστο	17
<b>Θεραπεία</b>	
Χημειοθεραπεία (α)	32 (27.8)
Εγχείρηση (β)	11 (9.6)
Ακτινοθεραπεία (γ)	7 (6.1)
(α)+(β)	17 (14.8)
(α)+(γ)	2 (1.7)
(β)+(γ)	16 (13.9)
(α)+(β)+(γ)	4 (3.5)
Καμία	26 (22.6)
Άγνωστο	7
<b>Επιβίωση</b>	
Ναι	53 (52.5)
Θάνατος	
≤6μήνες από τη διάγνωση	26 (25.7)
>6μήνες από τη διάγνωση	22 (21.8)
Άγνωστο	51

#### 9.4. Ιστολογικοί τύποι και συχνότητες πολυμορφισμών των γονιδίων CYP1A1, GSTM1 και GSTT1

Σε περαιτέρω διερεύνηση της συχνότητας των πολυμορφισμών των υπό εξέταση γονιδίων και τη συσχέτιση τους με την ευαισθησία στον καρκίνο του πνεύμονα, αναλύθηκε η σχέση μεταξύ των ιστολογικών τύπων του καρκίνου και των συγκεκριμένων πολυμορφισμών. Μια τέτοια μελέτη έχει σκοπό, εκτός από τον προγνωστικό έλεγχο, να προβλέψει την επιτυχία ή όχι ενός θεραπευτικού πρωτοκόλλου.

Όπως φαίνεται από το παρακάτω διάγραμμα μεγαλύτερη είναι η συχνότητα των αδενοκαρκινωμάτων ανάμεσα στους ασθενείς.

#### Συχνότητα ιστολογικών τύπων στους ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα



Άτομα με τον ομόζυγο μεταλλαγμένο τύπο του CYP1A1 ήταν σε αξιοσημείωτα μεγαλύτερο κίνδυνο (4.5 φορές μεγαλύτερο) να αναπτύξουν αδενοκαρκίνωμα από άλλο ιστολογικό τύπο καρκίνου του πνεύμονα (95%CI:0.9-23.3,  $\chi^2=3.8$ ,  $p>0.05$ ). Μεγαλύτερος ήταν επίσης και ο κίνδυνος για τον ίδιο τύπο στους φορείς του γονότυπου GSTM(-) ( $\chi^2=3.5$ ,  $p>0.01$ ). Πίνακας 9.8.

Αντίθετα ο ετερόζυγος μεταλλαγμένος γονότυπος του CYP1A1 φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο στην ανάπτυξη πλακώδους καρκινώματος με  $p=0.05$ , ( $\chi^2=3.1$ ) ως προς τους άλλους τύπους καρκίνου.

Μείωση του κινδύνου στην ανάπτυξη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα φαίνεται να προκύπτει από την απουσία του GSTM1 και ως προς τους άλλους τύπους (OR=0.4, 95%CI: 0.2-0.9), αλλά και ως προς την ομάδα ελέγχου ( $\chi^2=4.7$ ,  $p>0.01$ ).

**Πίνακας 9.10.** Κατανομή ατομικών γονότυπων στους διάφορους ιστολογικούς τύπους.

γονό- τυπος	ομάδα ελέγχου (%)	Όλοι οι τύποι καρκίνου (%)		Μικροκυτταρικός (%)		Πλακώδες (%)		Αδενοκαρκίνωμα (%)	
	n=178	n=122	OR (95%CI)	n=33	OR (95%CI)	n=35	OR(95%CI)	n=43	OR(95%CI)
<b>CYP1A1</b>									
wt	130(73)	89(73)	1	23(70)	1	30(86)	1	29(67)	1
wt/m1	45(25)	28(23)	0.9(0.5-1.6)	9 (27)	1.1(0.5-2.6)	4 (11)	0.4(0.1-1.2)	11(26)	1.1(0.5-2.4)
m1	3(2)	5 (4)	2.4(0.6-10.4)	1 (3)	1.9(0.2-18.9)	1 (3)	1.4(0.1-14.4)	3 (7)	4.5 (0.9-23.3)
<b>GSTM1</b>									
παρουσία	82(46)	59(48)	1	22(67)	1	16(46)	1	13(30)	1
απουσία	96(54)	63(52)	0.9(0.6-1.4)	11(33)	0.4(0.2-0.9)	19(54)	1.0(0.5-2.1)	30(70)	2.0(1.0-4.0)
<b>GSTT1</b>									
παρουσία	158(89)	101(83)	1	26(74)	1	29(83)	1	37(86)	1
απουσία	20(11)	21 (17)	1.6(0.8-3.2)	7 (26)	2.1(0.8-5.5)	6 (17)	1.6(0.6-4.4)	6 (14)	1.3(0.5-3.4)

Για να εξεταστεί κατά πόσο μια τέτοια συσχέτιση είναι αρκετά δυνατή, έγινε κατανομή των συνδυασμένων γονότυπων ανά δύο γονίδια ανάμεσα στους διάφορους ιστολογικούς τύπους.

Πραγματικά ο συνδυασμένος γονότυπος CYP1A1m1 και GSTM1(-) με συχνότητα 7% στους ασθενείς που ανέπτυξαν αδενοκαρκίνωμα και μόλις 0.6% στην ομάδα ελέγχου, δίνει αξιοσημείωτα μεγάλη ευαισθησία για την εμφάνιση του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου του πνεύμονα με σχετικό κίνδυνο 19 φορές περισσότερο ( $\chi^2=10$ ,  $p>0.05$ ). Τα μεγάλα όρια εμπιστοσύνης οφείλονται στο μικρό αριθμό δειγμάτων, παρόλα αυτά η στατιστικά σημαντική διαφορά παραμένει. Στον ίδιο τύπο καρκινώματος αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη του έχουν και οι φορείς του συνδυασμένου γονότυπου GSTM1(-) GSTT1(+) με συχνότητα εμφάνισης 58% και  $p<0.05$  ( $\chi^2=2.8$ ). Τα ποσοστά εμφάνισης του συγκεκριμένου γονότυπου είναι υψηλά και στις περιπτώσεις των άλλων τύπων καρκίνου του πνεύμονα, καθώς και στην ομάδα ελέγχου, χωρίς όμως να παρατηρείται σημαντικά στατιστικά διαφορά (πίνακας 9.9). Αντίθετα μάλιστα αυτός ο

συνδυασμένος γονότυπος φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης για μικροκυτταρικό τύπο καρκίνου κατά 60%, ( $\chi^2=2.9$ ,  $p\leq 0.05$ ).

Ένας άλλος επικίνδυνος συνδυασμός γονότυπου είναι ο GSTM1(+) GSTT1(-), χαρακτηρίζεται δηλαδή από απαλοιφή του γονιδίου GSTT1 και παρουσία του γονιδίου GSTM1. Άτομα, φορείς του συγκεκριμένου γονότυπου βρίσκονται σε 3.2 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν μικροκυτταρικό καρκίνο και σε 3.6 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου πλακώδους τύπου, σε σύγκριση με τα άτομα που χαρακτηρίζονται από γονότυπο με την παρουσία και των δύο γονιδίων. Οι τιμές των  $\chi^2$  τεστ για τις παραπάνω κατηγορίες ήταν 3.4 και 3.6 για μικροκυτταρικό και πλακώδες καρκίνωμα αντίστοιχα και με σημαντικότητα  $p\leq 0.05$ .

**Πίνακας 9.11.** Κατανομή συνδυασμένων γονότυπων ανά κατηγορία ιστολογικού τύπου.

Συνδυασμένοι γονότυποι ανά 2	Ομάδα ελέγχου (%) n=178	Μικροκυτταρικός		Πλακώδες		Αδενοκαρκίνωμα	
		n=33	OR (95%CI)	n=35	OR (95%CI)	n=43	OR (95%CI)
<b>CYP1A1-GSTM1</b>							
wt (+)	57 (32.02)	14(42)	1	13(37)	1	9 (21)	1
wt (-)	73 (41.01)	9 (27)	0.5 (0.2-1.2)	17(49)	1.0 (0.5-2.3)	20(47)	1.7 (0.8-4.1)
wt/m1 (+)	23 (12.92)	7 (21)	1.2 (0.4-3.5)	2 (6)	0.4 (0.1-1.8)	4 (9)	1.1(0.3-4)
wt/m1 (-)	22 (12.36)	2 (6)	0.4 (0.1-1.8)	2 (6)	0.4 (0.1-1.9)	7 (16)	2.0 (0.7-6.1)
m1 (+)	2 (1.12)	1 (3)	2.0 (0.2-24.1)	1 (3)	2.2 (0.2-26.0)	0	-
m1 (-)	1 (0.56)	0	-	0	-	3 (7)	<b>19 (1.8-203)</b>
<b>CYP1A1-GSTT1</b>							
wt (+)	114 (64.04)	19(58)	1	25(71)	1	26(60)	1
wt (-)	16 (8.99)	4 (12)	1.5 (0.5-5.0)	5 (14)	1.4 (0.5-4.2)	3 (7)	0.8 (0.2-3.0)
wt/m1 (+)	41 (23.03)	6 (18)	0.9 (0.3-2.4)	3 (9)	<b>0.3 (0.1-1.2)</b>	9 (21)	1.0 (0.4-2.2)
wt/m1 (-)	4 (2.25)	3 (9)	<b>4.5 (1.0-21.7)</b>	1 (3)	1.1 (.1-10.6)	2 (5)	2.2 (0.4-12.6)
m1 (+)	3 (1.69)	1 (3)	2.0 (0.2-20.2)	1 (3)	1.5 (0.2-15.2)	2 (5)	2.9 (0.5-18.4)
m1 (-)	0 (0.0)	0	-	0	-	1 (2)	-
<b>GSTM1-GSTT1</b>							
(+)(+)	75 (42.13)	17(52)	1	12(34)	1	12(28)	1
(+)(-)	7 (3.93)	5 (15)	<b>3.2 (0.9-11.1)</b>	4 (11)	<b>3.6 (0.9-14.1)</b>	1 (2)	0.9 (0.1-7.9)
(-)(+)	83 (46.63)	9 (27)	<b>0.5 (0.2-1.1)</b>	17(49)	1.3 (0.6-2.9)	25(58)	<b>1.9 (0.9-4.0)</b>
(-)(-)	13 (7.30)	2 (6)	0.7 (0.1-3.3)	2 (6)	1.0 (0.2-4.8)	5 (12)	2.4 (0.7-8.0)

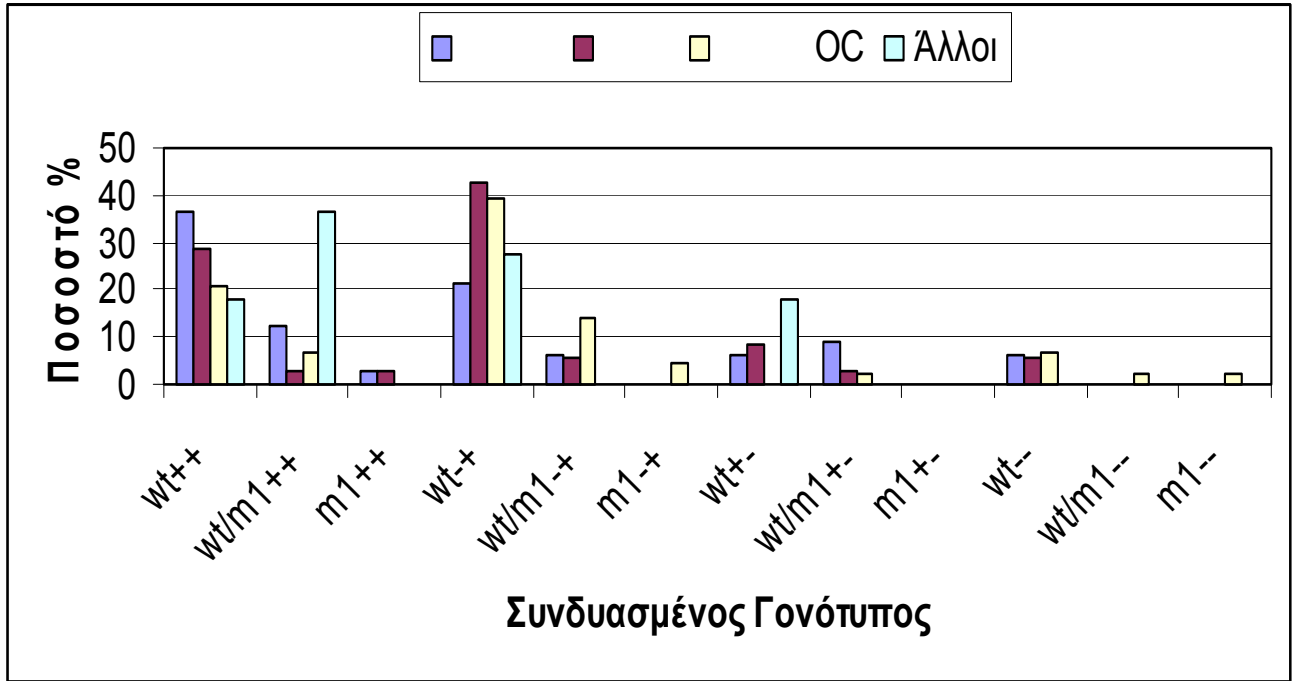
Οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά με αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση μικροκυτταρικού καρκίνου έναντι των άλλων ιστολογικών τύπων και των ατόμων της ομάδας ελέγχου παρουσιάζεται στα άτομα με ετερόζυγο γονότυπο CYP1A1 και απαλοιφή του GSTT1 με λόγο σχετικού κινδύνου 4.5 και  $p\leq 0.05$  ( $\chi^2=4.1$ ).

Προστατευτικός παρουσιάζεται να είναι ο ρόλος του γονότυπου CYP1A1wt/m1, GSTT1(+) στην εμφάνιση πλακώδους καρκινώματος ( $\chi^2=3.2$ ,  $p<0.05$ ), αφού μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης κατά 70%.

Από τον πίνακα και τους λόγους σχετικού κινδύνου παρουσιάζονται και άλλοι γονότυποι να κατέχουν ρόλο στην ανάπτυξη συγκεκριμένου ιστολογικού τύπου καρκίνου πνεύμονα, κανένας όμως από αυτούς δεν έδωσε σημαντικά στατιστική διαφορά ( $p>0.1$ ).

Στη συνέχεια έγινε κατανομή των γονότυπων στους διάφορους ιστολογικούς τύπους σε συνδυασμό και των τριών γονιδίων. Ακολουθεί διάγραμμα με τις συχνότητες εμφάνισης του κάθε γονότυπου σε κάθε ιστολογικό τύπο, καθώς και ο πίνακας με τους σχετικούς λόγους κινδύνου. Με την ανάλυση όμως αυτή, λόγω των αυξημένων παραμέτρων, μειώνεται ο αριθμός των περιπτώσεων που αντιστοιχούν σε κάθε κατηγορία, έτσι ώστε σε αρκετούς σπάνιους γονότυπους να μην αντιστοιχεί καμία περίπτωση.

**Διάγραμμα 9.2.** Κατανομή συνδυασμένων γονότυπων (3 γονιδίων) ανά ιστολογικό τύπο.



**Πίνακας 9.12.** Κατανομή συνδυασμένων γονότυπων ανά 3 γονίδια σε κάθε ιστολογικό τύπο.

Συνδυασμένοι γονότυποι ανά 3	Ομάδα ελέγχου (%) n=178	Μικροκυτταρικός n=33 OR (95%CI)		Πλακώδες n=35 OR (95%CI)		Αδενοκαρκίνωμα n=43 OR (95%CI)	
		OR (95%CI)	OR (95%CI)	OR (95%CI)	OR (95%CI)		
<b>CYP1A1-GSTM1-GSTT1</b>							
wt (+)(+)	52(29)	12(36)	1	10(29)	1	9 (21)	1
wt (+) (-)	5(3)	2 (6)	1.7(0.3-10)	3 (9)	3.1(0.6-15.2)	0	-
wt (-) (+)	62(35)	7 (21)	0.5(0.2-1.3)	15(43)	1.3 (0.5-3.0)	17(40)	1.6 (0.7-3.8)
wt (-)(-)	11(6)	2 (6)	0.8(0.2-4.0)	2 (6)	0.9 (0.2-4.9)	3 (7)	1.6 (0.4-6.8)
wt/m1 (+)(+)	21(12)	4 (12)	0.8(0.2-2.8)	1 (3)	<b>0.2 (0.1-2.1)</b>	3 (7)	0.8 (0.2-3.4)
wt/m1 (+)(-)	2(1)	3 (9)	<b>6.5(1.0-43.3)</b>	1 (3)	2.6 (0.2-31.5)	1 (2)	2.9 (0.2-35.3)
wt/m1 (-)(+)	20(11)	2 (6)	0.4(0.1-2.1)	2 (6)	0.5 (0.1-2.6)	6 (14)	1.7 (0.5-5.6)
wt/m1 (-)(-)	2(1)	0	-	0	-	1 (2)	2.9 (0.2-35.3)
m1 (+)(+)	2(1)	1 (3)	2.2(0.2-25.9)	1 (3)	2.6 (0.2-31.5)	0	-
m1 (+)(-)	0	0	-	0	-	0	-
m1 (-)(+)	1(<1)	0	-	0	-	2 (5)	<b>11.6 (0.9-141)</b>
m1 (-)(-)	0	0	-	0	-	0	-



Από την ανάλυση αυτών των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκαν ορισμένοι γονότυποι περισσότερο συχνοί και στις τρεις κατηγορίες τύπων καρκίνου του πνεύμονα και χωρίς να παρουσιάζουν ευαισθησία στην εμφάνιση της νόσου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τέτοιοι γονότυποι ήταν ο CYP1A1wt, GSTM1(+), GSTT1(+), ο CYP1A1wt, GSTM1(-), GSTT1(+) και ο CYP1A1wt/m1, GSTM1(-), GSTT1(+) με ποσοστά 36%, 29% και 21% ο πρώτος, 21%, 43% και 40% ο δεύτερος και 6%, 6% και 14% ο τελευταίος, για τους ιστολογικούς τύπους του μικροκυτταρικού, πλακώδους και αδeno-καρκινώματος αντίστοιχα.

Οι γονότυποι που παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο περιορίζονται στους δύο, αλλά αυτό που παρατηρείται είναι ότι συσχετίζονται με τα αποτελέσματα της κατανομής συνδυασμού ανά δύο γονίδια. Δηλαδή ενώ ο γονότυπος CYP1A1wt/m1, GSTT1(-) είχε αυξημένο κίνδυνο 4.5 φορές για τον μικροκυτταρικό καρκίνο, ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται στις 6.5 φορές με την παρουσία και του GSTM1 ( $\chi^2=4.6$ ,  $p>0.01$ ).

Αντίστοιχα ενώ ο γονότυπος CYP1A1m1, GSTM1(-) είχε ευαισθησία 19 φορές για το τύπο του αδenoκαρκινώματος, όταν συνδυάζεται με τον GSTT1(+), η ευαισθησία μειώνεται στις 11 φορές. Αυτό δείχνει ότι η παρουσία του GSTT1 προσπαθεί να διορθώσει την αλληλεπίδραση των άλλων δύο γονιδίων που τελικά οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση αδenoκαρκινώματος ( $\chi^2=5.4$ ,  $p>0.01$ ).

Τον ρόλο αυτό ενδέχεται να παίζει το GSTM1 και στην περίπτωση που συνδυάζεται με το γονότυπο CYP1A1wt/m1, GSTT1(+). Από την ανάλυση συνδυασμού ανά δύο γονίδια ο συγκεκριμένος γονότυπος είχε προστατευτικό ρόλο στην εμφάνιση πλακώδους τύπου καρκίνου. Με την παρουσία του GSTM1 η μείωση του κινδύνου αυξάνεται και φτάνει το 80%, ( $\chi^2=2.4$ ,  $p\leq 0.05$ ).

Τα αποτελέσματα αυτά, εκτός από την ευαισθησία στην εμφάνιση συγκεκριμένου τύπου καρκίνου του πνεύμονα, είναι χρήσιμα και στην πορεία της νόσου, όσο αφορά τα θεραπευτικά σχήματα που προτείνονται να χρησιμοποιηθούν σε κάθε περίπτωση.

Στη συνέχεια έγινε συσχέτιση των ιστολογικών τύπων και της καπνιστικής συνήθειας. Παρακάτω παρουσιάζονται οι περιπτώσεις που αντιστοιχούν σε κάθε τύπο. Η ανάλυση έγινε και με διαχωρισμό στις διάφορες κατηγορίες ηλικιών

**Πίνακας 9.13.** Κατανομή με βάση την ηλικία και την καπνιστική συνήθεια στους διάφορους ιστολογικούς τύπους.

Ηλικία (Έτη)	≤49 n=9		50-59 n=31		60-69 n=37		70-79 n=34		≥80 n=9	
	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι
<b>P/Y (SD)</b>	43(14)		62(19)		52(24)		55(16)		40(12)	
Μικροκυτταρικός (n=33)	3		9	1	7		11			2
Πλακώδες (n=35)	1		9		13	1	9	1	1	
Αδενοκαρκίνωμα (n=43)	5		8	4	9	4	8	2		3
Άλλοι τύποι (9)					2	1	2	1		3

Οι περισσότερες περιπτώσεις μη καπνιστών παρουσιάζονται στον τύπο του αδενοκαρκινώματος (57%). Είναι γνωστό ότι η ανάπτυξη βρογχογενούς καρκίνου σχετίζεται με το κάπνισμα και ιδίως με το πλακώδες και το μικροκυτταρικό. Όσο αφορά τα αδενοκαρκινώματα φαίνεται να οφείλονται σε διαφορετικού μηχανισμούς που οδηγούν σε καρκινογένεση και αναπτύσσονται ανεξάρτητα αν είναι κάποιος καπνιστή ή όχι. Το ότι εμφανίζεται επίσης ως πιο συχνός τύπος στις περισσότερες περιπτώσεις γυναικείου καρκίνου του πνεύμονα υποδηλώνει άλλες αιτίες ανάπτυξης του ιστολογικού αυτού τύπου, εκτός από το κάπνισμα.

## 9.5. Συσχέτιση ιστολογικών τύπων και ατομικών χαρακτηριστικών

### Οικογενειακό Ιστορικό

Το οικογενειακό ιστορικό αφορούσε κυρίως περίπτωση εμφάνισης καρκίνου πνεύμονα, αλλά επίσης και οποιουδήποτε άλλου τύπου καρκίνου σε συγγενείς πρώτου βαθμού, δηλαδή γονείς, αδέρφια, παιδιά.

Από τους 122 ασθενείς, 16 είχαν γνωστό οικογενειακό ιστορικό καρκίνου (17%), ενώ 78 (83%) όχι. Οι υπόλοιποι είτε δεν απάντησαν, είτε δεν γνώριζαν για το οικογενειακό ιστορικό τους.

Η συχνότητα των γονότυπων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 9.14.** Κατανομή γονότυπων ανάλογα με το οικογενειακό ιστορικό

Οικογενειακό Ιστορικό	CYP1A1			GSTM1		GSTT1	
	wt	wt/m1	m1	(+)	(-)	(+)	(-)
	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %
Όχι	54(69)	21(27)	3(4)	34(44)	44(56)	63(81)	15(19)
Ναι	12(75)	4(25)	0(0)	8(50)	8(50)	16(87.5)	2(12.5)

Οποιαδήποτε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν έδειξε σημαντική διαφορά,  $p > 1$ .

## Ατομικό Αναμνηστικό

Ζητήθηκε από τους ασθενείς να δοθούν πληροφορίες που αφορούσαν το ιστορικό της υγείας τους, με έμφαση σε άλλες παθήσεις του πνεύμονα, άλλα επίσης καρδιολογικές παθήσεις, διαβήτη κ.α.

Από τους 120, πληροφορίες έδωσαν οι 105. Έγινε κατηγοριοποίηση των ασθενειών ως εξής: α)ΧΑΠ (χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια), β)παλιά φλεγμονή (TBC, πνευμονία, βρογχιεκτασίες), γ)άλλες όχι άμεσες με τον πνεύμονα.

Οι συχνότητες των γονιδίων στις διάφορες κατηγορίες ασθενειών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 9.15.** Κατανομή γονότυπων με βάση το ατομικό αναμνηστικό

Ατομικό Αναμνηστικό	CYP1A1		GSTM1		GSTT1	
	wt	wt/m1 & m1	(+)	(-)	(+)	(-)
	n %	n %	n %	n %	n %	n%
Όχι	24(80)	6(20)	13(43)	17(57)	29(97)	1(3)
ΧΑΠ	15(71)	6(29)	7(33)	14(67)	17(81)	4(19)
Παλαιά Λοίμωξη	8(80)	2(20)	8(80)	2(20)	9(90)	1(10)
Άλλα	28(64)	16(36)	24(54)	20(46)	32(73)	12(27)

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά όσο αφορά τους γονότυπους των CYP1A1 και GSTT1 και των ασθενειών από τις διάφορες κατηγορίες σε σχέση με αυτούς που είχαν καθαρό ατομικό αναμνηστικό.

Η παρουσία του GSTM1 ήταν αρκετά υψηλή στους ασθενείς με παλιά φλεγμονή, μειώνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα κατά 80%. Παρατηρήθηκε δηλαδή ότι άτομα που στο παρελθόν έχουν νοσήσει από φυματίωση ή πνευμονία και είναι φορείς του γονότυπου GSTM1(+), έχουν πολύ μικρότερη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο πνεύμονα από εκείνους που χαρακτηρίζονται από απαιοφία του γονιδίου ( $\chi^2=4.1$ ,  $p=0.05$ ). Κατά τη συσχέτιση των ασθενών με ΧΑΠ με εκείνους με παλιά φλεγμονή παρατηρήθηκε ότι οι

πρώτοι, όταν είναι φορείς του GSTM1(-) γονότυπου, έχουν κατά 8 φορές αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του πνεύμονα (95%CI: 1.3-48, P=0.01). Παθοφυσιολογικά είναι αξιοπερίεργο αποτέλεσμα, αφού η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια δημιουργεί φλεγμονή και η ίδια, εκτός αν οδηγούν σε διαφορετικό τύπο καρκίνο οι δύο κατηγορίες.

### Στάδιο, Μεταστάσεις

89 δείγματα είχαν πληροφορίες που αφορούσαν το στάδιο. Από αυτά 3 (3.4%) ήταν σταδίου I, 3 (3.4%) σταδίου II, 13 (14.6%) σταδίου III και 70 (78.6%) σταδίου IV. Δεν βρέθηκε καμία σημαντική στατιστικά διαφορά στην κατανομή των γονότυπων στα τέσσερα στάδια. Στη συνέχεια εξετάστηκαν τα πληροφοριακά δείγματα ως προς τους παράγοντες T, N και M. Αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα τα ποσοστά για τον παράγοντα T.

**Πίνακας 9.16.** Συχνότητες γονότυπων σε σχέση με τον παράγοντα T

T	CYP1A1			GSTM1		GSTT1	
	wt	wt/m1	m1	(+)	(-)	(+)	(-)
	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %
T0/T3	13(87)	1(1.5)	1(1.5)	11(73)	4(27)	11(73)	4(27)
T4	12(50)	11(46)	1(4)	11(46)	13(54)	22(92)	2(8)

Σε ποσοστό 50% παρουσιάζεται ο ετερόζυγος και ομόζυγος μεταλλαγμένος γονότυπος του CYP1A1 στις περιπτώσεις που ήταν T4. Οποιαδήποτε συσχέτιση μειώνεται όταν συνεξεταστούν και τα τρία γονίδια μαζί. Οι γονότυποι CYP1A1wt/m1 και m1 συσχετίστηκαν με τον παράγοντα T (T4 / T0-T3) (OR = 6.5; 95% CI = 1.2–35, p=0.04), καθώς και ο GSTM1(-) (OR = 3.2; 95% CI = 0.8–13, p=0.08). Με τον N παράγοντα (N3 / N0-N2) συσχετίστηκαν οι GSTT1(-) (OR = 14; 95% CI = 1.9–103, p=0.01) και GSTM1(-) GSTT1(-) (OR = 2; 95% CI = 0.9–4.5, p=0.01). Στατιστικά σημαντική διαφορά με τον παράγοντα των μεταστάσεων, αλλά και με το στάδιο δεν βρέθηκε

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ II

### ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η σπουδαιότητα της σωστής λειτουργίας και της ρύθμισης του συνδυασμένου συστήματος ενζύμων αποτοξίνωσης φάσης I και II, CYPs και GSTs, για τη βιωσιμότητα κυττάρων, έρχεται σε αντίθεση με τη δυνατότητά τους να ενεργοποιούν χημικές ενώσεις με κυτταροτοξικές ιδιότητες σε γενετοξικά μέσα. Έχει γίνει αρκετά κατανοητό ότι ένας πολυμορφισμός σε ένα από αυτά τα δομικά γονίδια ή ακόμα και στις περιοχές μη-κωδικοποίησής τους, οι οποίες εμπλέκονται στο μεταγραφικό έλεγχό τους ή στο χρόνο ημίσειας ζωής των mRNAs τους, θα μπορούσε να έχει τα δραματικά αποτελέσματα στο ακόλουθο μεταβολικό μονοπάτι (Guengerich 1988). Επομένως, δεδομένου ότι η μεταβολική ενεργοποίηση και η αποτοξίνωση των χημικών ενώσεων μπορούν να οδηγήσουν σε κατεστραμμένα DNA ενδιάμεσα, η πιθανή επίπτωση αυτών των πολυμορφισμών στην ευαισθησία καρκίνου θα μπορούσε να υποτεθεί. Παρόλο αυτά, λόγω του εύρους των υποστρωμάτων τους, δεν είναι σπάνιο η επίδραση ενός τέτοιου πολυμορφισμού σε ένα από αυτά τα γονίδια να καλύπτεται, από την παρουσία ενός πολύ σχετικού ενζύμου της ίδιας οικογένειας (Hasler 1999). Κατά συνέπεια το να εστιαστεί κάποιος στο συνδυασμό τέτοιων πολυμορφισμών στα διαφορετικά γονίδια που περιλαμβάνονται στο βιοχημικό μονοπάτι της αποτοξίνωσης κυττάρων είναι μεγάλης σημασίας (Hengstler, Arand και λοιποί. 1998, Estabrook 1999), αν ληφθεί επιπλέον υπόψη και η γενική ομολογία ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι κύριοι συνεισφέροντες στην ανάπτυξη του καρκίνου πνευμόνων (Taningher, Malacarne et al. 1999).

Αυτή η εργασία είναι η πρώτη μελέτη που παρέχει στοιχεία για τις συχνότητες αλληλομόρφων αυτών των γονιδιακών τύπων στον ελληνικό πληθυσμό. Παρατηρήθηκε ότι η συχνότητα m1 του αλληλόμορφου του γονιδίου CYP1A1 ήταν 16%, του GSTM1(-) ήταν 52% και GSTT1(-) 17% αντίστοιχα στους ασθενείς που εμφάνισαν καρκίνο του πνεύμονα. Οι προηγούμενες μελέτες ανάμεσα σε Καυκάσιους πληθυσμούς έχουν υπολογίσει τις ίδιες συχνότητες για τους ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα σε 14%, 48-54%, και 13-26% αντίστοιχα

(Saarikoski, Voho et al. 1998; Malats, Camus-Radon et al. 2000; Benhamou, Lee et al. 2002; Stucker, Hirvonen et al. 2002; Taioli, Gaspari et al. 2003). Οι παραλλαγές στις συχνότητες αλληλομόρφων που παρατηρήθηκαν σε αυτήν την μελέτη και των προηγούμενων, μπορούν να αποδοθούν σε εθνική διαφοροποίηση μέσα στην Καυκάσια φυλή. Ενώ περιστατικά καρκίνου του πνεύμονα στην Ιαπωνία, όπου το αλληλίο του πρώτου πολυμορφισμού είναι περισσότερο συχνό από τη Δυτική Ευρώπη, φαίνεται να έχουν κληρονομήσει αυτή τη MspI μεταλλαγή πιο συχνά από μάρτυρες χωρίς καρκίνο (Kawajiri, Nakachi et al. 1990; Kawajiri, Nakachi et al. 1993), η συσχέτιση είναι εν πολλοίς αρνητική σε μη Ασιατικούς πληθυσμούς (Hirvonen, Husgafvel-Pursiainen et al. 1992).

Σε αυτήν την μελέτη παρατηρήθηκε η επικράτηση του ομόζυγου μεταλλαγμένου γονότυπου του CYP1A1 MspI μεταξύ των ασθενών ανεξάρτητα από την ηλικία. Στους φορείς του συγκεκριμένου γονότυπου αποδίδεται αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης της νόσου κατά 2.4 φορές, αν και ο αριθμός των περιπτώσεων που αντιστοιχούν σε αυτόν το γονότυπο είναι σχετικά μικρός, μειώνοντας έτσι στατιστικά τη σημαντικότητα του αποτελέσματος ( $p > 0.05$ ). Στις περισσότερες μελέτες δεν υπάρχει καμία ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου και του καρκίνου του πνεύμονα, αν και ο Taioli και λοιποί ανέφεραν σχέση μεταξύ του ομόζυγου m1 γονότυπου και ανάμεσα σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα σε μικρή ηλικία, κάτω των 45 ετών. Δεν παρατηρήθηκαν οποιεσδήποτε στατιστικές σημαντικές διαφορές στις συχνότητες πολυμορφισμών και στους λόγους σχετικού κινδύνου των γονιδίων GSTM1 και GSTT1 μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ασθενών με καρκίνο πνεύμονα, όταν ο κάθε πολυμορφισμός τους αναλύθηκε χωριστά.

Συμπληρωματικά, εξετάστηκε η στατιστική σημαντικότητα της παραλλαγής και της διανομής των συχνοτήτων συνδυασμένων αλληλόμορφων αυτών των πολυμορφισμών. Από τη μη παραμετρική στατιστική ανάλυση, παρατηρήθηκε ότι άτομα φορείς του γονότυπου CYP1A1m1, GSTM1(-) ήταν σε αξιοσημείωτα υψηλό κίνδυνο για καρκίνο πνεύμονα, με λόγο σχετικού κινδύνου 4.28 φορές σε σύγκριση με τον συνδυασμένο γονότυπο CYP1A1wt, GSTM1(+) ( $p > 0.05$ ) και ο κίνδυνος αυτός παραμένει ακόμα και αν ο γονότυπος αυτός χαρακτηρίζεται και από την παρουσία του GSTT1, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι

συνδυασμένοι γονότυποι CYP1A1 wt/m1, GSTM1(+), GSTT1(-); CYP1A1 wt, GSTM1(+), GSTT1(-) και CYP1A1 m1, GSTM1(-), GSTT1(+). Παρατηρήθηκαν συχνότερα σε περιπτώσεις καρκίνου πνεύμονα από ότι στην ομάδα ελέγχου. Αν και οι λόγοι σχετικού κινδύνου ήταν 3.9, 2.2 και 3.1 αντίστοιχα θα μπορούσαν να προτείνουν αυξημένη ευαισθησία ως προς την εμφάνιση της νόσου για τους φορείς αυτών των γονότυπων, η σπάνια εμφάνισή τους και στις δύο ομάδες μειώνει τη σημαντικότητα του αποτελέσματος.

Παρόλο την ομοιογένεια στην κατανομή των δύο φύλων ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στις συχνότητες των πολυμορφισμών, ώστε να αποδίδεται μεγαλύτερη ευαισθησία σε κάποια ομάδα. Η συνεισφορά του CYP1A1 και του GSTM1 στον γυναικείο καρκίνο πνεύμονα υποστηρίζεται από τις φυλετικές διαφορές στα επίπεδα των συμπλόκων του DNA και στην έκφραση του CYP1A1 στους πνεύμονες ανάμεσα στους καρκινοπαθείς (Mollerup, Ryberg et al. 1999).

Άτομα μεγαλύτερης ηλικίας (>60ετών) που ήταν φορείς δύο μεταλλαγμένων γονότυπων από οποιαδήποτε από τα τρία γονίδια παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανάπτυξη της νόσου ανάμεσα στους ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα. Η ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι συνάρτηση της χρόνιας έκθεσης σε τοξικούς παράγοντες. Έτσι άτομα μεγάλης ηλικίας έχουν εκτεθεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα είτε στον καπνό του τσιγάρου, είτε σε επιβαρημένο με γνωστές ή ύποπτες καρκινογόνες ουσίες περιβάλλον. Η ύπαρξη μεταλλαγμένου γονότυπου σε δύο από τα τρία υπό εξέταση γονίδια, τους αποδίδει μεγαλύτερο κίνδυνο για καρκίνο πνεύμονα, από ότι σε μικρότερες ηλικίες.

Οποιαδήποτε προσπάθεια για συσχέτιση ηλικίας και φύλλου δεν έδωσε αποτέλεσμα, συμπεραίνοντας ότι αυτές οι δύο μεταβλητές δεν μπορούν να συσχετιστούν στην συγκεκριμένη περίπτωση.

Ο μόνος γονότυπος που φαίνεται να σχετίζεται με την υψηλού κινδύνου έκθεση σε καρκινογόνα στον επαγγελματικό χώρο ήταν του γονιδίου GSTT1. Η απαιοφία αυτού του γονιδίου θέτει τα άτομα που τον έχουν σε μεγαλύτερη ευαισθησία στην εμφάνιση καρκίνου πνεύμονα. Τα πιθανά υποστρώματα του GSTT1 ανάμεσα στις τοξικές ενώσεις δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί επαρκώς. Λιπίδια υπεροξειδίων είναι τα πιο κοινά υποστρώματα του γονιδίου αυτού, καθώς



και επίσης ο κύριος ρόλος του είναι ο μεταβολισμός αλοαλκανίων και αλοαλκενίων. Σε συνδυασμό όμως με τα υπόλοιπα γονίδια, μειώνεται ο αυξημένος κίνδυνος που αποδίδεται στους φορείς του GSTT1(-) γονότυπου.

Επιπρόσθετες πληροφορίες παρέχονται σ' αυτήν την εργασία όσο αφορά τη σχέση ανάμεσα σε καρκίνο του πνεύμονα και στο μεταλλαγμένο γονότυπο του CYP1A1 που εμφανίζεται να σχετίζεται ενδεχομένως με τους μη καπνιστές. Αυτή η ερμηνεία είναι δυνατή, επειδή κάποιοι μεταλλαγμένοι γονότυποι των μεταβολικών ενζύμων (όπως του CYP1A1) φαίνεται να ασκούν την επίδρασή τους σε χαμηλότερες δόσεις έκθεσης σε καρκινογόνα (Taioli, Zocchetti et al. 1998; Vineis, Kogevinas et al. 2000). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί όταν τα άτομα κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την έκθεσή τους σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα (d'Errico, Malats et al. 1999). Οι μη καπνιστές αυτής της μελέτης είναι πιθανό να έχουν εκτεθεί σε χαμηλές δόσεις περιβαλλοντικών καρκινογόνων από άλλες πηγές, όπως παθητικό κάπνισμα ή διατροφικοί πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες.

Η αυξανόμενη τάση που δείχνει η απουσία του GSTM1 στους μη καπνιστές ασθενείς θα μπορούσε να συσχετιστεί με την εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα, καθώς η παρουσία του καταλύει τα γενοτοξικά προϊόντα του CYP1A1. Δηλαδή ο μεταλλαγμένος γονότυπος του CYP1A1 και η απουσία του GSTM1 οδηγεί σε ατελή μεταβολισμό καρκινογόνων ουσιών και συσσώρευση τους στον οργανισμό. Όμως όπως φαίνεται ο συγκεκριμένος αυτός συνδυασμός γονότυπων δε μπορεί όμως να συσχετιστεί με το κάπνισμα, άλλα έχει να κάνει με το μεταβολισμό διαφορετικών καρκινογόνων ουσιών από αυτές που συναντιούνται στον καπνό του τσιγάρου, όπως αναφέρθηκε προηγούμενα.

Κατά το διαχωρισμό των δύο πληθυσμών σε βαριά και ελαφριά καπνιστές, δεν παρουσιάστηκε καμία συσχέτιση με το κάπνισμα και το GSTM1, αν και είναι υπεύθυνο για το μεταβολισμό πολλών καρκινογόνων ουσιών που βρίσκονται στο καπνό του τσιγάρου. Όμως το ανεβασμένο ποσοστό του ετερόζυγου γονότυπου του CYP1A1 στους βαριά καπνιστές δικαιολογεί το ρόλο του ως μεταβολικό ένζυμο των αρωματικών υδρογονανθράκων με κύριο εκπρόσωπο το βενζοπυρένιο, κύριο συστατικό του καπνού του τσιγάρου.

Η παρουσία των αδενοκαρκινωμάτων ήταν η περισσότερο συχνή ανάμεσα στους διάφορους ιστολογικούς τύπους. Μετά από την κατανομή των ασθενών με καρκίνου πνεύμονα στους διαφορετικούς ιστολογικούς τύπους, στις περιπτώσεις με αδενοκαρκίνωμα, παρουσιάστηκε οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου του CYP1A1 γονιδίου σε σχέση με τους υπόλοιπους τύπους. Επιπλέον στον ίδιο ιστολογικό τύπο η απουσία του γονιδίου GSTM1 ήταν πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τους άλλους ιστολογικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένου του τύπου καρκίνου πλακωδών κυττάρων. Αυτό είναι σε αντίθεση με άλλες μελέτες που αφορούν την καυκάσια φυλή και αναφέρουν ότι η απουσία του GSTM1 είναι περισσότερο συχνή στις περιπτώσεις μικροκυτταρικού ή πλακώδους καρκινώματος. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύεται από τον συνδυασμό των γονότυπων, όπου η ταυτόχρονη απαλοιφή του GSTM1 και ο ομόζυγος μεταλλαγμένος τύπος του CYP1A1 χαρακτηρίζει τις περιπτώσεις των αδενοκαρκινωμάτων. Η ταυτόχρονη απαλοιφή των GSTM1 και GSTT1 χαρακτηρίζει τις περιπτώσεις που εμφάνισαν μικροκυτταρικού τύπου καρκίνο, ενώ ο γονότυπος που είναι αυξημένου κινδύνου στον καρκίνο πνεύμονα πλακωδών κυττάρων ήταν GSTM1(+) GSTT1(-). Η συνεισφορά του γονότυπου σε κάθε ιστολογικό τύπου καρκίνου του πνεύμονα μπορεί να έχει σημαντικές συνέπειες στην κλινική πράξη, πιθανώς ως δείκτης κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος.

Η συχνότητα των μη καπνιστών ήταν μεγαλύτερη στις περιπτώσεις των αδενοκαρκινωμάτων. Σύμφωνα με τον Malats (Malats, Camus-Radon et al. 2000), ο τύπος των αδενοκαρκινωμάτων είναι λιγότερο συνδεδεμένος με την κατανάλωση καπνών. Είναι γνωστό ότι η ανάπτυξη βρογχογενούς καρκίνου σχετίζεται με το κάπνισμα και ιδίως με το πλακώδες και το μικροκυτταρικό. Όσο αφορά τα αδενοκαρκινώματα φαίνεται να οφείλονται σε διαφορετικού μηχανισμούς που οδηγούν σε καρκινογένεση και αναπτύσσονται ανεξάρτητα αν είναι κάποιος καπνιστής ή όχι. Σύμφωνα με τον Houlston (Houlston 1999) αν και το ένζυμο GSTM1 καταλύει την αποτοξίνωση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων in vitro, η έκφραση του GSTM1 στον ιστό του πνεύμονα είναι πολύ χαμηλή (Ketterer, Harris et al. 1992; Anttila, Hirvonen et al. 1993; Harris, Coggan et al. 1998; Houlston 1999). Εντούτοις πρέπει να επισημανθεί ότι αν και

μικρός ο αριθμός των δειγμάτων δηλώνει κάποια αυξημένη ευαισθησία, οδηγεί όμως στην ασταθή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση του οικογενειακού ιστορικού των ασθενών με τις συχνότητες πολυμορφισμών των γονιδίων αποτοξίνωσης, αν και υπάρχει αναφορά που συνδέει αυτούς τους παράγοντες στους ασθενείς που εμφανίζουν καρκίνο πνεύμονα σε μικρή ηλικία (Gauderman and Morrison 2000).

Σημαντικό φαίνεται να είναι ο ρόλος του GSTM1 και σε σχέση με το ατομικό αναμνηστικό των ασθενών. Οι ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια έχουν πολύ μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο πνεύμονα σε σχέση με εκείνους που είχαν περάσει παλιά φλεγμονή, και χαρακτηρίζονται από απαιοιφή του GSTM1. Επίσης παρατηρήθηκε ότι άτομα που στο παρελθόν έχουν νοσήσει από φυματίωση ή πνευμονία και είναι φορείς του γονότυπου GSTM1(+), έχουν πολύ μικρότερη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο πνεύμονα από εκείνους που χαρακτηρίζονται από απαιοιφή του γονιδίου. Παθοφυσιολογικά είναι αξιοπερίεργο αποτέλεσμα, αφού η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια δημιουργεί φλεγμονή και η ίδια, εκτός αν οδηγούν σε διαφορετικού τύπου καρκίνο οι δύο κατηγορίες.

Επιπλέον από τις περιπτώσεις καρκίνων πνεύμονα που ήταν T4 κατάστασης οι μισές χαρακτηρίζονται από την παρουσία του ετερόζυγου και του ομόζυγου μεταλλαγμένου γονότυπου του CYP1A1, ενισχύοντας τη συνεργιστική του δράση στην καρκινογένεση.

Η μελέτη αυτή παρέχει στοιχεία για έναν καλά καθορισμένο εθνικό πληθυσμό, μέλους ένα συνόλου με κοινά γενετικά χαρακτηριστικά από την βορειοδυτική μέχρι τη νοτιοανατολική γενετική κλίση της Ευρώπης (Barbujani and Sokal 1990). Κατά συνέπεια, το σύνολο στοιχείων που απορρέουν εφαρμόζουν στις γενετικές διαφορές τέτοιων πληθυσμών μεταξύ των εθνών μέσα στην Καυκάσια φυλή, τα οποία πιθανόν να οφείλουν την τελική έκβαση στους, σε περαιτέρω γενετικούς πολυμορφισμούς, εκτός από τα γονίδια που μελετήθηκαν.

Συνοπτικά, η υπόθεση ότι η αυξημένη βιοενεργοποίηση των προκαρκινογόνων από τις παραλλαγές CYP1A1 αποδίδει μεγαλύτερη ευαισθησία για καρκίνο του πνεύμονα είναι βιολογικά πειστική. Είναι πιθανό, ότι οι πολυμορφισμοί αυτού του δομικού γονιδίου, που αναγνωρίζονται σήμερα,

αντιπροσωπεύουν μόνο ένα κλάσμα από αυτούς που αντιστοιχούν στην δραστηριότητα και επαγωγιμότητα του CYP1A1. Τα επιδημιολογικά δεδομένα είναι, επομένως σε σύγχυση σε σχέση με το αν η αυξημένη δραστηριότητα βιοενεργοποίησης του CYP1A1 μόνο, είναι ένας παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο του πνεύμονα.

Επιπλέον, τα στοιχεία αυτά υποστηρίζουν μια συσχέτιση των πολυμορφισμών των γονιδίων CYP1A1, GSTM1 και GSTT1 και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου πνευμόνων συνολικά σε αυτόν τον πληθυσμό, καθώς επίσης παρέχονται στοιχεία χρήσιμα ως πιθανούς δείκτες για την εφαρμογή κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος σε άτομα που ήδη έχουν αναπτύξει καρκίνο πνεύμονα, με σκοπό την βελτίωση της έκβασης της ασθένειας και την αύξηση του χρόνου επιβίωσης.

## ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η γενετικά βασισμένη ευαισθησία στη δράση μιας καρκινογόνου ουσίας είναι ένας γρήγορα αυξανόμενος τομέας της έρευνας και αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό παράδειγμα χρήσης των βιολογικών δεικτών στην επιδημιολογία. Τουλάχιστον έξι τύποι αλληλεπιδράσεων γονιδίου-περιβάλλοντος έχουν προταθεί. Στον πρώτο τύπο, ούτε η περιβαλλοντική έκθεση ούτε ο γενετικός παράγοντας κινδύνου δεν έχουν οποιαδήποτε επίδραση μόνοι τους, αλλά η αλληλεπίδραση μεταξύ τους είναι αιτία ασθενειών. Ο τύπος δύο είναι μια κατάσταση, στην οποία ο γενετικός παράγοντας κινδύνου δεν έχει καμία επίδραση σε ασθένεια ελλείψει της έκθεσης, αλλά επιδεινώνει την επίδρασή της. Αυτός είναι ο σημαντικότερος τύπος της αλληλεπίδραση γονιδίου-περιβάλλοντος σε σχέση με την ευαισθησία των γονιδίων μεταβολισμού και την ανθρώπινη καρκινογένεση. Ο τρίτος τύπος είναι αντίστροφος του δεύτερου (η περιβαλλοντική έκθεση είναι μη αποτελεσματική αυτή καθ' εαυτή, αλλά ενισχύει την επίδραση του γενετικού παράγοντα κινδύνου. Ο τέταρτος τύπος εμφανίζεται όταν και η περιβαλλοντική έκθεση και ο γενετικός παράγοντας κινδύνου αυξάνουν τον κίνδυνο για την ασθένεια, και ο συνδυασμός τους οδηγεί σε αλληλεπίδραση ή συνέργια. Οι τελευταίοι τύποι αναφέρονται σε περιπτώσεις στις οποίες ο γενετικός παράγοντας κινδύνου είναι προστατευτικός.

Το πρότυπο της αλληλεπίδρασης γονιδίου περιβάλλοντος, που προκύπτει ως το πιο σημαντικό στη χημική καρκινογένεση, αναφέρεται στην ευαισθησία των γονιδίων μεταβολισμού. Ο γενικός πληθυσμός μπορεί να διαιρεθεί σε υποομάδες ανάλογα με την ευαισθησία τους στη δράση των καρκινογόνων ουσιών, βασισμένη στη δυνατότητά τους να μεταβολίσουν τέτοιες ενώσεις σε ηλεκτρονιόφιλους ενεργούς μεταβολίτες (που δημιουργούν συμπλέγματα με το DNA), ή υδατοδιαλυτούς μεταβολίτες που απεκκρίνονται. Τα ένζυμα που περιλαμβάνονται στους γενετικά βασισμένους μεταβολικούς πολυμορφισμούς μπορούν να διαιρεθούν στις δύο γενικές ομάδες των ενζύμων φάσης I και φάσης II. Τα πρώτα που περιλαμβάνονται στην ενεργοποίηση των καρκινογόνων ουσιών, ενώ τα δεύτερα περιλαμβάνονται στην καρκινογόνο αδρανοποίηση.

Επιδημιολογικές μελέτες, προτείνουν ότι οι γενετικά βασισμένοι μεταβολικοί πολυμορφισμοί συνδέονται με έναν υψηλότερο κίνδυνο καρκίνου μετά από

χαμηλή έκθεση στις καρκινογόνες ουσίες, που είναι ένα συχνό φαινόμενο κυρίως στις δυτικές χώρες. Μια πιθανή εξήγηση είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ των καρκινογόνων. Για περιπτώσεις καρκίνου, των οποίων η αιτιολογία είναι ακόμα κατά ένα μεγάλο μέρος άγνωστη (π.χ. μαστού), η έκθεση σε ποικιλία καρκινογόνων έστω και σε χαμηλό βαθμό, π.χ. μέσω διατροφής, μπορεί να είναι σημαντικότερη από την έκθεση σε μια μόνο ουσία. Οι γενετικές-περιβαλλοντικές αλληλεπιδράσεις θα μπορούσαν, τουλάχιστον εν μέρει, να διευκρινίσουν γιατί μια μόνο ουσία δεν φαίνονται να εξηγεί την καρκινογένεση που προκαλείται από τα μείγματα ουσιών.

Ενδογενείς συμπαράγοντες παίζουν επίσης ρόλο στον μονοπάτι του μεταβολισμού αποτοξίνωσης. Η ανάλυση μεταλλαγών του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα αποκάλυψε ορισμένα πρότυπα με συγκεκριμένους ιστολογικούς τύπους. Μια μετάθεση G:C→T:A στο γονίδιο p53 είναι πιο κοινή σε καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων από 'ότι στο αδenoκαρκίνωμα, και αυτό επίσης έχει συνδεθεί με την παρουσία του βενζοπυρενίου στον καπνό του τσιγάρου. Συμπεραίνεται λοιπόν, οι πολυμορφισμοί του CYP1A1, που έχουν ως αποτέλεσμα διαφορετική επαγωγή στην έκφραση ή στην καταλυτική ενεργότητα του ενζύμου, είναι σημαντικοί τροποποιητές της γενετικής ευαισθησίας στην ανάπτυξη καρκίνου. Οι πολυμορφισμοί του CYP1A1 συνδέονται με τα αυξανόμενα επίπεδα συμπλόκων DNA και την επικράτηση των μεταλλαγών του p53. Τα αποτελέσματα δείχνουν συσχέτιση μεταξύ του γενετικού πολυμορφισμού του CYP1A1 και του υψηλού κινδύνου για καρκίνο πνεύμονα.

Ίσως το μεγαλύτερο μέρος της μηχανιστικής πληροφόρησης επικεντρώνεται στην επαγωγή των CYPs 1A από τον υποδοχέα αρωματικών υδρογονανθράκων (AhR). Η μεταγραφή του CYP1A1 εξαρτάται από τα προϊόντα των γονιδίων AhR και ARNT (AhR nuclear transporter). Δεδομένου ότι AhR είναι συνδεδεμένο στους χημικούς υποκαταστάτες του και μεταφέρεται στον πυρήνα από τον ARNT, δεσμεύεται στον υποκινητή του CYP1A1, όπου επάγει τη μεταγραφή γονιδίων. Εκτός από το CYP1A1, οι AhR και ARNT ρυθμίζουν το CYP1A2 και τέσσερα άλλα μη- P450 γονίδια, τα οποία έχουν επίσης ένα μοτίβο DNA απόκρισης του AhR (AHRE) στους υποκινητές τους. Ο AhR επιδρά και στον

έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση, μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο και κύριο ρυθμιστή ρετινοβλάστωμα (pRb) και από μια έμμεση επίδραση οξειδωτικής πίεσης στην p53. Ο AhR αλληλεπιδρά με τα στοιχεία απόκρισης του οιστρογόνου προτείνοντας την ανεπιθύμητη παρεμβολή μεταξύ του AhR και του υποδοχέα οιστρογόνων (ER), ένα ζήτημα σπουδαιότητας στη βιολογία καρκίνου του μαστού. Δεν παρατηρήθηκε όμως συσχέτιση μεταξύ των mRNA επιπέδων των γονιδίων με τον AhR.

Η ποικιλία μεταξύ ατόμων στα επίπεδα του mRNA που αναφέρθηκε εδώ θα μπορούσε να αντανakλά μια παρόμοια ποικιλία στα επίπεδα των ενζύμων και, έτσι, στην ποικιλία στην ευπάθεια στην ανάπτυξη καρκίνου μαστού.

Επειδή η γενετική ευαισθησία στον καρκίνο περιλαμβάνει τη συμμετοχή περισσότερων από ένα γονίδια, μελετάται εάν κάποιο από αυτά τα γονίδια δεν είναι σε ισορροπία με τα υπόλοιπα. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ανάλυση των συνδυασμένων γονότυπων, είναι στοιχεία που προτείνουν τη συμμετοχή αυτών των γονότυπων ως δείκτες προδιάθεσης στην περίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα, καθώς επίσης και στοιχεία χρήσιμα στη διαχείριση της νόσου σε όσους εμφάνισαν καρκίνο μαστού ή πνεύμονα, με στόχο τη βελτίωση της έκβασης της πορείας τους και την αύξηση του χρόνου επιβίωσης.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Υπολογίστηκαν οι συχνότητες των γενετικών πολυμορφισμών των γονιδίων αποτοξίνωσης CYP1A1, GSTM1 και GSTT1 στον ελληνικό πληθυσμό. Φαίνεται ότι βρίσκονται σε συμφωνία με εκείνες που αντιστοιχούν στην καυκάσια φυλή, καθώς και οποιοσδήποτε αποκλίσεις οφείλονται σε εθνική διαφοροποίηση.
- Επειδή η γενετική ευαισθησία σε ασθένειες περιλαμβάνει περισσότερα από ένα γονίδια, είναι χρήσιμο να εξετάζεται εάν οποιοσδήποτε από αυτούς τους πολυμορφισμούς γονιδίων είναι σε ανισορροπία σύνδεσης με κάθε έναν από τους υπόλοιπους. Δεν παρατηρήθηκε κανένα τέτοιο στοιχείο για την ανισορροπία συνδέσμων για οποιουδήποτε από τους πιθανούς διπλούς ή τριπλούς συνδυασμούς των αλληλόμορφων των γονιδίων στην ομάδα ελέγχου. Αυτή η παρατήρηση χρησιμεύσει ως βάση ελέγχου για την ανάλυση πιθανής σύνδεσης στις περιπτώσεις καρκίνου.
- Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ασθενών με καρκίνο μαστού, κατά την ανάλυση των πολυμορφισμών ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό, και σύμφωνα με την ηλικία εμφάνισης της ασθένειας ή την εμμηνορροϊκή κατάσταση ή την λήψη αντισυλληπτικών χαπιών. Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων CYP1A1, GSTM1 και GSTT1 δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες προδιάθεσης στην εμφάνιση του καρκίνου του μαστού.
- Τα πρότυπα απορύθμισης στην έκφραση των CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 και GSTT1 μεταξύ του φυσιολογικών και καρκινικών ιστών μαστού είναι αρκετά σύνθετα. Αυτά τα πρότυπα φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της μεταγραφικής ρύθμισης παρά αποτέλεσμα ενίσχυση ή απώλειας γονιδίων, δεδομένου ότι καμία διαφοροποίηση δεν ανιχνεύθηκε στον αριθμό αντιγράφων DNA. Το 87% των όγκων βρέθηκαν για να εκθέτουν τη μεταγραφική απορύθμιση τουλάχιστον σε ένα από τα παραπάνω γονίδια σε σύγκριση με τους αντίστοιχους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς τους.



- Αν και η μεταγραφή του CYP1A1 εξαρτάται από την έκφραση του AhR, στη μελέτη αυτή δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ τους στις περιπτώσεις καρκίνου του μαστού.
- Η μεταγραφική απορύθμιση του CYP1A1 συσχετίστηκε με την έκφραση του GSTM1 και του GSTP1. Όταν τα mRNA επίπεδα του GSTM1 ή του GSTP1 ήταν ανυψωμένα στους καρκινικούς ιστούς του μαστού έναντι των αντίστοιχων φυσιολογικών, εκείνα του CYP1A1 ήταν σταθερά ή χαμηλότερα.
- Λαμβάνοντας υπόψη τη λειτουργική σημασία των γονιδίων στο μεταβολισμό μιας σειράς χημειοθεραπευτικών ενώσεων και την ποικιλία των μεταγραφικών προτύπων που παρουσιάστηκαν στους διαφορετικούς καρκινικούς ιστούς του μαστού, κατά τρόπο ανεξάρτητο ως προς την ηλικία, το στάδιο ή το βαθμό, τα mRNA επίπεδα των CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 και GSTP1 θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα ως μοριακοί δείκτες.
- Άτομα με τον ομόζυγο μεταλλαγμένο γονότυπο του γονιδίου CYP1A1 παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στην ανάπτυξη καρκίνου πνεύμονα. Η ευαισθησία αυτή αυξάνεται όταν υπάρχει απαιοιφή του γονιδίου GSTM1, ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι του GSTT1.
- Άτομα μεγαλύτερης ηλικίας (>60ετών) που ήταν φορείς δύο μεταλλαγμένων γονότυπων από οποιαδήποτε από τα τρία γονίδια παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανάπτυξη της νόσου ανάμεσα στους ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα. Η ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι συνάρτηση της χρόνιας έκθεσης σε τοξικούς παράγοντες. Έτσι άτομα μεγάλης ηλικίας έχουν εκτεθεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα είτε στον καπνό του τσιγάρου, είτε σε επιβαρημένο με γνωστές ή ύποπτες καρκινογόνες ουσίες περιβάλλον. Η ύπαρξη μεταλλαγμένου γονότυπου σε δύο από τα τρία υπό εξέταση γονίδια, τους αποδίδει μεγαλύτερο κίνδυνο για καρκίνο πνεύμονα, από ότι σε μικρότερες ηλικίες.

- Η απαλοιφή του GSTT1 φαίνεται να σχετίζεται με την υψηλού κινδύνου έκθεση σε καρκινογόνα στον επαγγελματικό χώρο, αποδίδοντας στα άτομα που έχουν το συγκεκριμένο γονότυπο μεγαλύτερη ευαισθησία στην εμφάνιση καρκίνου πνεύμονα. Ο ίδιος γονότυπος παρουσιάζεται με αυξημένη συχνότητα και στους βαριά καπνιστές, αν και τα πιθανά υποστρώματα του GSTT1 ανάμεσα στις τοξικές ενώσεις του καπνού του τσιγάρου δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί επαρκώς.
- Η αυξημένη συχνότητα του ομόζυγου μεταλλαγμένου γονότυπου του CYP1A1 στους μη καπνιστές ενοχοποιεί τη συμμετοχή του γονιδίου στο μεταβολισμό άλλων τοξικών ενώσεων, όπου ακόμα και χαμηλή έκθεση σε αυτές μπορεί να συσχετιστεί με την αυξημένη ευαισθησία για την εμφάνιση καρκίνου πνεύμονα.
- Το ανεβασμένο ποσοστό του ετερόζυγου γονότυπου του CYP1A1 στους βαριά καπνιστές δικαιολογεί το ρόλο του ως μεταβολικό ένζυμο των αρωματικών υδρογονανθράκων με κύριο εκπρόσωπο το βενζοπυρένιο, κύριο συστατικό του καπνού του τσιγάρου.
- Διαφορετικοί συνδυασμοί γονότυπων παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε κάθε ιστολογικό τύπο καρκίνου του πνεύμονα. Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να έχει σημαντικές συνέπειες στην κλινική πράξη, πιθανώς ως δείκτης κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος.
- Οι περισσότερες περιπτώσεις μη καπνιστών παρουσιάζονται στα αδενοκαρκινώματα. Η ανάπτυξη βρογχογενούς καρκίνου σχετίζεται με το κάπνισμα και ιδίως με το πλακώδες και το μικροκυτταρικό τύπο. Όσο αφορά τα αδενοκαρκινώματα φαίνεται να οφείλονται σε διαφορετικού μηχανισμούς που οδηγούν σε καρκινογένεση και αναπτύσσονται ανεξάρτητα αν είναι κάποιος καπνιστή ή όχι.
- Δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ οικογενειακού ιστορικού και αυξημένης ευαισθησίας στην εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα.

- Ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανάπτυξη της νόσου σε σχέση με εκείνους που είχαν περάσει παλιά φλεγμονή, και χαρακτηρίζονται από απαιοφιλή του γονιδίου GSTM1.

- Ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα και φορείς του ετερόζυγου και ομόζυγου μεταλλαγμένου γονότυπου του γονιδίου CYP1A1 παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία στη δημιουργία μεταστάσεων.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Angus, W. G., M. C. Larsen, et al. (1999). "Expression of CYP1A1 and CYP1B1 depends on cell-specific factors in human breast cancer cell lines: role of estrogen receptor status." Carcinogenesis **20**(6): 947-55.
- Anttila, S., A. Hirvonen, et al. (1993). "Immunohistochemical localization of glutathione S-transferases in human lung." Cancer Res **53**(23): 5643-8.
- Bailey, L. R., N. Roodi, et al. (1998). "Breast cancer and CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasians and African Americans." Cancer Res **58**(1): 65-70.
- Barbujani, G. and R. R. Sokal (1990). "Zones of sharp genetic change in Europe are also linguistic boundaries." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(5): 1816-9.
- Bartsch, H., U. Nair, et al. (2000). "Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **9**(1): 3-28.
- Benhamou, S., W. J. Lee, et al. (2002). "Meta- and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk." Carcinogenesis **23**(8): 1343-50.
- Boehm, T. L. and D. Drahovsky (1983). "Alteration of enzymatic methylation of DNA cytosines by chemical carcinogens: a mechanism involved in the initiation of carcinogenesis." J Natl Cancer Inst **71**(3): 429-33.
- Brambilla, C., F. Fievet, et al. (2003). "Early detection of lung cancer: role of biomarkers." Eur Respir J Suppl **39**: 36s-44s.
- Cairns, J. (1981). "The origin of human cancers." Nature **289**(5796): 353-7.
- Chen, I., A. McDougal, et al. (1998). "Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenic and antitumorigenic activity of diindolylmethane." Carcinogenesis **19**(9): 1631-9.
- Chen, L., D. J. Waxman, et al. (1996). "Sensitization of human breast cancer cells to cyclophosphamide and ifosfamide by transfer of a liver cytochrome P450 gene." Cancer Res **56**(6): 1331-40.
- Cosma, G., F. Crofts, et al. (1993). "Racial differences in restriction fragment length polymorphisms and messenger RNA inducibility of the human CYP1A1 gene." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **2**(1): 53-7.
- Daly, A. K., K. S. Fairbrother, et al. (1998). "Recent advances in understanding the molecular basis of polymorphisms in genes encoding cytochrome P450 enzymes." Toxicol Lett **102-103**: 143-7.
- d'Errico, A., N. Malats, et al. (1999). "Review of studies of selected metabolic polymorphisms and cancer." IARC Sci Publ(148): 323-93.
- Devilee, P., E. Schuurin, et al. (1994). "Recent developments in the molecular genetic understanding of breast cancer." Crit Rev Oncog **5**(2-3): 247-70.
- Estabrook, R. (1999). "An introduction to the cytochrome P450s." Mol Aspects Med **20**(1-2): 5-12, 13-137.
- Farber, E. (1981). "Chemical carcinogenesis." N Engl J Med **305**(23): 1379-89.
- Fontana, R. S., D. R. Sanderson, et al. (1986). "Lung cancer screening: the Mayo program." J Occup Med **28**(8): 746-50.

- Fujii-Kuriyama, Y., M. Ema, et al. (1995). "Polymorphic forms of the Ah receptor and induction of the CYP1A1 gene." Pharmacogenetics **5 Spec No**: S149-53.
- Gauderman, W. J. and J. L. Morrison (2000). "Evidence for age-specific genetic relative risks in lung cancer." Am J Epidemiol **151**(1): 41-9.
- Ge, N. L. and C. J. Elferink (1998). "A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle." J Biol Chem **273**(35): 22708-13.
- Gonzalez, F. J. (1997). "The role of carcinogen-metabolizing enzyme polymorphisms in cancer susceptibility." Reprod Toxicol **11**(2-3): 397-412.
- Goth-Goldstein, R., M. R. Stampfer, et al. (2000). "Interindividual variation in CYP1A1 expression in breast tissue and the role of genetic polymorphism." Carcinogenesis **21**(11): 2119-22.
- Guengerich, F. P. (1998). "The Environmental Genome Project: functional analysis of polymorphisms." Environ Health Perspect **106**(7): 365-8.
- Guengerich, F. P. (2000). "Metabolism of chemical carcinogens." Carcinogenesis **21**(3): 345-51.
- Guengerich, F. P. and T. Shimada (1998). "Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes." Mutat Res **400**(1-2): 201-13.
- Harris, C. C. (1989). "Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair." Carcinogenesis **10**(9): 1563-6.
- Harris, M. J., M. Coggan, et al. (1998). "Polymorphism of the Pi class glutathione S-transferase in normal populations and cancer patients." Pharmacogenetics **8**(1): 27-31.
- Hayes, J. D. and D. J. Pulford (1995). "The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance." Crit Rev Biochem Mol Biol **30**(6): 445-600.
- Helzlsouer, K. J., O. Selmin, et al. (1998). "Association between glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer." J Natl Cancer Inst **90**(7): 512-8.
- Hengstler, J. G., M. Arand, et al. (1998). "Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility." Recent Results Cancer Res **154**: 47-85.
- Hirvonen, A., K. Husgafvel-Pursiainen, et al. (1992). "Point-mutational MspI and Ile-Val polymorphisms closely linked in the CYP1A1 gene: lack of association with susceptibility to lung cancer in a Finnish study population." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **1**(6): 485-9.
- Hong, J. Y. and C. S. Yang (1997). "Genetic polymorphism of cytochrome P450 as a biomarker of susceptibility to environmental toxicity." Environ Health Perspect **105 Suppl 4**: 759-62.
- Houlston, R. S. (1999). "Glutathione S-transferase M1 status and lung cancer risk: a meta-analysis." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **8**(8): 675-82.
- Huang, Z., M. J. Fasco, et al. (1996). "Expression of cytochromes P450 in human breast tissue and tumors." Drug Metab Dispos **24**(8): 899-905.

- Johansson, I., Q. Y. Yue, et al. (1991). "Genetic analysis of the interethnic difference between Chinese and Caucasians in the polymorphic metabolism of debrisoquine and codeine." Eur J Clin Pharmacol **40**(6): 553-6.
- Kalow, W. (1982). "Ethnic differences in drug metabolism." Clin Pharmacokinet **7**(5): 373-400.
- Kawajiri, K., K. Nakachi, et al. (1993). "The CYP1A1 gene and cancer susceptibility." Crit Rev Oncol Hematol **14**(1): 77-87.
- Kawajiri, K., K. Nakachi, et al. (1990). "Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene." FEBS Lett **263**(1): 131-3.
- Ketterer, B., J. M. Harris, et al. (1992). "The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer." Environ Health Perspect **98**: 87-94.
- Klinge, C. M., J. L. Bowers, et al. (1999). "The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements." Mol Cell Endocrinol **157**(1-2): 105-19.
- Kodish, E. D. (1999). "Testing children for cancer genes: the rule of earliest onset." J Pediatr **135**(3): 390-5.
- Kreisman, H., N. Wolkove, et al. (1992). "Small cell lung cancer presenting as a solitary pulmonary nodule." Chest **101**(1): 225-31.
- Landi, M. T., P. A. Bertazzi, et al. (1994). "Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in humans." Pharmacogenetics **4**(5): 242-6.
- Landi, S., N. M. Hanley, et al. (1999). "Induction of sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes by bromoform: investigation of the role of GSTT1-1 polymorphism." Mutat Res **429**(2): 261-7.
- Li, F. P. and J. F. Fraumeni, Jr. (1994). "Collaborative interdisciplinary studies of p53 and other predisposing genes in Li-Fraumeni syndrome." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **3**(8): 715-7.
- Lichtenstein, P., N. V. Holm, et al. (2000). "Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland." N Engl J Med **343**(2): 78-85.
- Linder, M. W., R. A. Prough, et al. (1997). "Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency." Clin Chem **43**(2): 254-66.
- Malats, N., A. M. Camus-Radon, et al. (2000). "Lung cancer risk in nonsmokers and GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphism." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **9**(8): 827-33.
- Masimirembwa, C., I. Persson, et al. (1996). "A novel mutant variant of the CYP2D6 gene (CYP2D6\*17) common in a black African population: association with diminished debrisoquine hydroxylase activity." Br J Clin Pharmacol **42**(6): 713-9.
- Melamed, M. R., B. J. Flehinger, et al. (1984). "Screening for early lung cancer. Results of the Memorial Sloan-Kettering study in New York." Chest **86**(1): 44-53.
- Meyer, U. A. (1994). "The molecular basis of genetic polymorphisms of drug metabolism." J Pharm Pharmacol **46 Suppl 1**: 409-15.
- Miller, D. M., S. Blume, et al. (1990). "Oncogenes, malignant transformation, and modern medicine." Am J Med Sci **300**(1): 59-69.

- Miller, E. C. and J. A. Miller (1981). "Mechanisms of chemical carcinogenesis." Cancer **47**(5 Suppl): 1055-64.
- Miyakis, S., G. Sourvinos, et al. (1998). "Differential expression and mutation of the ras family genes in human breast cancer." Biochem Biophys Res Commun **251**(2): 609-12.
- Mollerup, S., D. Ryberg, et al. (1999). "Sex differences in lung CYP1A1 expression and DNA adduct levels among lung cancer patients." Cancer Res **59**(14): 3317-20.
- Mooi, W. J., K. P. Dingemans, et al. (1990). "Ultrastructural heterogeneity of lung carcinomas: representativity of samples for electron microscopy in tumor classification." Hum Pathol **21**(12): 1227-34.
- Mountain, C. F. (1997). "Revisions in the International System for Staging Lung Cancer." Chest **111**(6): 1710-7.
- Nakajima, M., T. Yokoi, et al. (1994). "Phenotyping of CYP1A2 in Japanese population by analysis of caffeine urinary metabolites: absence of mutation prescribing the phenotype in the CYP1A2 gene." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **3**(5): 413-21.
- Nebert, D. W. (1989). "The Ah locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation, and birth defects." Crit Rev Toxicol **20**(3): 153-74.
- Nebert, D. W., A. L. Roe, et al. (2000). "Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis." Biochem Pharmacol **59**(1): 65-85.
- Nelson, D. R., L. Koymans, et al. (1996). "P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature." Pharmacogenetics **6**(1): 1-42.
- Nguyen, T. A., D. Hoivik, et al. (1999). "Interactions of nuclear receptor coactivator/corepressor proteins with the aryl hydrocarbon receptor complex." Arch Biochem Biophys **367**(2): 250-7.
- Osborne, M. P., H. L. Bradlow, et al. (1993). "Upregulation of estradiol C16 alpha-hydroxylation in human breast tissue: a potential biomarker of breast cancer risk." J Natl Cancer Inst **85**(23): 1917-20.
- Ouaissi, A., M. Ouaissi, et al. (2002). "Glutathione S-transferases and related proteins from pathogenic human parasites behave as immunomodulatory factors." Immunol Lett **81**(3): 159-64.
- Perera, F. P. (1997). "Environment and cancer: who are susceptible?" Science **278**(5340): 1068-73.
- Perera, F. P. and R. M. Santella (1993). "Carcinogenesis." In: Schulte P, Perera FP, editors. Molecular epidemiology: principals and practices. New York, NY: Academic Press: 277-300.
- Poland, A., E. Glover, et al. (1976). "Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase." J Biol Chem **251**(16): 4936-46.
- Pott, P. (1775). "Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer of the srotum, the different kinds of ruptures and the modification of the toes and feet." Hower, Clark and Pollins, Quoted by Hueper, W.C.: 63.

- Ramel, C., B. Lambert, et al. (1986). "Genetic Toxicology of Environmental Chemicals." Alan R. Liss. New York.
- Reiners, J. J., Jr., C. L. Jones, et al. (1997). "Downregulation of aryl hydrocarbon receptor function and cytochrome P450 1A1 induction by expression of Ha-ras oncogenes." Mol Carcinog **19**(2): 91-100.
- Rogers, A. E., L. M. Sullivan, et al. (1999). "Dietary fat, body weight, and cancer: contributions of studies in rodents to understanding these cancer risk factors in humans." Toxicol Sci **52**(2 Suppl): 66-71.
- Saarikoski, S. T., A. Voho, et al. (1998). "Combined effect of polymorphic GST genes on individual susceptibility to lung cancer." Int J Cancer **77**(4): 516-21.
- Seidegard, J., W. R. Vorachek, et al. (1988). "Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(19): 7293-7.
- Sekido, Y., K. M. Fong, et al. (1998). "Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer." Biochim Biophys Acta **1378**(1): F21-59.
- Sheehan, D., G. Meade, et al. (2001). "Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily." Biochem J **360**(Pt 1): 1-16.
- Sheweita, S. A. and A. K. Tilmisany (2003). "Cancer and phase II drug-metabolizing enzymes." Curr Drug Metab **4**(1): 45-58.
- Smith, G., L. A. Stanley, et al. (1995). "Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility." Cancer Surv **25**: 27-65.
- Spandidos, D. A. (1986). "A unified theory for the development of cancer." Biosci Rep **6**(8): 691-708.
- Spandidos, D. A. and L. Siminovitch (1977). "Transfer of anchorage independence by isolated metaphase chromosomes in hamster cells." Cell **12**(3): 675-82.
- Stucker, I., A. Hirvonen, et al. (2002). "Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases as modulators of lung cancer susceptibility." Carcinogenesis **23**(9): 1475-81.
- Sun, Y., C. Keshava, et al. (1999). "DNA sequence variants of p53: cancer and aging." Am J Hum Genet **65**(6): 1779-82.
- Taioli, E., L. Gaspari, et al. (2003). "Polymorphisms in CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and lung cancer below the age of 45 years." Int J Epidemiol **32**(1): 60-63.
- Taioli, E., C. Zocchetti, et al. (1998). "Models of interaction between metabolic genes and environmental exposure in cancer susceptibility." Environ Health Perspect **106**(2): 67-70.
- Taningher, M., D. Malacarne, et al. (1999). "Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility." Mutat Res **436**(3): 227-61.
- Thier, R., S. E. Pemble, et al. (1996). "Human glutathione S-transferase T1-1 enhances mutagenicity of 1,2-dibromoethane, dibromomethane and 1,2,3,4-diepoxybutane in Salmonella typhimurium." Carcinogenesis **17**(1): 163-6.
- Tomashefski, J. F., Jr., A. F. Connors, Jr., et al. (1990). "Peripheral vs central squamous cell carcinoma of the lung. A comparison of clinical features, histopathology, and survival." Arch Pathol Lab Med **114**(5): 468-74.
- Travis, W. D. (2002). "Pathology of lung cancer." Clin Chest Med **23**(1): 65-81, viii.
- Travis, W. D., L. B. Travis, et al. (1995). "Lung cancer." Cancer **75**(1 Suppl): 191-202.



- Vineis, P., M. Kogevinas, et al. (2000). "Levelling-off of the risk of lung and bladder cancer in heavy smokers: an analysis based on multicentric case-control studies and a metabolic interpretation." Mutat Res **463**(1): 103-10.
- Watanabe, M. (1998). "Polymorphic CYP genes and disease predisposition--what have the studies shown so far?" Toxicol Lett **102-103**: 167-71.
- Weber, B. L. and K. L. Nathanson (2000). "Low penetrance genes associated with increased risk for breast cancer." Eur J Cancer **36**(10): 1193-9.
- Westendorf, J., H. Marquardt, et al. (1983). "Tumorigenicity in vivo and induction of mutagenesis and DNA repair in vitro by aclacinomycin A and marcellomycin: structure-activity relationship and predictive value of short-term tests." Cancer Res **43**(11): 5248-51.
- Weston, A. and J. H. Godbold (1997). "Polymorphisms of H-ras-1 and p53 in breast cancer and lung cancer: a meta-analysis." Environ Health Perspect **105 Suppl 4**: 919-26.
- Weston, A. and M. Poirier (1998). "Carcinogen DNA-adducts formation and DNA repair." In: Wexler P, editor. Encyclopedia of Toxicology **1**(New York, NY: Academic Press): 237-246.
- Williams, G. and J. Weisburger (1986). "Chemical Carcinogens in Casarett and Doull's Toxicology." 3rd edition, Macmillan Publ. Co.
- Windmill, K. F., R. A. McKinnon, et al. (1997). "The role of xenobiotic metabolizing enzymes in arylamine toxicity and carcinogenesis: functional and localization studies." Mutat Res **376**(1-2): 153-60.
- Yager, J. D. and J. G. Liehr (1996). "Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis." Annu Rev Pharmacol Toxicol **36**: 203-32.
- Yamagawa, K. and K. Ickikawa (1918). "Experimental study of the pathogenesis of carcinoma." J Cancer Res **3**: 1-29.
- Willis RA. Pathology of Tumors. 4<sup>th</sup> edition. Butterworth, London, 1967.