



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ



Διδακτορική Διατριβή

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΣΤΗΝ *IN VIVO* ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ CYP1A2

υπό

ΒΑΣΙΛΙΚΗΣ ΤΣΙΩΚΟΥ

Ειδικευόμενης Γενικής Ιατρικής

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2015

- 0 -

© 2015 Βασιλική Τσιώκου

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

- 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπουσα)** Ευτυχία **Ασπροδίνη**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** Ιωάννης **Μεσσήνης**
Καθηγητής, Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** Ανάργυρος **Μουλάς**
Καθηγητής ΑΤΕΙ Λάρισας, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, ΑΤΕΙ Λάρισας
- 4^{ος} Εξεταστής** Κων/νος **Νταφόπουλος**
Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** Ανδρέας **Τσακάλωφ**
Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** Νικόλαος **Δρακούλης**
Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ
- 7^{ος} Εξεταστής** Μαρία **Σαμαρά**
Λέκτορας Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή
Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνετέλεσαν με κάθε τρόπο στην ολοκλήρωση της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής. Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω πρωτίστως στην επιβλέπουσα μου κ. Ευτυχία Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, για τη συνεχή καθοδήγηση, την υποστήριξη και το αμέριστο ενδιαφέρον της για την πορεία της έρευνας. Ιδιαίτερη μνεία αξίζουν οι συνεπιβλέποντες Δρ. Ιωάννης Μεσσήνης, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας και Δρ Ανάργυρος Μουλάς, Καθηγητής του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής, για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις, τις πολύτιμες συμβουλές και την κατάθεση της επιστημονικής τους κατάρτισης όσον αφορά την σημαντικότητα των αποτελεσμάτων της μελέτης.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Δρ Ηλία Μπέγα, Μέλος ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, ο οποίος με την ευρεία γνώση των αναλυτικών τεχνικών ήταν πάντοτε πρόθυμος να υποδείξει λύσεις σε όλα τα θεωρητικά και τεχνικά προβλήματα που ανέκυπταν κατά την διάρκεια της εργαστηριακής φάσης της έρευνας. Σε μια πράξη αναγνώρισης της πολύτιμης συμβολής του στα πειράματα που διενεργήθηκαν για την ανίχνευση του γονοτύπου εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου στον Δρ. Ευάγγελο Κουβαρά, Επιστημονικό Συνεργάτη του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω σε όλες τις εθελόντριες, οι οποίες συμμετείχαν στην μελέτη αυτή και επέδειξαν μεγάλη προθυμία στην πρόσκληση που τους απευθύνθηκε και αξιοσημείωτη συμμόρφωση στο πρωτόκολλο που τους δόθηκε.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου και το σύζυγο μου για την ενθάρρυνση, τη συμπαράσταση και την ηθική στήριξη που μου προσέφεραν καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Βασιλική Τσιώκου

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Προσωπικά στοιχεία

Όνομα	Βασιλική
Επώνυμο	Τσιώκου
Τόπος γεννήσεως	Τρίκαλα
Ημερομηνία γεννήσεως	1 Νοεμβρίου 1979
Οικογενειακή κατάσταση	Έγγαμη
Διεύθυνση κατοικίας	Δημητρίου Νταή 13, Τρίκαλα, Τ.Κ 42100
Τηλέφωνο επικοινωνίας	2431302161
Email	vasiliki.tsiokou@hotmail.com

Εκπαίδευση

2005-2007	Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Δίπλωμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές της Μοριακής Ιατρικής», Βαθμός αποφοίτησης: Άριστα (08,90)
1999-2005	Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Βαθμός αποφοίτησης: Λίαν καλώς (07,25)
1994-1997	Ενιαίο Πολυκλαδικό Λύκειο Τρικάλων, Βαθμός αποφοίτησης: Άριστα (19&8/9)

Επαγγελματική Εμπειρία

06/06/2014-σήμερα	Ειδικευόμενη Γενικής Ιατρικής στο Γ.Ν Τρικάλων
26/10/2012-05/06/2014	Υπηρεσία Υπαίθρου επί θητεία στο Περιφερειακό Ιατρείο Κλεινού του Κ.Υ Καλαμπάκας
6/09/2010-20/10/2012	Ειδικευόμενη Παιδιατρικής στα τμήματα Δερματολογίας, ΩΡΛ, Πλαστικής Χειρουργικής, Ορθοπαιδικής, Ουρολογίας στο Great Ormond Street Hospital, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο
19/04/2010-5/09/2010	Ειδικευόμενη Παιδιατρικής στο East Surrey Hospital, Redhill, Ηνωμένο Βασίλειο
21/01/2008-25/10/2009	Ειδικευόμενη Παιδιατρικής στο Γ.Ν Βέροιας
01/11/2006-20/01/2008	Υπηρεσία Υπαίθρου στο άγονο Περιφερειακό Ιατρείο Φωτεινού του Κ.Υ Καλαμπάκας
01/08/2006-31/10/2006	Ειδικευόμενη για τρίμηνη υποχρεωτική εκπαίδευση στα τμήματα Αναισθησιολογίας, Χειρουργικής, Παθολογίας και Καρδιολογίας στο Γ.Ν Τρικάλων

Προφορικές ανακοινώσεις

- 1) **Kouvaras E., Samara M., Begas E., Tsiokou V., Asproдини E.** Phenotyping and genotyping analysis of CYP1A2 in the Greek population. 7th Panhellenic congress of pharmacology. Book of Abstracts, Hippokratia 16 (Suppl 1):16-17, 2012.
- 2) **Tsiokou V., Begas E., Kouvaras E., Messinis I., Asproдини E.** Influence of menstrual cycle on cyp1a2 in vivo activity determined with caffeine phenotyping. 8th Southeast

European Congress on Xenobiotic Metabolism and Toxicity . Front. Pharmacol. doi:10.3389/conf.fphar.2010.60.00209 XEMET 2010.

- 3) **Begas E., Kouvaras E., Tsiokou V., Asproдини E.** In vivo evaluation of CYP1A2 and CYP2A6 activities in a Greek population during menopause. 5th Panhellenic congress of pharmacology. Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics-International Edition 22(2):113-114, 2008.

Διδακτική εμπειρία

- 10/2008-06/2009 Διδασκαλία στα μαθήματα Παιδιατρικής και Μαιευτικής-Γυναικολογίας στην ΕΠΑ.Σ Βοηθών Νοσηλευτών του Γ.Ν Βέροιας
- 10/2005-06/2007 Διδασκαλία στα μαθήματα Παιδιατρικής, Παθολογία, Χειρουργικής, Νευρολογίας και Δερματολογίας στο Ιδιωτικό Τ.Ε.Ε και στο Ι.Ε.Κ ΔΙΟΛΚΟΣ Τρικάλων.

Ερευνητική δραστηριότητα

- 02/2008-10/2009 Συμμετοχή ως ερευνήτρια σε πολυκεντρική τυφλή τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη διάρκειας 10 ετών για την αξιολόγηση της κλινικής αποτελεσματικότητας του εμβολίου της GlaxosmithKline Biologicals από ζώντες εξασθενημένους ιούς έναντι της ανεμευλογιάς (Varilrix) χορηγούμενο ως μια δόση και του συνδυασμένου εμβολίου της GlaxosmithKline Biologicals έναντι της ερυθράς-ιλαράς-παρωτίτιδας-ανεμευλογιάς (Priorix-Tetra), το οποίο χορηγείται σε δυο δόσεις σε υγιή παιδιά, κατά τη διάρκεια του δευτέρου έτους της ζωής τους.

Εθελοντική δραστηριότητα

- 08/2004 Διασώστρια κατά τη διάρκεια της τέλεσης των Ολυμπιακών Αγώνων ΑΘΗΝΑ 2004, Ο.Α.Κ.Α- Κοινός Περιβάλλον Χώρος.
- 07/2003 Απασχόληση στο πρόγραμμα της Ε.Φ.Φ.Ι.Ε για πλήρωση των αναγκών σε Αγροτικά Ιατρεία στο Γ.Ν.Ν Ερμούπολης Σύρου.
- 08/2001 Απασχόληση στο πρόγραμμα του Ε.Κ.Α.Β για πλήρωση των αναγκών σε Κέντρα Υγείας και Νοσοκομεία στο Γ.Π.Ν Πολυγύρου.

Ξένες Γλώσσες

- Αγγλικά Άριστη γνώση γραπτών και προφορικών First Certificate in English, Grade B (University of Cambridge), Proficiency (University of Michigan).
- Γερμανικά Ικανοποιητική γνώση γραπτών και προφορικών Zertifikat, Gesamtnote Befriedigend (Goethe-Institut).

Γνώση χρήσης Ηλεκτρονικού Υπολογιστή

Κάτοχος του πτυχίου επάρκειας γνώσης Ηλεκτρονικών Υπολογιστών ECDL.

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΣΤΗΝ *IN VIVO* ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ CYP1A2

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΤΣΙΩΚΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Ευτυχία Ασπροδίνη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπουσα**),
2. **Δρ. Ιωάννης Μεσσήνης**, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Ανάργυρος Μουλάς**, Καθηγητής ΑΤΕΙ Λάρισας, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, ΑΤΕΙ Λάρισας

Περίληψη

Η δραστηριότητα του CYP1A2 μειώνεται από την παρουσία ορμονών του φύλου όπως τη χρήση αντισυλληπτικών δισκίων, τη θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης και την εγκυμοσύνη. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση των διακυμάνσεων των ορμονών (κυρίως των οιστρογόνων) που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού εμμηνορρυσιακού κύκλου στην *in vivo* δραστηριότητα του CYP1A2 και των ενζύμων CYP2A6, ΧΟ και NAT-2. Επιπλέον, μελετήθηκε η κατανομή των δύο πιο συχνών απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών του γονιδίου του CYP1A2 (CYP1A2*1C και CYP1A2*1F), προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του γονοτύπου στην φαινοτυπική έκφραση του CYP1A2.

Μέθοδοι: Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 42 υγιείς, προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (25 μη καπνίστριες, ΜΚ και 17 καπνίστριες, Κ). Έγινε συλλογή δειγμάτων ούρων και αίματος κατά τη διάρκεια της πρώιμης ωοθυλακικής (ΠΩΦ), της όψιμης ωοθυλακικής (ΟΩΦ) και της ωχρινικής φάσεως (ΩΦ). Τα επίπεδα της 17-β οιστραδιόλης, της προγεστερόνης, της FSH και της LH προσδιορίστηκαν και στις τρεις φάσεις του κύκλου. Η δραστηριότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, ΧΟ και NAT-2 προσδιορίστηκε με τη χρήση των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα (AFMU+1U+1X)/17U, 17U/(17U+17X), 1U/(1X+1U), AFMU/(AFMU+1U+1X), αντίστοιχα, στις τρεις φάσεις του κύκλου χρησιμοποιώντας τη μέθοδο RP-HPLC. Ο έλεγχος γονοτύπου για τους πολυμορφισμούς -3860 G>A (αλλήλιο CYP1A2*1C) και -163 C>A (αλλήλιο CYP1A2*1F) έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο PCR-RFLP.

Αποτελέσματα: η δραστηριότητα του CYP1A2 ήταν μειωμένη στην όψιμη ωοθυλακική σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική και ωχρινική φάση τόσο στις 25 μη καπνίστριες (ΠΩΦ: $3,18 \pm 1,00$, ΟΩΦ: $2,76 \pm 0,77$, ΩΦ: $3,06 \pm 0,84$; $p < 0,05$, RM ANOVA on Ranks) όσο και στις 17 καπνίστριες (ΠΩΦ: $5,20 \pm 2,11$, ΟΩΦ: $4,41 \pm 1,26$, ΩΦ: $4,93 \pm 1,49$; $p > 0,05$, One Way RM ANOVA) χωρίς όμως να αναδεικνύεται στατιστικώς σημαντική διαφορά στις καπνίστριες. Η δραστηριότητα του CYP2A6 βρέθηκε να είναι αυξημένη στην όψιμη ωοθυλακική φάση ($0,70 \pm 0,13$) διαφέροντας στατιστικά με την πρώιμη ωοθυλακική ($0,60 \pm 0,12$; $p < 0,05$) αλλά όχι με την ωχρινική φάση ($0,63 \pm 0,13$; $p > 0,05$, RM ANOVA on Ranks). Στην δραστηριότητα της ΧΟ δεν ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών φάσεων του κύκλου (ΠΩΦ: $0,52 \pm 0,06$, ΟΩΦ: $0,52 \pm 0,05$, ΩΦ: $0,51 \pm 0,05$; $p > 0,05$, One Way RM ANOVA) καθώς

επίσης και στη δραστηριότητα της NAT-2 στις ταχείες ακετυλιώτριες (ΠΩΦ: $0,36 \pm 0,05$, ΟΩΦ: $0,38 \pm 0,06$, ΩΦ: $0,36 \pm 0,04$; $p > 0,05$, One Way RM ANOVA). Η δραστηριότητα της NAT-2 στις βραδείες ακετυλιώτριες βρέθηκε να είναι αυξημένη στην όψιμη ωοθυλακική φάση ($0,09 \pm 0,02$) διαφέροντας στατιστικά με την πρώιμη ωοθυλακική ($0,07 \pm 0,02$) και με την ωχρινική φάση ($0,07 \pm 0,02$; $p < 0,05$, One Way RM ANOVA). Στην μελέτη ανιχνεύθηκε μόνο ο πολυμορφισμός CYP1A2*1F. Οι καπνίστριες με γονότυπο A/A είχαν σημαντικά υψηλότερους μέσους μεταβολικούς λόγους καφεΐνης ($5,71 \pm 1,69$) από τις φορείς A/C ($4,32 \pm 1,63$; $p < 0,05$, Mann-Whitney test), ενώ αυτή η διαφορά δεν παρατηρήθηκε στις μη καπνίστριες (A/C: $3,35 \pm 1,22$, A/A: $3,09 \pm 0,52$; $p > 0,05$, Mann-Whitney test). Επίσης, ο γονότυπος αποδείχθηκε ότι δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα του CYP1A2 στις τρεις φάσεις του κύκλου ($p > 0,05$, Repeated Measures General Linear Model).

Συμπεράσματα: Η παρούσα μελέτη αναδεικνύει πως στην όψιμη ωοθυλακική φάση, όπου τα οιστρογόνα βρίσκονται στα υψηλότερα επίπεδα παρατηρήθηκε: 1) μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2, 2) αύξηση της δραστηριότητας του CYP2A6 και 3) αύξηση της δραστηριότητας της NAT-2 στις βραδείες ακετυλιώτριες. Η δραστηριότητα της XO και της NAT-2 στις ταχείες ακετυλιώτριες δε διαφοροποιήθηκε στις διάφορες φάσεις του κύκλου. Οι φυσιολογικές διακυμάνσεις των οιστρογόνων κατά τη διάρκεια των φάσεων των φυσιολογικών εμμηνορρυσιακών κύκλων μπορεί να σχετίζονται με παραλλαγή στη δραστηριότητα του CYP1A2, του CYP2A6 και της NAT-2 στις βραδείες ακετυλιώτριες.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	- 11 -
1.1 CYP1A2.....	- 11 -
1.2 CYP2A6.....	- 17 -
1.3 ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΗΣ ΞΑΝΘΙΝΗΣ	- 19 -
1.4 NAT-2	- 20 -
1.5 ΚΑΦΕΪΝΗ: ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	- 22 -
1.6 <i>IN VIVO</i> ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ CYP1A2, CYP2A6, ΧΟ ΚΑΙ NAT-2 ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΦΕΪΝΗΣ	- 26 -
1.6.1 Μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστικότητας του CYP1A2 με τη χρήση καφεΐνης.....	- 26 -
1.6.2 Μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστικότητας CYP2A6 με τη χρήση καφεΐνης	- 30 -
1.6.3 Μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστικότητας της οξειδάσης της ξανθίνης με τη χρήση καφεΐνης. -	31 -
1.6.4 Μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστικότητας της NAT-2 με τη χρήση καφεΐνης.....	- 32 -
1.7 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ (RP- HPLC).....	- 33 -
1.8 ΕΜΜΗΝΟΡΡΥΣΙΑΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	- 34 -
1.8.1 Ορμόνες του εμμηνορρυσιακού κύκλου	- 35 -
1.8.2 Ωοθηκικός κύκλος	- 39 -
1.8.3 Ενδομητρικός κύκλος	- 42 -
1.9 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ CYP1A2	- 44 -
1.10 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ.....	- 46 -
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	- 51 -
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	- 52 -
2.1 ΕΘΕΛΟΝΤΡΙΕΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	- 52 -
2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ	- 57 -
2.3 ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ CYP1A2	- 57 -
2.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	- 59 -
2.5 ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	- 59 -
2.6 ΠΡΟΕΤΟΙ ΜΑΣΙΑ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ	- 60 -
2.7 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ	- 60 -

2.8 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	- 61 -
2.8.1 Γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης.....	- 61 -
2.8.2 Ακρίβεια και επαναληψιμότητα.....	- 62 -
2.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	- 62 -
3.0 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	- 64 -
3.1 ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ	- 64 -
3.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΘΕΛΟΝΤΡΙΩΝ	- 64 -
3.3 ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΤΙΣ ΟΜΑΔΕΣ ΤΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΡΙΩΝ ΣΤΙΣ ΤΡΕΙΣ ΦΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	66
3.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΙ ΛΟΓΟΙ ΤΗΣ ΚΑΦΕΪΝΗΣ ΠΟΥ ΑΝΤΑΝΑΚΛΟΥΝ ΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ CYP1A2, CYP2A6, ΧΟ, NAT-2 ΣΤΙΣ ΟΜΑΔΕΣ ΤΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΡΙΩΝ ΣΤΙΣ ΤΡΕΙΣ ΦΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ.....	69
3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ CYP1A2*1F ΚΑΙ CYP1A2*1C ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ CYP1A2	79
4.0 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	84
5.0 ΣΥΝΟΨΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	98
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	99

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 CYP1A2

Το κυτόχρωμα P450 (CYP) είναι μια υπεροικογένεια αιμοπρωτεϊνών, το οποίο ονομάστηκε κατά αυτό τον τρόπο το 1961, επειδή παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 450 nm όταν συνδέεται με το CO (Γεωργιάτσος, 1993). Το P450 ανευρίσκεται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο και αποτελεί το τελευταίο στοιχείο μιας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, τα οποία προέρχονται από το NADPH. Τα ένζυμα αυτά μετέχουν στις οξειδωτικές αντιδράσεις της φάσης I του μεταβολισμού ενός μεγάλου φάσματος διαφορετικών υποστρωμάτων (Stryer, 1997). Τα υποστρώματα δεσμεύονται στο κυτόχρωμα P450 και μετατρέπονται με την εισαγωγή ή την αποκάλυψη μιας λειτουργικής ομάδας σε λιγότερο λιποδιαλυτές ενώσεις, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να συνδεθούν με ενδογενή υδατοδιαλυτά μόρια του οργανισμού μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από τα ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού. Το αποτέλεσμα είναι η απέκκριση των μεταβολιτών από τους νεφρούς.

Οι πρωτεΐνες του κυτοχρώματος P450 διαιρούνται σε οικογένειες και υποοικογένειες, με κριτήριο το ποσοστό της ομοιότητας της αμινοξικής τους αλληλουχίας. Τα ένζυμα που εμφανίζουν πάνω από 40% ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων ανήκουν στην ίδια οικογένεια (συμβολίζεται με αραβικό νούμερο), ενώ ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων πάνω από 55% κατατάσσει τα ένζυμα στην ίδια υποοικογένεια (συμβολίζεται με γράμμα) (Nerbert and Russel, 2002). Υπάρχουν περισσότερες από 270 διαφορετικές οικογένειες γονιδίων του CYP με 18 καταγεγραμμένες στα θηλαστικά. Οι άνθρωποι έχουν 57 γονίδια του CYP και 33 ψευδογονίδια, τα οποία κατατάσσονται σε 18 οικογένειες και 42 υποοικογένειες (Waxman, 1999; Nerbert and Russel, 2002) (πίνακας 1).

Ο ρόλος του συγκεκριμένου συστήματος είναι πολλαπλός. Τα ένζυμα δρουν σε πολλά ενδογενή υποστρώματα προκαλώντας οξειδωτικές, υπεροξειδωτικές και αναγωγικές αλλαγές σε μικρά μόρια διαφορετικών χημικών δομών. Τα υποστρώματα περιλαμβάνουν κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα, εικοσανοειδή, στερόλες, στεροειδή, χολικά οξέα, παράγωγα της βιταμίνης D₃, ρετινοειδή και ουροπορφυρινογόνα. Το σύστημα μεταβολίζει εξωγενή συστατικά όπως φάρμακα, περιβαλλοντολογικές και ξένες χημικές ουσίες. Η αποτοξίνωση του οργανισμού από τις ξένες ουσίες (ξеноβιοτικές) είναι δυνατόν να

οδηγήσει στο σχηματισμό τοξικών μεταβολιτών, οι οποίοι αυξάνουν τον κίνδυνο καρκίνου, συγγενών ανωμαλιών και τοξικών επιδράσεων (Stryer, 1997; Olson, 1997). Τέλος, η έκφραση πολλών ενζύμων του P450 επάγεται ή αναστέλλεται συχνά από την συσσώρευση ενός υποστρώματος. Η ικανότητα ενός υποστρώματος του P450 να επηρεάζει τη συγκέντρωση ενός άλλου αποτελεί τη βάση της αλληλεπιδράσεως των φαρμάκων (Tang and Stearns, 2001).

Πίνακας 1. Υποστρώματα και λειτουργίες των οικογενειών των ανθρώπινων γονιδίων του CYP.

Οικογένεια	Αριθμός υποοικογενειών	Αριθμός γονιδίων	Υποστρώματα και λειτουργίες
CYP1	3	3	Ξένες χημικές ουσίες, αραχιδονικό οξύ, εικοσανοειδή, υδροξυλάση 17-β-οιστραδιόλης
CYP2	13	16	Ξένες χημικές ουσίες, αραχιδονικό οξύ, εικοσανοειδή
CYP3	1	4	Ξένες χημικές ουσίες, αραχιδονικό οξύ, εικοσανοειδή
CYP4	5	12	Λιπαρά οξέα, αραχιδονικό οξύ, εικοσανοειδή
CYP5	1	1	Συνθάση της θρομβοξάνης A ₂
CYP7	2	2	Χοληστερόλη, σύνθεση χολικών οξέων
CYP8	2	2	Συνθάση προστακυκλίνης, σύνθεση χολικών οξέων
CYP11	2	3	Στεροειδογένεση
CYP17	1	1	17α-υδροξυλάση των στεροειδών, 17/20-λυάση
CYP19	1	1	Αρωματάση για το σχηματισμό οιστρογόνων
CYP20	1	1	Άγνωστα
CYP21	1	1	21-υδροξυλάση των στεροειδών
CYP24	1	1	24-υδροξυλάση της βιταμίνης D ₃
CYP26	3	3	Υδροξυλίωση του ρετινοϊκού οξέος
CYP27	3	3	Υδροξυλιώσεις της βιταμίνης D ₃ , βιοσύνθεση χολικών οξέων
CYP39	1	1	7α-υδροξυλάση της 24-υδροξυχοληστερόλης
CYP46	1	1	24-υδροξυλάση της χοληστερόλης
CYP51	1	1	14α-δεσμεθυλάση της λανοστερόλης

Τα κυτοχρώματα CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 αποτελούν υποοικογένειες του CYP1. Το γονίδιο του CYP1A2 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 15 και εμφανίζει ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων του με τα CYP1A1 και CYP1B1 72% και 40% αντίστοιχα. Το CYP1A2 εκφράζεται στο ήπαρ και αποτελεί περίπου το 15% του συνολικών πρωτεϊνών του CYP (Shimada et al., 1994), ενώ το CYP1A1 εντοπίζεται στους πνεύμονες, στο λάρυγγα, στα

νεφρά, στα λεμφοκύτταρα και στον πλακούντα και το CYP1B1 στα νεφρά, στον προστάτη στις ωοθήκες και στη μήτρα (Landi et al., 1999).

Η δραστηριότητα του CYP1A2 επηρεάζεται από γενετικούς, περιβαλλοντικούς και ενδογενείς παράγοντες και ρυθμίζεται από ένα μηχανισμό, ο οποίος ελέγχει τα βασικά επίπεδα έκφρασης και έναν δεύτερο, ο οποίος ρυθμίζει την επαγωγιμότητα (Butler et al., 1992; Sinha et al., 1994; Lang et al., 1994).

Το CYP1A2 μπορεί να μετατρέψει προκαρκινογόνες ουσίες σε καρκινογόνες όπως τις αρωματικές αμίνες και τις νιτροζαμίνες των αζωχρωμάτων και του καπνού των τσιγάρων, τις N-ετεροκυκλικές αμίνες, οι οποίες βρίσκονται στο κρέας που ψήνεται σε υψηλές θερμοκρασίες και στα κάρβουνα, τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Butler et al., 1989; Shimada et al., 1994; Sinha et al., 1994) και την αφλατοξίνη B1 (Gallagher et al., 1994). Είναι υπεύθυνο για τον μεταβολισμό πολλών φαρμάκων όπως της καφεΐνης (Butler et al., 1989; Berthou et al., 1991; Gu et al., 1992), της θεοφυλλίνης (Campbell et al., 1987b), της τακρίνης (Spaldin et al., 1995), της ιμιπραμίνης (Lemoine et al., 1993), τη αντυπυρίνης (Sharer and Wrighton, 1996), της κλοζαπίνης (Bertilsson et al., 1994), της φαινακετίνης (Sesardic et al., 1988) και της ακεταμινοφαΐνης (Landi et al., 1999) (πίνακας 2). Επίσης, συμμετέχει στο μεταβολισμό της μελατονίνης προς 6-υδροξυμελατονίνη (Facciola et al., 2001).

Η έκφραση του γονιδίου του CYP1A2 επάγεται κυρίως με τη βοήθεια του υποδοχέα των αρωματικών υδρογονανθράκων (AhR), ο οποίος ενεργοποιείται με τη σύνδεση κατάλληλου επαγωγικού παράγοντα στο κυτταρόπλασμα, οι οποίοι είναι οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAH), διοξίνες (π.χ TCDD- 2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζο-ρ-διοξίνη) και πολυχλωριωμένα διφαινύλια. Συνδέτες για τον AhR αποτελούν επίσης διατροφικοί παράγοντες, φυσικά και συνθετικά φλαβονοειδή και φάρμακα. Το σύμπλοκο υποδοχέα-συνδέτη μεταφέρεται στον πυρήνα όπου και ενώνεται με την πρωτεΐνη πυρηνικής μετατόπισης αρωματικών υδρογονανθράκων (ARNT), σχηματίζοντας ένα λειτουργικό μεταγραφικό σύμπλοκο το AHRC. Το AHRC συνδέεται στην 5' περιοχή του γονιδίου του CYP1A2, που αποτελεί έναν ενισχυτή αποκρινόμενο στις ξενοβιοτικές ενώσεις (XREs), με αποτέλεσμα την αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου του CYP1A2 και τελικά τη σύνθεση της πρωτεΐνης του CYP1A2 (Ramadoss et al., 2005; Hankinson, 1995). Η επαγωγή προκαλεί ταχύ μεταβολισμό των διαφόρων ουσιών, οι οποίες αποτελούν υποστρώματα του ενζύμου και στην περίπτωση των φαρμάκων μπορεί να οδηγήσει στη μη επίτευξη

επιθυμητού θεραπευτικού αποτελέσματος.

Επιπλέον, η επαγωγή του ενζύμου από τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες μπορεί είτε να τους ενεργοποιεί σε καρκινογόνες ουσίες, είτε να αποβάλλει ταχέως από τον οργανισμό επικίνδυνες χημικές ουσίες, χωρίς να είναι μέχρι σήμερα αποσαφηνισμένο τι ακριβώς υπερισχύει (Lin and Lu, 1998).

Οι επαγωγείς του CYP1A2 είναι τα φάρμακα ομεπραζόλη, φαινυτοΐνη και ριφαμπικίνη (Wietholz et al., 1989; Diaz et al., 1990) (πίνακας 2), το ψημένο στα κάρβουνα κρέας ή το μαγειρεμένο σε υψηλές θερμοκρασίες (Sinha et al., 1994; Sinha and Rothman, 1999), τα σταυρανθή λαχανικά όπως τα μπρόκολα, τα λαχανάκια Βρυξελλών καθώς και όσα περιέχουν την ουσία ινδολ-3-καρβινόλη (Vistisen et al., 1991; Vistisen et al., 1992), η έκθεση σε πολυχλωριωμένα διφαινύλια, το κάπνισμα (Sesardic et al., 1988; Kalow and Tang, 1991a; Catteau et al., 1995; Tantcheva-Poor et al., 1999; Vistisen et al., 1991; Begas et al., 2007; Nakajima et al., 1994; Hong et al., 2004; Chung et al., 2000; Saruwatari et al., 2002; Benowitz et al., 2003; Carillo et al., 2000; Park et al., 2003) καθώς επίσης και η καφεΐνη (Sinha et al., 1994; Le Marchand et al., 1997; Tantcheva-Poor et al., 1999).

Οι αναστολείς του CYP1A2 είναι η α-ναφθοφλαβόνη (Landi et al., 1999), ο χυμός γκρέϊπ-φρούτ (Fuhr and Kummert, 1995), το αλκοόλ (Le Marchand et al., 1997) και φάρμακα όπως η βεραπαμίλη (Fuhr et al., 1992a), η φουραφυλλίνη (Eaton et al., 1995), η σιμετιδίνη (Loi et al., 1993), η φλουβοξαμίνη (Brosen et al., 1993), το 5-μεθοξυ-ψωραλένιο (Bendriss et al., 1996), οι κινολόνες (Fuhr et al., 1992b), η μεξιλετίνη (Joers and Richter, 1987), τα αντιμυκητιασικά φάρμακα (Wahlander and Paumgartner, 1989), τα αντισυλληπτικά (Patwardhan et al., 1980; Calahan et al., 1983; Reitveld et al., 1984; Abernethy et Todd, 1985; Guengerich, 1990; Vistisen et al., 1992) και τα οιστρογόνα που χρησιμοποιούνται ως θεραπεία υποκατάστασης (Pollock et al., 1999) (πίνακας 2). Η αναστολή αυτή λόγω συναγωνισμού για την ενεργή περιοχή του ενζύμου, είναι αντιστρεπτή και μπορεί να οδηγήσει σε τοξικότητα στην περίπτωση των φαρμάκων (Lin and Lu, 1998).

Πίνακας 2. Φάρμακα-υποστρώματα, επαγωγείς και αναστολείς του CYP1A2.

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ	ΕΠΑΓΩΓΕΙΣ
Αντιανδρογόνα Φλουταμίδη (Shet et al., 1997)	Αντικαταθλιπτικά Φλουβοξαμίνη (Brosen et al., 1993)	Αναστολείς αντλίας πρωτονίων Ομεπραζόλη (Diaz et al., 1990)
Αντιψυχωσικά Κλοζαπίνη (22-30%) (Bertilsson et al., 1994)	Φάρμακα για το καρδιαγγειακό σύστημα Μεξιλετίνη (Joers and Richter, 1987), Βεραπαμίλη (Fuhr et al., 1992a)	Αντιφυματικά ΡΙφαμπικίνη (Wietholz et al., 1995)
Φάρμακα για το καρδιαγγειακό σύστημα και αντιπηκτικά Λιδοκαΐνη (80%) (Wang, 2000; Orlando, 2004), Προπρανολόλη (Yosimoto et al., 1995), Τριαμερένη (σχεδόν 100%) (Fuhr et al., 2005), Βαρφαρίνη (Limke et al., 2002)	Αντιασθματικά Φουραφυλλίνη (Eaton et al., 1995)	Αντιεπιληπτικά Φαινυτοΐνη (Wietholz et al., 1989)
Αναστολείς χολινεστεράσης Τακρίνη (>90%) (Spaldin et al., 1995)	Αντιψωριασικά 5-μεθοξυψωραλένιο (Bendriss et al., 1996)	
Αντιϋπερτασικά Αμιτριπτυλίνη (Venkatakrisnan et al., 1998), Ιμπραμίνη (30%) (Lemoine et al., 1993), Μιανσερίνη (Koyama et al., 1996), Χλομπραμίνη (Nielsen et al., 1996)	Αντιμικροβιακά Κινολόνες (Fuhr et al., 1992b)	
Μ.Σ.Α.Φ. Παρακεταμόλη (Manyike et al., 2000), Φαινακετίνη (Butler et al., 1989)	Ανταγωνιστές Η₂ υποδοχέων ισταμίνης Σιμετιδίνη (Loi et al., 1993)	
Διεγερτικά του Κ.Ν.Σ. Καφεΐνη (90%) (Gu et al., 1992)	Αντιμυκητιασικά Κετοконаζόλη (11%), Τερβιναφίνη (21%) (Wahlander and Paumgartner, 1989)	
Αντιασθματικά Θεοφυλλίνη (75%) (Gu et al., 1992)	Θεραπεία υποκατάστασης οιστρογόνων & αντισυλληπτικά (Pollock et al., 1999, Patwardhan et al., 1980; Callahan et al., 1983; Reitveld et al., 1984; Abernethy et Todd, 1985; Guengerich, 1990; Vistisen et al., 1992)	

Μελέτες έδειξαν μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2 σε άτομα με ηπατική νόσο (Denaro et al., 1996; Bechtel et al., 2000; Lelouet et al., 2001) και σε εγκύους (Aldridge et al., 1981; Vistisen et al., 1992; Tsutsumi et al., 2001). Ο δείκτης μάζας σώματος είναι πηγή ποικιλότητας για το CYP1A2. Η κάθαρση της καφεΐνης είναι ηπίως μεγαλύτερη σε λεπτόσωμα άτομα σε σύγκριση με παχύσαρκα (Tancheva-Poor et al., 1999). Εντούτοις, σε άλλες μελέτες δεν αναδεικνύεται αυτή η διαφορά. Οι Le Marchand et al., 1997 δεν βρήκαν κάποια συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας του ενζύμου όπως αυτή προσδιορίστηκε με το μεταβολικό λόγο (17U+17X)/137X στα ούρα και του σωματικού βάρους καθώς επίσης και ο Cheymol, 2000 βρήκε πως η παχυσαρκία έχει ασήμαντη επίδραση στο CYP1A2.

Επιπρόσθετα, υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα μελετών για την επίδραση του φύλου και της ηλικίας, με την πλειονότητα να υποστηρίζει πως η ηλικία (Kalow and Tang., 1991b; Relling et al., 1992; Vistisen et al., 1992; Catteau et al., 1995; Tanchcheva-Poor et al., 1999; Simon et al., 2001; Bebia et al., 2004) και το φύλο (Kashuba et al., 1998; Le Marchard et al., 1997; Saruwatari et al., 2002; Krull και Hageman, 1998; Horn et al., 1995; Caubet et al., 2002) δεν επηρεάζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου.

Το CYP1A2 εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία όμως δεν έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ γονότυπου και φαινότυπου του ενζύμου αυτού (Jiang et al., 2006). Σε Καυκάσιους και Ασιάτες δεν έχει ανιχνευθεί διαφορά νουκλεοτιδίων που θα μπορούσε να ερμηνεύσει τη φαινοτυπική ποικιλομορφία στο γονίδιο του CYP1A2 (Nakajima et al., 1994; Nakajima et al., 1999; Sachse et al., 2003). Εντούτοις, έχουν βρεθεί απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (single nucleotide polymorphisms –SNPs), εκ των οποίων οι δυο πιο κοινοί είναι ο CYP1A2*1F με νουκλεοτιδική αλλαγή C>A στο ιντρόνιο-1 και ο CYP1A2*1C με αλλαγή G>A στην 5'- πλευρική περιοχή του γονιδίου που σχετίζονται με αυξημένη και μειωμένη επαγωγιμότητα του ενζύμου, αντίστοιχα (Sachse et al., 1999; Nakajima et al., 1999). Ο πολυμορφισμός CYP1A2 -164 C→A (CYP1A2*1F) έχει συσχετιστεί με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου (Moonen et al., 2005). Η μεγάλη διακύμανση της δραστηριότητας του ενζύμου μεταξύ των ατόμων οφείλεται και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (27,5%) εκτός από την κληρονομικότητα (72,5%) (Rasmussen et al., 2002).

1.2 CYP2A6

Το γονίδιο του CYP2A6 αποτελεί ένα από τα τρία μέλη της υποοικογένειας του CYP2, τα άλλα μέλη είναι το CYP2A7 και το CYP2A13, των οποίων τα προϊόντα δεν είναι λειτουργικά σε κανέναν ιστό (Hoffman et al., 1995). Εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ σε ποσοστό 1-10% περίπου επί του συνολικού P450, ενώ μικρή ποσότητα του ανευρίσκεται στο βλεννογόνο της μύτης.

Στο ανθρώπινο ήπαρ, το CYP2A6 είναι το μόνο κυτόχρωμα, το οποίο καταλύει την 7-υδροξυλίωση της κουμαρίνης, ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου υποστρώματος σε μελέτες μεταβολισμού των φαρμάκων (Pelkonen et al., 1997). Επιπλέον, συμμετέχει στο μεταβολισμό πολλών φαρμάκων όπως της χλωρμεθιαζόλης (Oscarson et al., 1998; Pelkonen et al., 2000), του αλοθανίου (Spracklin et al., 1996), του βαλπροϊκού οξέος (Sadeque et al., 1997), του μεθοξυφλουρανίου (Kharasch et al., 1995) καθώς και στην ενεργοποίηση προμεταλλαξιογόνων και προκαρκινογόνων ουσιών όπως της αφλατοξίνης B1 (Yun et al., 1991), της 3-μεθυλινδόλης (Thornton-Manning et al., 1996) και ορισμένων νιτροζαμινών του καπνού και των τροφών (Camus et al., 1993; Chen et al., 1999; Tiano et al., 1993). Η N-οξειδωση της νικοτίνης σε κοτινίνη όπως και η 3-υδροξυλίωση της κοτινίνης καταλύονται από το CYP2A6 (Cashman et al., 1992; Nakajima et al., 1996), (πίνακας 3).

Πίνακας 3. Υποστρώματα του CYP2A6 και ποσοστό συνεισφοράς του ενζύμου στο μεταβολισμό τους*.

Υποστρώματα	Ποσοστό συνεισφοράς του CYP2A6 στο μεταβολισμό (συμμετοχή άλλων CYPs)
Κουμαρίνη (Yun et al., 1991)	100%
Μεθοξυφλουράνιο (Kharasch et al., 1995)	
Αλοθάνιο (Spracklin et al., 1996)	
Βαλπροϊκό οξύ (Sadeque et al., 1997)	Μικρό; (CYP2C9)
Νικοτίνη (Cashman et al., 1992; Nakajima et al., 1996)	Μεγάλο
Κοτινίνη (Nakajima et al., 1996)	Μεγάλο
3-μεθυλινδόλη (Thornton-Manning et al., 1996)	
NNK (Tiano et al., 1993)	Μικρό; (CYP2E1)
NDEA (Camus et al., 1993)	Μεγάλο; (CYP2E1)
MNAN (Chen et al., 1999)	Μεγάλο; (CYP2E1)
MOCA (Yun et al., 1992)	Μικρό
AFB1 (Yun et al., 1991)	Μικρό (CYP1A2; CYP3A4)
DCBN (Ding et al., 1996)	Μεγάλο; (CYP2E1)

*NNK, μεθυλνιτροζάμινο-1-βουτανόνιο; NDEA, N-νιτροζοδιαιθυλαμίνη; MNAN, μεθυλ-ν-αμυλνιτροζαμίνη MOCA, 2-χλωροανιλίνη; AFB1, αφλατοξίνη B1; DCBN, 2,6-διχλωροβενζονιτρίλιο.

Υπάρχει ένας αριθμός αναστολέων και επαγωγών του CYP2A6. Η δραστηριότητά του ενζύμου αναστέλλεται από το 8-μεθοξυψωραλένιο, το οποίο αποτελεί ισχυρό αναστολέα, καθώς και από την πιλοκαρπίνη, την τρανυλκυπρομίνη, τα φλαβονοειδή και τη κετοκοναζόλη, τα οποία αποτελούν ασθενείς αναστολείς (Draper et al., 1997). Η δραστηριότητά του επάγεται από διάφορα αντιεπιληπτικά φάρμακα όπως τη φαινυτοΐνη, τη καρβαμαζεπίνη, τη κλοναζεπάμη, τη φαινοβαρβιτάλη (Sotaniemi et al., 1995) και από τα βαρβιτουρικά (Nowell et al., 2002).

Το κάπνισμα δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα του CYP2A6 (Begas et al., 2007; Nowell et al., 2002; Sinues et al., 2008) αν και στη μελέτη των Pelkonen et al., 2000 φαίνεται να αναστέλλει το μεταβολισμό της νικοτίνης και της κουμαρίνης. Η επίδραση της ηλικίας (Nowell et al., 2002; Krul and Hageman 1998) και του γένους (Nowell et al., 2002; Grant et al., 1983) στη δραστηριότητα του CYP2A6 παραμένουν αδιευκρίνιστα, αν και σε μία μελέτη υγιών ατόμων η δραστηριότητα του CYP2A6 εμφανίστηκε αυξημένη στο τμήμα του πληθυσμού άνω των 70 ετών (Nowell et al., 2002). Όσον αφορά το φύλο, υπάρχουν μελέτες που έδειξαν πως το φύλο δεν επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα του ενζύμου (Grant et al., 1983; Begas et al., 2007), ενώ οι Nowell et al., 2002, διαπίστωσαν υψηλότερη δραστηριότητα του ενζύμου στις γυναίκες σε σύγκριση με τους άντρες, χωρίς όμως η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Σε δύο μελέτες η απέκκριση της 7-υδροξυκουμαρίνης που σχηματίζεται από την κουμαρίνη μέσω του CYP2A6 στα ούρα ήταν σημαντικά υψηλότερη στις γυναίκες απ'ότι στους άντρες (Iskan et al., 1994; Ujjiin et al., 2002) και σε μια άλλη μελέτη η κάθαρση της νικοτίνης και της κοτινίνης, διαδικασία που αποτελεί δείκτη της δραστηριότητας του CYP2A6, ήταν σημαντικά υψηλότερη στις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες (Benowitz et al., 2006).

Αυξημένη έκφραση του CYP2A6 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του ήπατος σε πληθυσμούς με συχνή έκθεση σε αφλατοξίνη (Kirby et al., 1996) και με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του ορθού (Nowell et al., 2002). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η δραστηριότητα του CYP2A6 αυξάνεται στην κίρρωση του ήπατος (Bechtel et al., 2000; Lelouet et al., 2001).

Υπάρχει ποικιλομορφία μεταξύ των εθνών και των ατόμων της ίδιας φυλής στα επίπεδα και τη δραστηριότητα του CYP2A6, η οποία μπορεί να αποδοθεί, ως ένα βαθμό, σε πολυμορφισμούς του γονιδίου του ενζύμου καθώς και σε λιγοστές μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί (Oscarson et al., 2001). Αξίζει να αναφερθεί πως ένα σημαντικό ποσοστό

ιαπώνων έχει πλήρη έλλειψη της πρωτεΐνης (Shimada et al., 1996), ένα εύρημα που συμφωνεί με μελέτες που αποδεικνύουν υψηλή συχνότητα απαλοιφής του γονίδιου του CYP2A6 στον ιαπωνικό πληθυσμό (Nunoya et al., 1998). Εντούτοις, τα περισσότερα αλληλόμορφα έχουν μικρή συχνότητα στους Καυκάσιους (Chen et al., 1999), με αποτέλεσμα η μέτρηση του φαινότυπου να παραμένει σημαντικός παράγων για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP2A6 (Nowell et al., 2002).

1.3 ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΗΣ ΞΑΝΘΙΝΗΣ

Η Οξειδάση της ξανθίνης (XO) είναι ένα διαλυτό κυτταροπλασματικό ένζυμο το οποίο καταλύει την οξειδωση ενδογενών ενώσεων όπως οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες και φαρμάκων όπως οι θειοπουρίνες και οι μεθυλοξανθίνες (Kretnitsky et al., 1974). Είναι φλαβοπρωτεΐνη, περιέχει μολυβδένιο και σίδηρο στο ενεργό της κέντρο και εντοπίζεται στο ανθρώπινο ήπαρ τόσο στα ηπατοκύτταρα όσο και στα κολποειδή κύτταρα (Stirpe et al., 2002). Η μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου παρατηρείται στο ήπαρ και στο έντερο (Kretnitsky et al., 1974). Στα θηλαστικά, η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης (XOR) μπορεί να μετατραπεί στην XO ή στην δεϋδρογονάση της ξανθίνης μη αντιστρεπτά με πρωτεόλυση ή αντιστρεπτά με χημική ή ενζυματική οξειδωση των θειούχων ομάδων της. Η δεϋδρογονάση της ξανθίνης, κατά προτίμηση, ανάγει το NAD⁺ ενώ η XO δεν μπορεί να το αναγάγει, προτιμώντας το μοριακό οξυγόνο (Harrison, 2002).

Αν και η XO δεν θεωρείται πολυμορφικό ένζυμο, έχει παρατηρηθεί εύρος 2-4 φορές στη δραστηριότητά του στους ενήλικες (Kalow et al., 1985; Guerciollini et al., 1991). Μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου έχει παρατηρηθεί σε πληθυσμούς από την Αιθιοπία (4%) (Aklillu et al., 2003), από την Ιαπωνία (11%) (Saruwatari et al., 2002) και από την Ισπανία (4%) (Carillo et al. 1994), ενώ πλήρης απώλεια της ενεργότητας του αναφέρεται στη κληρονομική νόσο ξανθινουρία (Guerciolini et al., 1991). Το κάπνισμα, το αλκοόλ και το φύλο δεν φαίνεται να επηρεάζουν τη δραστηριότητα της XO (Aklillu et al., 2003; Chung et al., 2000; Kalow and Tang, 1991; Guerciolini et al., 1991). Επιπλέον, η αλλοπουρινόλη αναστέλλει την XO, ενώ η ιντερφερόνη-γ, ο TNF-α και η ιντερλευκίνη-1β την επάγουν (Harrison, 2002).

Η XO διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ισχαιμίας-επανοξυγόνωσης των ιστών. Σύμφωνα με έναν προτεινόμενο μηχανισμό, η δεϋδρογονάση

της ξανθίνης, κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας του ιστού, μετατρέπεται σε οξειδάση της ξανθίνης με την ενεργοποίηση μιας πρωτεάσης λόγω αύξησης του κυτταροπλασματικού Ca^{++} . Λόγω καταβολισμού του ATP παράγεται υποξανθίνη η οποία αντιδρά με την ΧΟ και το οξυγόνο κατά την διαδικασία της επανοξυγονώσεως με αποτέλεσμα το σχηματισμό των κυτταροτοξικών ελευθέρων ριζών οξυγόνου, ριζών υδροξυλίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου (Simpson and Lucchesi, 1987). Παρόμοιος μηχανισμός είναι πιθανόν να ενεργοποιείται κατά τις μολύνσεις και άλλες φλεγμονώδεις βλάβες, μιας και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προκαλούν τη συσσώρευση χημειοτακτικών παραγόντων (Oda et al., 1989). Επιπλέον, η δραστηριότητα της ΧΟ αυξάνεται σε ασθένειες όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το άσθμα, η κίρρωση του ήπατος και τα καρδιαγγειακά νοσήματα (Bechtel et al., 2000; Lelouet et al., 2001). Επίσης, η ΧΟ κάτω από αναερόβιες συνθήκες μετατρέπει τα οργανικά νιτρικά τύπου R-O-NO₂, όπως η τρινιτρογλυκερίνη και ο δινιτρικός ισοσορβίτης, σε μονοξείδιο του αζώτου. Οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της ισχαιμίας του μυοκαρδίου λόγω του NO που παράγουν (Li et al., 2005).

1.4 NAT-2

Η Ν-ακετυλοτρανσφεράση-2 ή NAT-2 είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο, το οποίο σε αντίθεση με την NAT-1, η οποία εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, εντοπίζεται στο ήπαρ και στο βλεννογόνο της νήστιδας (Blum et al., 1990). Τα δύο ένζυμα μετέχουν στις αντιδράσεις της φάσης II του μεταβολισμού των φαρμάκων (αντιδράσεις σύζευξης) και καταλύουν την προσθήκη μιας ακετυλο-ομάδας από το ακετυλο-συνένζυμο-A σε ένα άτομο αζώτου σε υποστρώματα όπως οι αρυλαμίνες και οι ετεροκυκλικές αμίνες και σε ένα άτομο οξυγόνου σε υποστρώματα όπως οι αρυλυδροξυλαμίνες (Grant and Meyer, 1993). Η NAT-2 είναι υπεύθυνη, εκτός από την αποτοξίνωση ορισμένων περιβαλλοντικών καρκινογόνων ουσιών (Gu et al., 2005), και για την ακετυλίωση περισσότερων από 15 φαρμάκων όπως της δαψόνης, της διπυρόνης, της καφεΐνης, της υδραλαζίνης, των σουλφοναμιδών, της ισονιαζίδης, της κλοναζεπάμης, και της προκαΐναμίδης (Evans, 1989).

Μελέτες έχουν δείξει πως το φύλο (Tang et al., 1991; Relling et al., 1992; Saruwatari et al., 2002), η ηλικία (Relling et al., 1992) και το κάπνισμα (Le Marchand et al., 1996; Begas et al., 2007; Benowitz et al., 2003; Saruwatari et al., 2002; Rasmussen and Brosen., 1996) δεν επηρεάζουν τη δραστηριότητα της NAT-2.

Η NAT-2 εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία (Grant et al., 1997), η οποία έχει σημαντική επίδραση στο θεραπευτικό αποτέλεσμα και στην τοξικότητα των φαρμάκων (Drayer and Reidenberg, 1977). Η ποικιλομορφία αυτή οφείλεται περισσότερο σε γενετικούς και λιγότερο σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (Sinha and Carogaso, 1997). Το γονίδιο της NAT-2 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8 και είναι αυτοσωμικό επικρατές (Blum et al., 1990). Έχουν ταυτοποιηθεί 26 αλληλόμορφα της NAT-2, τα οποία προέκυψαν από επτά διαφορετικές μεταλλάξεις, οι πέντε από τις οποίες οδηγούν σε αλλαγές αμινοξέων (Vatsis et al., 1991) και οδηγούν σε βραδείς ακετυλιωτές, ενώ το αλληλόμορφο του άγριου τύπου (NAT2*4) αντιστοιχεί στον φαινότυπο του ταχέως ακετυλιωτή. Η μεγάλη διακύμανση της δραστηριότητας του ενζύμου αντικατοπτρίζεται στην ύπαρξη δικόρυφης ή τρικόρυφης πληθυσμιακής κατανομής (Parkin et al., 1997; Kilbane et al., 1990). Το είδος αυτών των κατανομών οδήγησαν στην ταξινόμηση των ατόμων σε ταχείς, ενδιάμεσους και βραδείς ακετυλιωτές. Η αναλογία των βραδέων με τους ταχείς ακετυλιωτές διαφέρει μεταξύ των εθνών. Ο φαινότυπος του βραδέως ακετυλιωτή είναι περισσότερο κυρίαρχος στη Βόρεια Αφρική (90%) και τη Σκανδιναβία (75-80%), ανευρίσκεται σε χαμηλό ποσοστό στους Εσκιμώους του Καναδά και στους Ιάπωνες (5%), ενώ στους Καυκάσιους και τους Αφροαμερικάνους η αναλογία είναι 60-40% (Slattery et al., 1998; Chen et al., 1998; Taylor et al., 1998).

Η κλινική σημασία του πολυμορφισμού της ακετυλίωσης έχει διερευνηθεί σε μεγάλο βαθμό. Η χορήγηση φαρμάκων, των οποίων η κάθαρση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ακετυλίωση, μπορεί να προκαλέσει σε βραδείς ακετυλιωτές ανεπιθύμητες ενέργειες και σε ταχείς ακετυλιωτές μη θεραπευτικό αποτέλεσμα και υποτροπή της νόσου, όπως στην περίπτωση της ισονιαζίδης σε ασθενείς με φυματίωση (Evans, 1989). Ανεπιθύμητες ενέργειες είναι υπόταση στην περίπτωση της υδραλαζίνης, περιφερική νευροπάθεια και ηπατοτοξικότητα στην περίπτωση της ισονιαζίδης, και συστηματικός ερυθματώδης λύκος στις περιπτώσεις της ισονιαζίδης, της προκαΐναμίδης και της υδραλαζίνης (Kilbane et al., 1989).

Επίσης, οι φαινότυποι των ταχέων και των βραδέων ακετυλιωτών σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης συγκεκριμένων νεοπλασμάτων. Σε καρκίνους, όπως στον εξαρτώμενο από αρωματικές αμίνες καρκίνο της ουροδόχου κύστης, όπου η N-ακετυλίωση αποτελεί το μονοπάτι αποτοξίνωσης, ο φαινότυπος του βραδέως ακετυλιωτή βρίσκεται σε μεγαλύτερο κίνδυνο. Σε αντίθεση, στους καρκίνους όπως στον εξαρτώμενο από τις ετεροκυκλικές αμίνες

καρκίνο του παχέος εντέρου, όπου η Ν-ακετυλίωση είναι ασήμαντη και το μονοπάτι ενεργοποίησης είναι η Ο-ακετυλίωση, ο φαινότυπος του ταχέως ακετυλιωτή απαντάται συχνότερα (Hein, 2002). Επιπλέον, παρατηρείται μεγαλύτερη συχνότητα βραδέων ακετυλιωτών μεταξύ των ασθενών με καρκίνο του λάρυγγα σε σχέση με τους υγιείς (Cascorbi et al., 1996), ενώ η συσχέτιση του γονοτύπου της NAT-2 με τον καρκίνο του μαστού έχει αντικρουόμενα αποτελέσματα (Millikan et al., 1998; Gertig et al., 1998). Η συσχέτιση των ασθενειών με το φαινότυπο της NAT-2 είναι πιο ισχυρή στους καπνιστές από τους μη καπνιστές (Ambrosone et al., 1996). Ο γονότυπος του ενζύμου σε συνδυασμό με την έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες εξηγούν μερικώς την εμφάνιση ορισμένων καρκίνων σε διαφορετικούς πληθυσμούς.

1.5 ΚΑΦΕΪΝΗ: ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Η καφεΐνη είναι ένα αλκαλοειδές παράγωγο της ξανθίνης (1,3,7 τριμεθυλοξανθίνη) και η πρόσληψη της αποτελεί σημαντικό κομμάτι των διαιτητικών συνηθειών των ανθρώπων, μιας και περιέχεται στον καφέ, στο τσάι, στην σοκολάτα, στην κόκα κόλα και σε ορισμένα φάρμακα. Η καφεΐνη επηρεάζει αρκετά συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού μέσω μη εκλεκτικού ανταγωνισμού των A_1 και A_{2A} υποδοχέων της αδενοσίνης, αναστολής της φωσφοδιεστεράσης και σταθεροποίησης του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα προκαλεί διέγερση, η οποία εκδηλώνεται με καλύτερη διάθεση, καταπολέμηση της υπνηλίας, μείωση της κόπωσης, αύξηση της ικανότητας για εργασία, ανησυχία, ευερεθιστότητα, μυϊκό τρόμο, κρίσεις και παραλήρημα. Όσον αφορά τα συμπτώματα στο καρδιαγγειακό σύστημα ποικίλουν από μικρή αύξηση του καρδιακού ρυθμού και της αρτηριακής πίεσεως έως καρδιακές αρρυθμίες. Στο γαστρεντερικό σύστημα μπορεί να προκαλέσει ναυτία, εμέτους και διάρροιας, ενώ στο ουροποιητικό σύστημα αυξάνει τη διούρηση. Οι τοξικές επιδράσεις της καφεΐνης αποτελούν προέκταση των φαρμακολογικών της δράσεων (Carrillo and Benitez, 2000).

Η καφεΐνη, μετά τη χορήγηση της από το στόμα, απορροφάται πλήρως από το γαστρεντερικό σωλήνα και έπειτα σχεδόν από μία ώρα ανιχνεύεται η μέγιστη συγκέντρωση της στο πλάσμα χωρίς να συμβαίνει σημαντική μετατροπή πρώτης δόξου (Carrillo et al., 2000). Η καφεΐνη ως υδρόφοβο μόριο περνά διαμέσου όλων των βιολογικών μεμβρανών και επειδή δεν συνδέεται με πρωτεΐνες δεν παρατηρείται συσσώρευση της σε κανένα

όργανο ή ιστό και ανιχνεύεται σε όλα τα σωματικά υγρά όπως για παράδειγμα στο σίελο, στο σπέρμα, στο μητρικό γάλα και στη χολή. Ο όγκος κατανομής της είναι περίπου 0,7 L/kg (Bonati et al., 1984).

Ο χρόνος ημίσειας ζωής της καφεΐνης ποικίλει από 3 έως 6 ώρες στους ενήλικες, αλλά είναι σχεδόν διπλάσιος στα άτομα που δεν καταναλώνουν καφέ σε σύγκριση με εκείνα που καταναλώνουν τακτικά μεγάλες ποσότητες (7,5 και 4 ώρες αντίστοιχα). Το γεγονός αυτό φαίνεται να σχετίζεται με τον αυξημένο αριθμό και τη σοβαρότητα των τοξικών επιδράσεων της καφεΐνης στα άτομα που δεν πίνουν καφέ σε σχέση με τους τακτικούς καταναλωτές (Carrillo et al., 2000). Ο χρόνος ημίσειας ζωής της καφεΐνης στα νεογέννητα είναι περίπου 100 ώρες (Benowitz, 1990). Η καφεΐνη μεταβολίζεται στο ήπαρ και οι μεταβολίτες της απεκκρίνονται στα ούρα, χωρίς σημαντική συμμετοχή άλλων οργάνων (Berthou et al., 1989).

Στο μεταβολισμό της καφεΐνης μετέχει ένας μεγάλος αριθμός ενζύμων και ενδιαμέσων προϊόντων (εικόνα 1). Κάθε μία από τις τρεις ομάδες μεθυλίου της καφεΐνης (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη) υπόκειται σε απομεθυλίωση. Η N-3 απομεθυλίωση της καφεΐνης προς 17X (1,7-διμεθυλοξανθίνη ή παραξανθίνη) ευθύνεται, κατά προσέγγιση, για το 84% της πρωτογενούς απομεθυλίωσης της καφεΐνης και θεωρείται ο κυριότερος μεταβολικός δρόμος (Kalow et Tang, 1991a). Η N-1 απομεθυλίωση, με προϊόν την 37X (3,7-διμεθυλοξανθίνη ή θεοβρωμίνη) και η N-7 απομεθυλίωση με προϊόν την 13X (1,3-διμεθυλοξανθίνη ή θεοφυλλίνη), ευθύνονται, κατά προσέγγιση, για το 11% και 5% αντίστοιχα, των τριών πρωτογενών απομεθυλίωσεων της καφεΐνης (Gu et al., 1992). Ένα πολύ μικρό ποσοστό της καφεΐνης μπορεί να μετατραπεί σε 1,3,7-τριμεθυλουρικό οξύ (137U). Η N-3 απομεθυλίωση της καφεΐνης καταλύεται από το CYP1A2 (Butler et al., 1989) και σε μικρότερο ποσοστό από το CYP1A1, αλλά εφόσον το CYP1A1 δεν εκφράζεται συνεχώς στο ήπαρ, ο μεταβολισμός της καφεΐνης αντανακλά την ηπατική δραστηριότητα του CYP1A2. Το CYP1A2 συμμετέχει επίσης στις N-1 και N-7 απομεθυλίωσεις με αποτέλεσμα να ευθύνεται για περισσότερο από το 95% του πρωτογενούς μεταβολισμού της καφεΐνης. Στις N-1 και N-7 απομεθυλίωσεις συμμετέχει σε ένα μικρό ποσοστό και το CYP2E1 που επάγεται από την αιθανόλη (Gu et al., 1992).

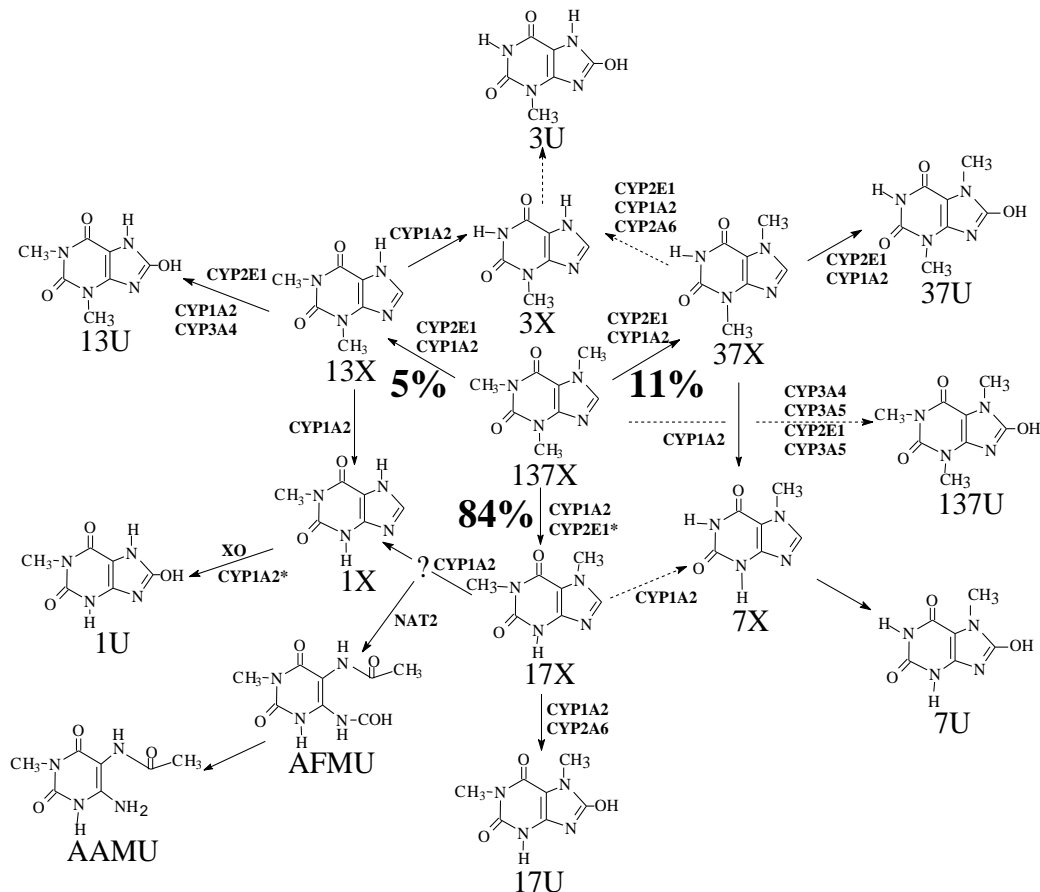
Η 17X στη συνέχεια υφίσταται δύο αντιδράσεις, η μία εκ των οποίων είναι η 8-υδροξυλίωση κυρίως μέσω του CYP2A6, αλλά και του CYP1A2 με προϊόν το 17U (1,7-διμεθυλο-ουρικό οξύ) (Gu et al., 1992). Η άλλη αντίδραση είναι η 7-απομεθυλίωση που

οδηγεί στο σχηματισμό ενός ασταθούς ενδιάμεσου προϊόντος το οποίο σταθεροποιείται με εσωτερική επαναδιάταξη σε 1X (1-μεθυλο-ξανθίνη) μέσω του CYP1A2 και με ακετυλίωση σε AFMU (5-ακετυλαμινο-6-φορμυλαμινο-3-μεθουρακίλη) μέσω του ενζύμου NAT-2 (Kalow et Tang., 1993). Ένα ποσοστό της 1X με 8-υδροξυλίωση κυρίως από την οξειδάση της ξανθίνης με τη συμμετοχή του CYP1A2 μετατρέπεται σε 1U (1-μεθυλο-ουρικό οξύ) (Grant et al., 1984). Το AFMU είναι ασταθές προϊόν και εύκολα μετατρέπεται στο σταθερό AAMU (5-ακετυλαμινο-6-αμινο-3-μεθουρακίλη) κυρίως με αύξηση του pH (Tang et al., 1983). Η μετατροπή του AFMU σε AAMU συμβαίνει σε σημαντικό βαθμό μέσα στην ουροδόχο κύστη σε μερικά κατ' εξαίρεση άτομα, αλλά δεν πλήρως γνωστό αν αυτό συμβαίνει εξαιτίας του υψηλού pH των ούρων ή εξαιτίας διαφόρων συστατικών των ούρων που ενισχύουν τη δράση του pH (Kalow and Tang, 1993). Βέβαια, ένα πολύ μικρό ποσοστό της 17X μπορεί να μετατραπεί σε 7X (7-μεθυλο-ξανθίνη), η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται σε 7-μεθουρικό οξύ (7U).

Επίσης, η 37X μπορεί να μετατραπεί είτε στο 37U (3,7-διμεθυλο-ουρικό οξύ) ή στην 7X ή σε μικρότερο βαθμό στην 3X (3-μεθυλο-ξανθίνη), η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται σε 3-μεθουρικό οξύ (3U). Η 13X μπορεί να μετατραπεί περαιτέρω στο 13U (1,3-διμεθυλο-ουρικό οξύ) ή στην 1X (1-μεθυλο-ξανθίνη) ή στην 3X (Gu et al., 1992). Η 3X παράγεται χωρίς διάκριση τόσο από την 37X όσο και από την 13X σε αντίθεση με την 1X που προέρχεται σχεδόν εξ ολοκλήρου από την 17X και την 7X που παράγεται στο μεγαλύτερο ποσοστό της από την 37X (Kalow and Tang, 1993).

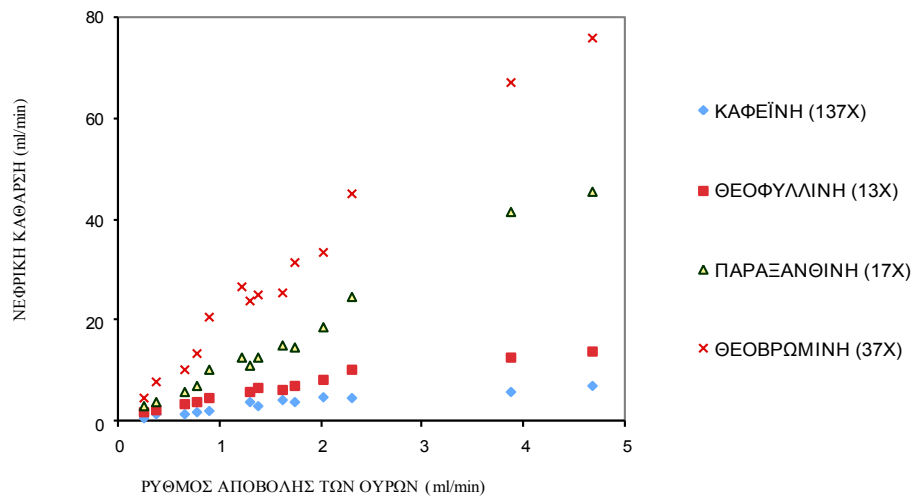
Το CYP1A2 μετέχει σε όλες τις αντιδράσεις του μεταβολισμού της καφεΐνης σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα εκτός από την N-3 απομεθυλίωση της καφεΐνης και την N-7 απομεθυλίωση της 17X (Gu et al., 1992).

Το μεγαλύτερο ποσοστό της χορηγούμενης δόσης καφεΐνης στον άνθρωπο μετατρέπεται σε μεταβολίτες και μόνο ένα μικρό ποσοστό της (1-2%) απεκκρίνεται αμετάβλητη στα ούρα λόγω υψηλής νεφρικής σωληναριακής επαναρρόφησης (Arnaud, 1993). Οι κυριότεροι μεταβολίτες της καφεΐνης στα ούρα είναι η 17X, η 1X, το 1U, η AFMU και το 17U.



Εικόνα 1. Μεταβολικοί οδοί της καφεΐνης στο ανθρώπινο ήπαρ. Οι κύριες αντιδράσεις μεταβολισμού της καφεΐνης απεικονίζονται με τα σκουρόχρωμα βέλη και οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε μικρότερο ποσοστό απεικονίζονται με τα διακεκομμένα βέλη. Πάνω στα βέλη φαίνονται τα ένζυμα που μετέχουν στη συγκεκριμένη αντίδραση, ενώ ο αστερίσκος σημαίνει μικρή συμμετοχή του συγκεκριμένου ενζύμου.

Η τύχη της καφεΐνης και κάποιων από τους μεταβολίτες της *in vivo* εξαρτάται από τη μεταβολική ποικιλότητα καθώς και από νεφρικούς παράγοντες (π.χ. ρυθμό αποβολής των ούρων). Ο ρυθμός αποβολής των ούρων εξαρτάται από την πρόσληψη υγρών. Ειδικότερα, η νεφρική κάθαρση της καφεΐνης αυξάνεται κατά 3,4 φορές όταν ο ρυθμός ροής των ούρων αυξάνεται από 0,6 σε 3,2 ml/min (Kalow and Tang, 1993). Συνεπώς, η συγκέντρωση της καφεΐνης στα ούρα εξαρτάται από το χρόνο συλλογής του δείγματος των ούρων. Η νεφρική απέκκριση των 17X, 13X και 37X εξαρτάται από το ρυθμό αποβολής των ούρων και η νεφρική τους κάθαρση είναι υψηλότερη απ' αυτή της καφεΐνης (εικόνα 2). Αντίθετα, οι μονομεθυλοξανθίνες, τα ουρικά οξέα και το AFMU έχουν μεγάλο βαθμό νεφρικής απέκκρισης και λόγω των μικρών συγκεντρώσεών τους δύσκολα μπορούν να μετρηθούν στο πλάσμα, αλλά μπορούν εύκολα να μετρηθούν στα ούρα. Οι μεταβολίτες αυτοί, εξαιτίας της πολικότητάς τους, μόλις σχηματίζονται, αποβάλλονται αμέσως στα ούρα χωρίς επαναρρόφηση από τους νεφρούς, και γι' αυτό το λόγο είναι πολύ καλοί δείκτες των μεταβολικών διαδικασιών (Kalow and Tang, 1993; Campbell et al., 1987a).



Εικόνα 2. Συσχέτιση ανάμεσα στο ρυθμό αποβολής των ούρων και τη νεφρική κάθαρση της καφεΐνης και των τριών διμεθυλοξανθινών σε ένα άτομο μετά από μεμονωμένη δόση καφεΐνης (Tang-Liu et al., 1983).

1.6 *IN VIVO* ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ CYP1A2, CYP2A6, XO ΚΑΙ NAT-2 ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΦΕΪΝΗΣ

1.6.1 Μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 με τη χρήση καφεΐνης

Ο προσδιορισμός του CYP1A2 επιτυγχάνεται με εξέταση ηπατικού ιστού με τη βοήθεια της μεθόδου Western blot ή της μέτρησης του mRNA, εφόσον το ένζυμο ανευρίσκεται στο ήπαρ. Δεδομένου της δυσκολίας που εμφανίζει η βιοψία του ήπατος έχουν αναπτυχθεί απλοποιημένες και μη επεμβατικές μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2. Η δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης, η κάθαρση της καφεΐνης από το σίελο και οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης στο πλάσμα, το σίελο και τα ούρα χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2, μιας και η καφεΐνη αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα του ενζύμου.

Η δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης συνίσταται στη χορήγηση μίας δόσης καφεΐνης με επισημασμένο ^{13}C άτομο στην 3-μεθυλική ομάδα του μορίου και στη μέτρηση της δίωρης σωρευτικής εκπνοής ραδιοεπισημασμένου CO_2 (Lambert et al., 1986) ή μεμονωμένης εκπνοής μια ώρα μετά την από του στόματος χορήγηση (Park et al., 2003). Σημαντικό ρόλο έχει ο χρόνος συλλογής των δειγμάτων της αναπνοής προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση της μέτρησης από την 3-απομεθυλίωση της 37X και της 13X και η απουσία σωματικής δραστηριότητας μιας και αυτή επηρεάζει την παραγωγή CO_2 . Η εγκυρότητα της μεθόδου αποδεικνύεται από την εξαιρετική συσχέτιση της συσσωρευτικής και της μεμονωμένης δοκιμασίας αναπνοής ($r=0,9$, $r=0.85$ αντίστοιχα) με τη συστηματική

κάθαρση της καφεΐνης (Kotake et al., 1982; Renner et al., 1984). Η εγκυρότητα της δοκιμασίας αναπνοής της καφεΐνης αποδεικνύεται καθώς έχει ανιχνεύσει υψηλές τιμές του CYP1A2 στους καπνιστές (Kotake et al., 1982), στα παιδιά (Lambert et al., 1986), σε άτομα που εκτέθηκαν σε πολυβρωμιωμένα διφαινύλια (Lambert et al., 1990), σε άτομα μετά από πρόσληψη ομεπραζόλης (Rost et al., 1992) και χαμηλές τιμές του CYP1A2 σε άτομα με χαμηλή πρόσληψη πρωτεϊνών (Juan et al., 1986), σε ασθενείς με ηπατικές ασθένειες (Renner et al., 1984; Park et al., 2003), σε εγκύους και σε γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτικά (Kalow and Tang, 1993). Μειονέκτημα της δοκιμασίας αυτής είναι η απαίτηση για ραδιοεπισημασμένη καφεΐνη και ειδικό εξοπλισμό, ο οποίος μετρά το ραδιοεπισημασμένο CO₂ στον εκπνεόμενο αέρα.

Ο υπολογισμός της κάθαρσης της καφεΐνης από το σίελο επιτυγχάνεται με δύο μετρήσεις των συγκεντρώσεων της καφεΐνης (Jost et al., 1987). Ειδικότερα, χορηγούνται 280 mg καφεΐνης το απόγευμα και μετρώνται οι συγκεντρώσεις της καφεΐνης στο σίελο πριν την κατάκλιση και κατά την πρωινή έγερση με ανοσοενζυμική μέθοδο (EMIT). Η αξιοπιστία της μεθόδου μέθοδος φαίνεται από το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις της καφεΐνης στο σίελο συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με αυτές στο πλάσμα ($r=0.74$). Μειονεκτήματα της δοκιμασίας αποτελούν η διασταυρούμενη αντίδραση της ανοσοενζυμικής μεθόδου προσδιορισμού της καφεΐνης με την 17X, η οποία μπορεί και να αντικατασταθεί με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Tantcheva-Poor et al., 1999) και η ανάγκη δύο δειγματοληψιών σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Εντούτοις, και μία μεμονωμένη μέτρηση της συγκέντρωσης της καφεΐνης στο σίελο μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης της δραστηριότητας του CYP1A2 (Tarantino et al., 2006).

Πολλοί μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης, σε διάφορα βιολογικά υγρά έχουν προταθεί για τη μέτρηση της δραστηριότητας του CYP1A2, καθένας από τους οποίους έχει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

Ο μεταβολικός λόγος 17X/137X στο πλάσμα και στο σίελο χρησιμοποιήθηκε με μέθοδο αναφοράς την κάθαρση της καφεΐνης και προσδιορίστηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, 5-7 ώρες μετά τη λήψη καφεΐνης (Fuhr and Rost, 1994). Επίσης, ο λόγος $\frac{13X + 17X + 37X}{137X}$ στο πλάσμα, παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση ($r=0,905$) με την κάθαρση της καφεΐνης, 4 ώρες μετά την από του στόματος χορήγηση της (Tanaka et al., 1992). Πλεονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν η σημαντική μείωση του χρόνου, του κόστους και του απαιτούμενου εξοπλισμού για το φαινοτυπικό προσδιορισμό του CYP1A2.

Επιπλέον, ο λόγος 17X/137X είναι κατάλληλος για επιδημιολογικές μελέτες. Το μειονέκτημα των μεθόδων μέτρησης των μεταβολικών λόγων στο πλάσμα είναι ότι απαιτούν τη λήψη αίματος, η οποία είναι μια επεμβατική διαδικασία.

Υπάρχουν έξι τουλάχιστον μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης στα ούρα ως δείκτες μέτρησης της δραστηριότητας του CYP1A2, οι οποίοι βασίζονται στις αντιδράσεις απομεθυλίωσης: 1) $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$ (Campbell et al., 1987a), 2) $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17X}$ (Grant et al., 1987), 3) $\frac{17X + 17U}{137X}$ (Butler et al., 1992), 4) $\frac{17X}{137X}$ (Kadlubar et al., 1990), 5) $\frac{AFMU + 1X + 1U + 17X}{137X}$ (Notarianni et al., 1995), 6) $\frac{AFMU + 1X + 1U + 17X + 17U}{137X}$ (Carrillo et al., 2000). Οι διάφοροι μεταβολικοί λόγοι δεν εξαρτώνται από τη συνολική ανάκτηση τους στα ούρα (Grant et al., 1983).

Ο μεταβολικός λόγος $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$ περιλαμβάνει στον αριθμητή τα προϊόντα της 7-απομεθυλίωσης της 17X και στον παρονομαστή το προϊόν της οξειδωσης της 17X. Το 17U δεν εξαρτάται από τη ροή των ούρων σε αντίθεση με την 17X (Kalow, 1985) και ο λόγος αυτός δεν επηρεάζεται από το ρυθμό αποβολής των ούρων, εφόσον δεν περιλαμβάνει ούτε την ίδια την καφεΐνη ούτε κάποια από τις διμεθυλοξανθίνες, αλλά μόνο πολικούς μεταβολίτες, οι οποίοι απεκκρίνονται ταχέως χωρίς να επαναπορροφώνται από τους νεφρούς (Campbell et al., 1987a). Επίσης, επειδή ο λόγος περιλαμβάνει μόνο τελικούς μεταβολίτες της καφεΐνης δεν εξαρτάται από το χρόνο συλλογής του δείγματος, με την προϋπόθεση την πάροδο ικανοποιητικού χρονικού διαστήματος από τη λήψη της καφεΐνης και την λήψη επαρκούς ποσότητας καφεΐνης (Kalow and Tang, 1993). Η συγκέντρωση του 17U στα ούρα παρουσιάζει τη μικρότερη μεταβλητότητα μεταξύ των διαφόρων πληθυσμιακών ομάδων (καπνιστές, μη καπνιστές, χρήστριες αντισυλληπτικών, Campbell et al., 1987a), με αποτέλεσμα να αποτελεί κοινό παρονομαστή του κλάσματος και να κατατάσσει τα άτομα με βάση τις διαφορετικές, σε κάθε περίπτωση, τιμές του αριθμητή. Η εγκυρότητα του μεταβολικού λόγου αποδείχθηκε σε μελέτη συσχέτισης του με τη συστηματική κάθαρση της καφεΐνης ($r=0,91$, Campbell et al., 1987a, $r=0,82$, Kalow and Tang, 1993, $r=0,77$ Tang, Denaro et al., 1996) και με τη δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης ($r=0,74$, Lambert et al., 1990). Ο μεταβολικός αυτός λόγος, η δοκιμασία αναπνοής και η συστηματική κάθαρση της καφεΐνης παρουσιάζουν παρομοίου μεγέθους μεταβλητότητα

μεταξύ των ατόμων (Kalow and Tang, 1993). Ο λόγος $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$ μετράται στα ούρα μετά από 2-6 ώρες από τη λήψη της καφεΐνης (Notarianni et al., 1995; Rasmussen and Broesen, 1996; Nordmark et al., 1999), σε ολονύχτια ούρα (Kalow and Tang, 1993) ή σε ούρα 24ώρου (Campbell et al., 1987a). Ο μεταβολικός αυτός λόγος αποκάλυψε αυξημένη δραστηριότητα του CYP1A2 στους καπνιστές (Kalow and Tang, 1991a; Catteau et al., 1995; Rasmussen and Broesen, 1996), στα παιδιά (Campbell et al., 1987a) και σε άτομα εκτεθειμένα σε πολυβρωμιωμένα διφαινύλια (Lambert et al., 1990) και μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου σε εγκύους (Bologna et al., 1991), και σε γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτικά (Campbell et al., 1987a; Rasmussen and Broesen, 1996).

Ο μεταβολικός λόγος $\frac{AFMU + 1U + 1X}{17X}$ εμφανίζει μεγάλη ποικιλότητα στους ενήλικες (εύρος τιμών: 0,89-25,54, περίπου 29 φορές) (Grant et al., 1983), γεγονός που δικαιολογείται από την εξάρτηση της 17X από τη ροή των ούρων (Sinues et al., 1999). Η συσχέτιση του λόγου με την κάθαρση της καφεΐνης δεν ήταν σημαντική (Denaro et al., 1996) και δεν διέκρινε τους καπνιστές από τους μη καπνιστές (Sinues et al., 1999).

Οι λόγοι $\frac{17X + 17U}{137X}$ (Butler et al., 1992) και $\frac{17X}{137X}$ (Kadlubar et al., 1990) χρησιμοποιήθηκαν βασιζόμενοι στο γεγονός της διαίρεσης του πρωτογενούς μεταβολίτη με τη συγκέντρωση του μητρικού φαρμάκου. Οι περιορισμοί αυτών των λόγων είναι η εξάρτηση τους από το ρυθμό αποβολής των ούρων, μιας και η νεφρική απέκκριση τόσο της καφεΐνης όσο και των διμεθυλοξανθινών επηρεάζεται από τη ροή των ούρων (Tang et al., 1994) και η υποχρεωτική συλλογή των ούρων 4-5 ώρες μετά τη λήψη της καφεΐνης, ώστε να μην μετατραπεί η 17X στους δευτερογενείς μεταβολίτες της. Μόνο με τη χρησιμοποίηση των συγκεκριμένων λόγων διαπιστώθηκε επαγωγή της δραστηριότητας του CYP1A2 από το κάπνισμα και διαφορετική δραστηριότητα του ενζύμου μεταξύ ατόμων (Kalow and Tang, 1991a; Kalow and Tang, 1993), αλλά δεν διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση με τον αριθμό των τσιγάρων στους καπνιστές, σε αντίθεση με τον $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$ (Sinues et al., 1999). Επιπλέον, ο λόγος $\frac{17X + 17U}{137X}$ δεν αποκάλυψε μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 σε γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτικά (Tang et al., 1994) και παρουσίασε μικρότερη από

τον $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$ ή καθόλου σημαντική συσχέτιση με την κάθαρση της καφεΐνης (Tang et al., 1994; Denaro et al., 1996).

Οι λόγοι $\frac{AFMU + 1X + 1U + 17X}{137X}$ και $\frac{AFMU + 1X + 1U + 17X + 17U}{137X}$ χρησιμοποιούν

την 17X και τα προϊόντα της απομεθυλίωσής της προς την καφεΐνη. Ο δεύτερος λόγος εμφάνισε την καλύτερη συσχέτιση με τη συνολική και τη μερική κάθαρση της καφεΐνης προς 17X σε σχέση με τους λόγους $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$, $\frac{17U + 17X}{137X}$, και $\frac{17X}{137X}$ και έδειξε εμφανώς διαφορά μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών (Carrillo et al., 2000), χωρίς όμως να παρουσιάζει συσχέτιση με τον αριθμό των τσιγάρων (Sinues et al., 1999). Μειονέκτημα των λόγων αυτών είναι η εξάρτηση τους από νεφρικούς παράγοντες (Sinues et al., 1999).

Ο μεταβολικός λόγος $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$ σχετίζεται θετικά και με μεγάλη ακρίβεια με

τη δραστηριότητα του CYP1A2 και αρνητικά με τη δραστηριότητα του CYP2A6. Επιπλέον, δεν εξαρτάται από τη δραστηριότητα του CYP2E1 και τη νεφρική κάθαρση της καφεΐνης. Κανένας μεταβολικός λόγος δεν έχει εξάρτηση από τις δραστηριότητες της οξειδάσης της ξανθίνης και της NAT-2. Οι λόγοι $\frac{AFMU + 1U + 1X}{17X}$ και $\frac{AFMU + 1X + 1U + 17X}{137X}$ εμφανίζουν επίσης, μεγάλη συσχέτιση με τη δραστηριότητα του CYP1A2 καθώς και μεγαλύτερη ευαισθησία στις μεταβολές της δραστηριότητας του CYP1A2 από το λόγο $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$.

Παρουσιάζουν όμως μεγάλη εξάρτηση από τη νεφρική κάθαρση της καφεΐνης και της 17X. Η ευαισθησία των υπολοίπων λόγων είναι πολύ μικρότερη. Ο λόγος $\frac{17X}{137X}$ στο πλάσμα και στο σίελο, όταν μετράται σε ένα συγκεκριμένο, μικρής διάρκειας χρονικό διάστημα, έχει μικρή εξάρτηση από τη ροή των ούρων και από τη δράση άλλων ενζύμων και αποτελεί έναν πιο αξιόπιστο δείκτη της δραστηριότητας του CYP1A2.

1.6.2 Μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστικότητας CYP2A6 με τη χρήση καφεΐνης

Το CYP2A6 καταλύει ειδικά την 7- υδροξυλίωση της κουμαρίνης (1,2-βενζοπυρόνη), η οποία είναι μία ευρέως απαντούμενη φυτική ουσία. Περισσότερο από το 95% της 7-υδροξυλιωμένης κουμαρίνης απεκκρίνεται στα ούρα, συνδεδεμένη με γλυκουρονικό οξύ

μέσα σε 4 ώρες, με μεγάλη ποικιλότητα μεταξύ των ατόμων και χωρίς διαφορές ανάμεσα στα δυο φύλα. Επομένως, η κουμαρίνη αποτελεί το κύριο υπόστρωμα για την εκτίμηση της μεταβολικής ικανότητας του CYP2A6 του ανθρώπου *in vivo* (Pasanen et al., 1997; Oscarson, 2001).

Το CYP2A6 καταλύει επίσης και την 8-υδροξυλίωση της 17X προς 17U με μικρή συμμετοχή του CYP1A2 (Gu et al., 1992). Σε μικρές συγκεντρώσεις 17X (0,1 mM), όμως, το CYP2A6 συμμετέχει εξ'ολοκλήρου στην παραπάνω αντίδραση (Nowell et al., 2002), με αποτέλεσμα η καφεΐνη να αποτελεί εναλλακτικό υπόστρωμα για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP2A6 *in vivo*.

Με δεδομένο την υδροξυλίωση της 17X, έχουν προταθεί τρεις μεταβολικοί λόγοι για τη μέτρηση της δραστηριότητας του CYP2A6: α) ο λόγος 17U/17X (Grant et al., 1983; Nowell et al., 2002), β) ο λόγος 17U/ (17U+17X+1X+1U+7X+7U+AFMU+AAMU), ο οποίος εκφράζει την 8- υδροξυλίωση της 17X ως το ποσοστό της παραγωγής 17U σε σχέση με τη συνολική ποσότητα των μεταβολιτών της οδού της N-3 απομεθυλίωσης της καφεΐνης στα ούρα (Rodopoulos et al., 1995) και γ) ο λόγος 17U/(AFMU+1U+1X+17U+17X), ο οποίος εκφράζει την 8- υδροξυλίωση της 17X ως το ποσοστό της παραγωγής 17U σε σχέση με τη συνολική ποσότητα των μεταβολιτών της οδού της παραξανθίνης (17X) στα ούρα (Bologna et al., 1991). Εντούτοις, οι δύο τελευταίοι λόγοι είναι δυνατόν να επηρεάζονται από τη δραστηριότητα του CYP1A2 καθώς ο αριθμητής είναι ίδιος με τον παρονομαστή του λόγου $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$ και ο παρονομαστής περιέχει όλους τους όρους του αριθμητή του λόγου που εκφράζει τη δραστηριότητα του CYP1A2. Πράγματι, σε μια μελέτη 26 υγιών ατόμων διαπιστώθηκε αρνητική συσχέτιση των τιμών του λόγου 17U/(AFMU+1U+1X+17U+17X) με τις τιμές του λόγου $\frac{AFMU + 1X + 1U}{17U}$ (Krull and Hageman 1998). Ο λόγος 17U/17X ανταποκρίνεται καλύτερα στο μοντέλο "μεταβολίτης-φάρμακο".

1.6.3 Μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστηριότητας της οξειδάσης της ξανθίνης με τη χρήση καφεΐνης

Η δραστηριότητα της XO στο ήπαρ έχει προσδιοριστεί με φασματοφωτομετρικό ή ραδιοχημικό προσδιορισμό του σχηματιζόμενου ουρικού οξέος, μετά από επώαση ομογενοποιημένου ηπατικού ιστού παρουσία ξανθίνης (Guerciolini et al., 1991; Stirpe et al.,

2002). Οι συγκεκριμένοι μέθοδοι όμως, έχουν ερευνητικό χαρακτήρα και δεν μπορούν να εφαρμοστούν εύκολα για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της ΧΟ *in vivo*. Ο μη επεμβατικός προσδιορισμός της δραστηριότητας της ΧΟ *in vivo* επιτυγχάνεται με τη χρήση της καφεΐνης ως υποστρώματος, μιας και η ΧΟ καταλύει τη μετατροπή της 1Χ σε 1U.

Με βάση τη μετατροπή της 1Χ σε 1U, έχουν προταθεί δύο μεταβολικοί λόγοι ως δείκτες της δραστηριότητας της ΧΟ: α) ο λόγος 1U/1Χ (Grant et al., 1983) και β) ο λόγος 1U/(1U+1Χ) (Kalow and Tang, 1991b). Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός και των δυο μεταβολικών λόγων σε μία μελέτη 342 υγιών ατόμων, με το δεύτερο να παρουσιάζει μικρότερη μεταβλητότητα στο συνολικό πληθυσμό (CV=18%) σε σχέση με τον πρώτο (CV=58%) (Relling et al., 1992). Επιπρόσθετα, ο δεύτερος λόγος παρουσίασε μικρότερη μέση μεταβλητότητα εντός του ίδιου ατόμου, σε διάστημα 3 μηνών, σε σύγκριση με τον πρώτο, σε έναν πληθυσμό 20 υγιών ατόμων (Kashuba et al., 1998).

1.6.4 Μέθοδοι για την εκτίμηση της δραστηριότητας της NAT-2 με τη χρήση καφεΐνης

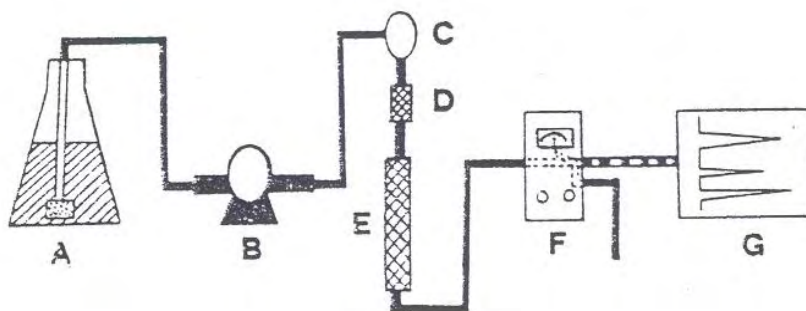
Η ισονιαζίδη αποτέλεσε το πρώτο φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της δραστηριότητας της NAT-2 χωρίς όμως διάκριση των φαινοτύπων (Evans et al., 1960). Στη συνέχεια, πολλά άλλα φάρμακα δοκιμάστηκαν για τον προσδιορισμό του φαινοτύπου όπως η δαψόνη (Peters et al., 1972) και η καφεΐνη (Grant et al., 1983).

Ως δείκτες της δραστηριότητας της NAT-2 έχουν προταθεί διάφοροι μεταβολικοί της καφεΐνης στα ούρα: α) ο λόγος AFMU/(AFMU+1U+1Χ+17U+17Χ), ο οποίος εκφράζει την παραγωγή του AFMU ως ποσοστό όλων των μεταβολιτών της οδού της 3-απομεθυλίωσης της καφεΐνης και διαχωρίζει τον πληθυσμό σε δύο ομάδες των βραδέων και των ταχέων ακετυλιωτών (Grant et al., 1983), β) ο λόγος AFMU/1Χ, που αποτελεί απλοποίηση του πρώτου λόγου και διέκρινε τους βραδείς από τους ταχείς ακετυλιωτές (Grant et al., 1983) και γ) ο λόγος AFMU/(AFMU+1U+1Χ) (Grant et al., 1984). Ο λόγος AFMU/(AFMU+1U+1Χ) προσδιορίζει το φαινότυπο της NAT-2 καλύτερα από τους υπόλοιπους λόγους (Tang et al., 1991) ακόμη και στα άτομα με ηπατική ή άλλη νόσο (Kalow and Tang 1993; Bendriss et al. 1998). Επιπλέον, ο συγκεκριμένος λόγος είναι ο πιο αξιόπιστος καθώς φαίνεται να επηρεάζεται λιγότερο από τη δράση άλλων παραγόντων, όπως για παράδειγμα από τη δράση της ΧΟ ή του CYP1A2 (Rostami-Hodjegan et al., 1996).

1.7 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ (RP-HPLC)

Η χρωματογραφία είναι φυσικοχημική μέθοδος διαχωρισμού ουσιών, απομόνωσης μιας ουσίας, προσδιορισμού της συγκέντρωσης και υπολογισμού του μοριακού βάρους διαφόρων ουσιών. Βασίζεται στο φαινόμενο ότι διαφορετικά μόρια, μέσα σε κατάλληλο σύστημα υλικού, μετακινούνται κατά διαφορετικό τρόπο και διελαύνουν το σύστημα με διαφορετικές ταχύτητες. Ένα τυπικό σύστημα χρωματογραφίας αποτελείται από τη στερεά ακίνητη φάση, που είναι το μόνιμο υλικό και από την κινητή φάση, που είναι ο διερχόμενος διαλύτης. Οι μέθοδοι χρωματογραφίας διακρίνονται ανάλογα του συστήματος διάταξης και του φαινομένου που αξιοποιείται. Ως προς το σύστημα διάταξης, διακρίνονται σε χρωματογραφία στήλης, υψηλής απόδοσης, χάρτου, λεπτής στιβάδας και αεριοχρωματογραφία. Ως προς το φαινόμενο που αξιοποιείται, διακρίνονται σε χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, ανταλλαγής ιόντων και μοριακής διήθησης (Alberts et al., 1998).

Στη μελέτη μας χρησιμοποιούμε την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (RP-HPLC), η οποία έχει τις περισσότερες εφαρμογές, διότι είναι συντομότερη και πιο ευαίσθητη από τις άλλες. Χαρακτηριστικό της είναι η υπό πίεση διέλευση της κινητής φάσης, η οποία συμπαρασύρει το δείγμα μέσα από τη στήλη διαχωρίζοντας το στα διάφορα συστατικά του. Τα διάφορα συστατικά του μίγματος σχηματίζουν ζώνες κατά μήκος της στήλης και εξέρχονται από αυτή ανάλογα με την πολικότητα τους σε σχέση με την κινητή φάση με διαφορετικές ταχύτητες σε διαφορετικούς χρόνους. Η ανίχνευση των μορίων κατά την έξοδο τους, γίνεται με σύστημα μέτρησης της απορρόφησης του εξερχόμενου διαλύματος. Η διάταξη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης αποτελείται από το εκλουστικό σύστημα (κινητή φάση), την αντλία, τη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος, το οποίο εισάγεται με μικροσύριγγα, την προστήλη, την κύρια στήλη και τον ανιχνευτή, ο οποίος μπορεί να ανιχνεύει τα κλάσματα που φθάνουν στην κυψελίδα συνεχούς ροής και συνδέεται με υπολογιστή ή με καταγραφικό σύστημα, το οποίο πρέπει να διαθέτει ολοκληρωτή (εικόνα 3). Το σπουδαιότερο μέρος μιας χρωματογραφικής διάταξης είναι η στήλη, η οποία πρέπει να είναι υψηλής πιστότητας (Παπαδημητρίου, 1998).



Εικόνα 3. Διάγραμμα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (RP-HPLC). A:εκλουστικό σύστημα, B:αντλία, C:βαλβίδα εισαγωγής δείγματος, D:προστήλη, E:κύρια στήλη, F:ανιχνευτής και G:καταγραφικό.

1.8 ΕΜΜΗΝΟΡΡΥΣΙΑΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Ο εμμηνορρυσιακός κύκλος είναι το διάστημα που μεσολαβεί από την πρώτη ημέρα της εμμήνου ρύσεως μέχρι την πρώτη ημέρα της επόμενης εμμήνου ρύσεως. Η συνήθης διάρκεια του είναι 28 ± 3 ημέρες, αλλά μπορεί να ποικίλει από γυναίκα σε γυναίκα και από κύκλο σε κύκλο. Για παράδειγμα και ο κύκλος των 22 και των 38 ημερών συνήθως είναι φυσιολογικός. Οι αναπαραγωγικοί κύκλοι αρχίζουν στην ήβη (μέσος όρος ηλικίας 10-14 έτη) και συνεχίζονται έως την εμμηνόπαυση (μέσος όρος ηλικίας 45-50 έτη). Ο εμμηνορρυσιακός κύκλος διαιρείται σε δυο φάσεις: 1) την ωοθυλακική (παραγωγική) φάση και 2) την ωχρινική (εκκριτική) φάση. Η παραγωγική φάση του κύκλου αρχίζει από την πρώτη ημέρα της εμμήνου ρύσεως και διαρκεί μέχρι την ωοθυλακιορρηξία. Η εκκριτική φάση αρχίζει αμέσως μετά την ωοθυλακιορρηξία και διαρκεί μέχρι την επόμενη εμμηνορρυσία.

Η έμμηνη ρύση αποτελεί το τέλος του εμμηνορρυσιακού κύκλου και ειδικότερα το τέλος των βιολογικών διεργασιών, που προπαρασκευάζουν το ενδομήτριο για την υποδοχή και την εγκατάσταση του κυήματος. Οι διεργασίες αυτές διακόπτονται, όταν δεν επέρχεται γονιμοποίηση του ωαρίου ή δεν ελευθερώνεται το ωάριο από το ωοθυλάκιο (ανωοτοκικός κύκλος). Όμως για πρακτικούς λόγους, η εμμηνορρυσία τοποθετείται στην αρχή του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Στην περίπτωση αυτή η πρώτη ημέρα της εμμηνορρυσίας ταυτίζεται με την πρώτη ημέρα του κύκλου. Η πρόκληση της εμμηνορρυσίας οφείλεται στην αιφνίδια πτώση του επιπέδου των οιστρογόνων στην αιματική κυκλοφορία. Η πτώση αυτή για να είναι αποτελεσματική πρέπει να είναι αρκετά σημαντική, και μάλιστα κάτω από

ορισμένα κρίσιμα επίπεδα ή ορμονικό ουδό. Η μέση διάρκεια της εμμηνορρυσίας είναι 4-5 ημέρες με εύρος διακύμανσης 2-3 περίπου ημέρες.

Οι φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου εμφανίζουν διακυμάνσεις στη διάρκεια τους, εφόσον εξαρτώνται από το χρόνο απελευθέρωσης της ωοθυλακιορρηξίας, που ως αστάθμητος παράγοντας ποικίλει από κύκλο σε κύκλο. Έτσι, η συνηθισμένη διάρκεια των 14 ημερών κάθε φάσης των φυσιολογικών εμμηνορρυσιακών κύκλων (28 ± 3 ημερών) μπορεί να ποικίλει μεταξύ 7 και 21 ημερών για την παραγωγική φάση. Στην ολιγομηνόρροια (ωοτοκικοί εμμηνορρυσιακοί κύκλοι μεγάλης διάρκειας) οι μεγαλύτερες αποκλίσεις αναφέρονται στην παραγωγική φάση. Έτσι, σε κύκλους διάρκειας 40-45 ημερών η παραγωγική φάση μπορεί να εμφανίσει διάρκεια 24-35 ημερών, ενώ η μέση διάρκεια της εκκριτικής φάσης παραμένει στις 14 ημέρες.

Στις διάφορες φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου γίνονται διάφορες οργανικές και λειτουργικές αλλαγές ή διαφοροποιήσεις σε πολλά όργανα και ιστούς. Οι σπουδαιότεροι υποδοχείς των ενδοκρινών επιδράσεων είναι οι ωοθήκες και το ενδομήτριο, αλλά οι επερχόμενες στα όργανα αυτά αλλαγές δε συμπίπτουν χρονικά κατ' απόλυτη έννοια (Καλογερόπουλος Α., 1996α).

1.8.1 Ορμόνες του εμμηνορρυσιακού κύκλου

Στη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου εκκρίνονται ορμόνες από τον υποθάλαμο, την υπόφυση και τις ωοθήκες που προκαλούν την ωρίμανση και τελικά την απελευθέρωση του ωαρίου από την ωοθήκη. Οι ορμόνες αυτές εμφανίζουν μια αρμονικά αλληλορυθμιζόμενη σχέση μεταξύ τους, με σκοπό τη δημιουργία του κατάλληλου περιβάλλοντος για να ευοδωθεί η σύλληψη. Η αναπαραγωγική λειτουργία ρυθμίζεται μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού ορμονικών ισορροπιών. Κατά τη φυσιολογική λειτουργία του εμμηνορρυσιακού κύκλου υπάρχει μια ενδοκρινική αλληλεπίδραση στον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες, με μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορύθμισης. Η υπόφυση τελεί υπό τον έλεγχο του υποθαλάμου. Αντιστρόφως, η έκκριση ορμονών από την υπόφυση και τον υποθάλαμο επηρεάζεται από τα επίπεδα των ορμονών των ωοθηκών.

Στη γυναίκα όπως και στον άνδρα, η λειτουργία των γονάδων ρυθμίζεται από τον εγκέφαλο και πιο συγκεκριμένα από μια περιοχή του που ονομάζεται υποθάλαμος. Ο υποθάλαμος εκκρίνει την ορμόνη απελευθέρωσης των γοναδοτροπινών (GnRH,

gonadotropin-releasing hormone). Με τη σειρά της, η GnRH μεταφέρεται μέσω του υποφυσιακού πυλαίου συστήματος σε έναν μικρό αδένα που βρίσκεται κάτω από τον εγκέφαλο, την υπόφυση. Η υπόφυση εκκρίνει ορμόνες για τη ρύθμιση της λειτουργίας του θυρεοειδούς αδένα, των επινεφριδίων, των γονάδων και επίσης αυξητική ορμόνη και προλακτίνη. Οι πιο σημαντικές για την αναπαραγωγή ορμόνες, που παράγονται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης είναι οι γοναδοτρόπες ή γοναδοτροπίνες και η προλακτίνη (εικ. 4). Οι γοναδοτρόπες ορμόνες είναι η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH, follicle-stimulating hormone), και η ωχρινοποιητική ή ωχρινοτρόπος ορμόνη (LH, luteinizing hormone).

Η GnRH παράγεται στον υποθάλαμο κατά ώσεις και σε τακτά χρονικά διαστήματα, αλλά η επίδραση των υποθαλαμικών κέντρων στην υπόφυση διαφέρει ως προς τον ρυθμό στον άνδρα και στη γυναίκα. Στον άνδρα παρατηρείται μία βασική, τονική και συνεχής έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών που διατηρεί τη σπερματογένεση, ενώ στη γυναίκα εκτός από τη βασική έκκριση παρατηρείται και μια περιοδική αιχμιακή έκκριση των γοναδοτρόπων που προκαλεί την ωοθυλακιόρρηξια σε τακτά χρονικά διαστήματα κατά την αναπαραγωγική ηλικία.

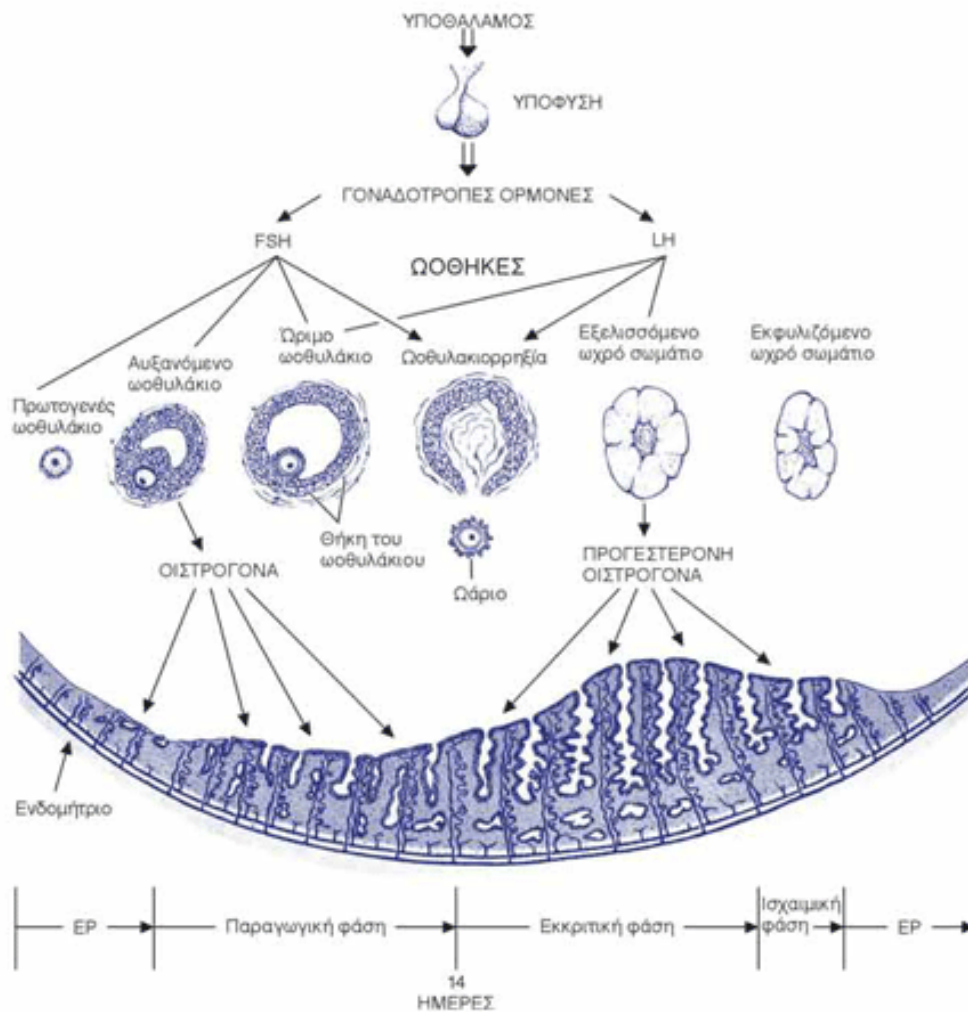
Η έναρξη του εμμηνορρυσιακού κύκλου οφείλεται μόνο στην επίδραση της FSH. Η FSH προάγει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και συνδέεται αποκλειστικά με τα κοκκώδη κύτταρα που παράγουν οιστρογόνα (εικόνα 4). Τα οιστρογόνα προκαλούν αύξηση των υποδοχέων της FSH στα ίδια τα κοκκώδη κύτταρα που τα παράγουν. Κατά τον ίδιο χρόνο, η FSH διεγείρει την ανάπτυξη των υποδοχέων της LH στα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα της έσω θήκης του ωοθυλακίου. Η πυκνότητα της FSH στην αναπαραγωγική ηλικία κυμαίνεται μεταξύ 5 και 15 mIU/ml , ενώ εμφανίζονται αυξημένες τιμές στο μέσο του κύκλου (πίνακας 4). Στην εγκυμοσύνη, οι τιμές της FSH είναι μικρές, λόγω της ελαττωμένης υποφυσιακής λειτουργίας, ενώ στην εμμηνόπαυση παρατηρούνται εξαιρετικά αυξημένες τιμές.

Η LH προάγει τη στεροειδογένεση στην ωοθήκη και είναι υπεύθυνη για την τελική ωρίμανση του ωαρίου, την ωοθυλακιόρρηξια, την έναρξη και τη συνέχιση της λειτουργίας του ωχρού σωματίου (εικόνα 4). Η έκκριση της LH, ενώ βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα σε όλη τη διάρκεια του κύκλου, εμφανίζει μια μεγάλη και αιφνίδια εκκριτική αιχμή στο μέσο του κύκλου. Στην αναπαραγωγική ηλικία τα επίπεδα της στο αίμα κυμαίνονται μεταξύ 5 και 10

mIU/ml, ενώ στο μέσο του κύκλου και αντίστοιχα προς την ωοθυλακιορρηξία εμφανίζεται η παραπάνω αιχμιακή ανύψωση που φθάνει τα 80 mIU/ml (πίνακας 4).

Κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου τα οιστρογόνα παράγονται από τα πρωτογενή ωοθυλάκια κατά την ωρίμανση τους και το ωχρό σωματίο. Βασικός ρόλος τους είναι η πάχυνση του ενδομητρίου. Στην αρχή του κύκλου τα οιστρογόνα αρχίζουν και παράγονται υπό την επίδραση της FSH. Το επίπεδο των οιστρογόνων στον οργανισμό αυξάνεται στο μέσο της παραγωγικής φάσης και τελικά προκαλεί με την FSH την ταχεία αύξηση της LH. Στην εκκριτική φάση τα οιστρογόνα παράγονται σε μικρότερη ποσότητα μαζί με την προγεστερόνη από το ωχρό σωματίο. Σε περίπτωση που δεν γονιμοποιηθεί το ωάριο, τα επίπεδα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης μειώνονται, επειδή δεν είναι πλέον απαραίτητα. Στην αναπαραγωγική ηλικία, η οιστραδιόλη κυμαίνεται στα 25-100pg/ml στην παραγωγική φάση, 120-400pg/ml στην μεσοκυκλική αιχμή και 50-250pg/ml στην εκκριτική φάση. Τα επίπεδα των οιστρογόνων αυξάνονται κατά πολύ στην εγκυμοσύνη >1000pg/ml, ενώ στην εμμηνόπαυση σταματούν να παράγονται από τις ωοθήκες και είναι <15pg/ml (πίνακας 4).

Η προγεστερόνη (PRG) παράγεται από το ωχρό σωματίο στην εκκριτική φάση και φτάνει στο μέγιστο της παραγωγής της στα μέσα της εκκριτικής φάσης. Σε συνδυασμό με τα οιστρογόνα, η προγεστερόνη προετοιμάζει και σταθεροποιεί το ενδομήτριο για να υποδεχθεί και να θρέψει το έμβρυο. Σε περίπτωση κύησης το ωχρό σωματίο συνεχίζει να παράγει μεγάλες ποσότητες προγεστερόνης και τέλος η παραγωγή της αυξάνεται ακόμη περισσότερο από τον πλακούντα. Τα επίπεδα της προγεστερόνης είναι <1ng/ml στην παραγωγική φάση, 2-3ng/ml στο μέσο του κύκλου και 10-20ng/ml στην εκκριτική φάση (πίνακας 4) (Καλογερόπουλος Α.,1992).



Εικόνα 4. Η σχέση υποθαλάμου–υπόφυσης–ωοθήκης και η επίδραση των ωοθηκικών ορμονών στο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου (Λαϊνάς Τ., 2006).

Πίνακας 4. Ορμονικά επίπεδα FSH, LH, οιστραδιόλης και προγεστερόνης στην αναπαραγωγική ηλικία, στην εγκυμοσύνη και μετά την εμμηνόπαυση (Καλογερόπουλος Α., 1996β).

Φάσεις ζωής	FSH ορού (mIU/ml)	LH ορού (mIU/ml)	Οιστραδιόλη ορού (pg/ml)	Προγεστερόνη ορού (ng/ml)
Αναπαραγωγική ηλικία				
Ωοθυλακική φάση	5-15	5-10	25-100	<1
Ωοθυλακιορρηξία	10-25	15-80	120-400	2-3
Ωχρινική φάση	1-10	1-12	50-250	10-20
Εγκυμοσύνη			>1000	100-300
Εμμηνόπαυση	40-160	15-75	<15	<1

1.8.2 Ωοθηκικός κύκλος

Στις ωοθήκες συντελείται η αποθήκευση, η ωρίμανση και η απελευθέρωση των ωαρίων κατά την ωοθυλακιορρηξία. Ταυτόχρονα εμφανίζεται και η ενδοκρινής λειτουργία των ωοθηκών με έκκριση ορμονών (κυρίως οιστρογόνα και προγεστερόνη). Οι δύο αυτές λειτουργίες (αναπαραγωγική και ενδοκρινής) δεν είναι ανεξάρτητες, αλλά συνδέονται άμεσα μεταξύ τους. Οι ωοθήκες λειτουργούν ως ενδοκρινείς αδένες υπό την επίδραση των υποφυσιακών ορμονών, της FSH και της LH και παράγουν κυρίως οιστρογόνα. Παράλληλα, η ωοθήκη είναι και μια δεξαμενή ωοθυλακίων, τα οποία βρίσκονται σε διάφορα στάδια ωρίμανσης (αρχέγονα, πρωτογενή, δευτερογενή). Έχει περιγραφεί (Gougeon et al., 1986) ότι ενώ κατά τη γέννηση ο αριθμός των ωοθυλακίων είναι περίπου 2 εκατομμύρια, στην αρχή της ήβης απομένουν περί τις 300-400 χιλιάδες. Στην ηλικία των 38 ετών ο αριθμός ωοθυλακίων εκτιμάται στις 25.000 και στην εμμηνόπαυση περίπου σε 1.000.

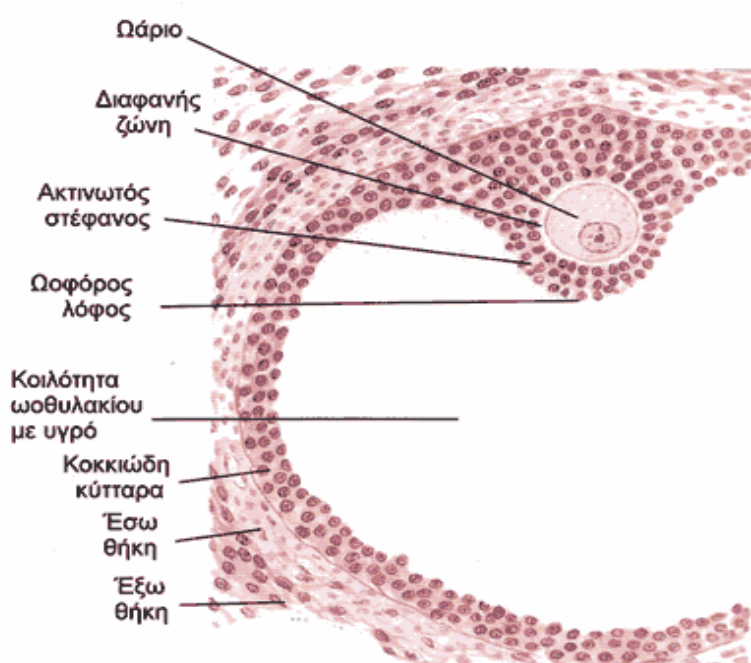
Από αυτά, κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας της γυναίκας το πολύ 400 θα εξελιχθούν σε κυρίαρχα ωοθυλάκια, που κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης του κύκλου θα μεγαλώσουν προοδευτικά και θα ραγούν (ωοθυλακιορρηξία). Με την ωοθυλακιορρηξία θα απελευθερωθεί το ωάριο, το οποίο εάν γονιμοποιηθεί θα εξελιχθεί σε έμβρυο. Μετά την ωοθυλακιορρηξία, το ωοθυλάκιο θα μετατραπεί σε ωχρο σωματίο, το οποίο παράγει κυρίως προγεστερόνη. Το ωχρο σωματίο διατηρείται επί 14 ημέρες και μετατρέπεται σε λευκό σωματίο, εκτός αν επιτευχθεί εγκυμοσύνη, οπότε μετατρέπεται σε ωχρο σωματίο της κύησης. Υπό την επίδραση των ορμονικών διεγέρσεων, η ωοθήκη εμφανίζει κυκλικές αλλαγές που έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του ωοθυλακίου και την ωρίμανση του ωαρίου, την ωοθυλακιορρηξία και τον σχηματισμό ωχρού σωματίου. Ο ωοθηκικός κύκλος περιλαμβάνει τρεις φάσεις: την παραγωγική (ωοθυλακική) φάση, την ωοθυλακιορρηξία και την ωχρινική φάση.

Η παραγωγική φάση του κύκλου διαρκεί από την εμφάνιση της εμμήνου ρύσεως μέχρι την ωοθυλακιορρηξία. Η διάρκειά της δεν είναι σταθερή. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη του κυρίαρχου ωοθυλακίου μέχρι το στάδιο του προωορρηκτικού, την περαιτέρω ωρίμανση του ωαρίου και την παραγωγή 17-β οιστραδιόλης.

Στην αρχή του κύκλου, ίσως και 1-2 ημέρες πριν το τέλος του προηγούμενου, παρατηρείται αύξηση της FSH για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, το οποίο ονομάζεται "παράθυρο της FSH". Η αυξημένη αυτή έκκριση ωθεί μία ομάδα δευτερογενών

ωοθυλακίων, σε πιο προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης. Η επιλογή του ωοθυλακίου που θα φτάσει σε πλήρη ανάπτυξη και ωοθυλακιορρηξία γίνεται την 5η-7η ημέρα του κύκλου. Το δευτερογενές αυτό ωοθυλάκιο ονομάζεται κυρίαρχο ωοθυλάκιο. Τα λιγότερο ανεπτυγμένα ωοθυλάκια υποστρέφουν και εκφυλίζονται (ατρησία).

Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο αυξάνει γρήγορα και η διάμετρός του εγγίζει τα 20 mm. Αυτή η υπέρμετρη αύξηση οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη συσσώρευση ωοθυλακικού υγρού στην κοιλότητα του άντρου. Το ωοθυλάκιο το οποίο αναπτυσσόμενο θα φτάσει σε προωρρηκτικό στάδιο (ονομάζεται σε αυτή τη φάση και γραφιανό) είναι ένας κυστικός σχηματισμός στην επιφάνεια της ωοθήκης που αποτελείται από το ωάριο με τη διαφανή ζώνη που το περιβάλλει, τα κοκκιώδη κύτταρα, το άντρο του ωοθυλακίου που περιέχει το ωοθυλακικό υγρό, τη βασική μεμβράνη και τα κύτταρα της θήκης (εικόνα 5).



Εικόνα 5. Το ώριμο (γραφιανό) ωοθυλάκιο (Λαϊνάς Τ., 2006).

Ο μηχανισμός επιλογής του κυρίαρχου ωοθυλακίου από την ομάδα των δευτερογενών ωοθυλακίων που δέχονται την αυξημένη δράση της FSH δεν είναι ακριβώς γνωστός. Μετά την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου, τα παραγόμενα οιστρογόνα προέρχονται από αυτό. Τα κοκκιώδη κύτταρα διογκώνονται και παράγουν αυξημένες ποσότητες 17-β οιστραδιόλης που φθάνει στη μέγιστη τιμή της 24-36 ώρες πριν την ωοθυλακιορρηξία. Στο ωάριο, η διεργασία της μειωτικής διαίρεσης φθάνει προς το τέλος της. Σ' αυτή τη φάση, η FSH με τη συνέργεια των οιστρογόνων προάγει τη σύνθεση

υποδοχέων της LH στα κοκκιώδη κύτταρα. Η αύξηση των οιστρογόνων προκαλεί παράλληλα αύξηση των υποδοχέων της GnRH στην υπόφυση με σκοπό την έκκριση LH. Η απότομη αιχμή της LH είναι αποτέλεσμα της θετικής παλίνδρομης αλληλορύθμισης των οιστρογόνων στην υπόφυση. Το μεσοκυκλικό αυτό κύμα της LH διαρκεί περίπου 48 ώρες και προκαλεί την ωοθυλακιορρηξία περίπου 36 ώρες μετά την έναρξη του μεσοκυκλικού κύματος. Όταν το ωοθυλάκιο συμπληρώσει την ανάπτυξή του, το τοίχωμά του στην επιφάνεια της ωοθήκης καθίσταται λεπτό και ρήγνυται.

Ωοθυλακιορρηξία ονομάζουμε τη ρήξη του ωοθυλακίου και την απελευθέρωση του ωαρίου. Με την ωοθυλακιορρηξία συντελείται η απελευθέρωση του ώριμου ωαρίου από το γραφιανό ωοθυλάκιο. Υπό την επίδραση της αιχμής του μεσοκυκλικού κύματος της LH το ώριμο ωοθυλάκιο εκδηλώνει πολλαπλές σημαντικές αλλαγές, οι οποίες οδηγούν στην ωρίμανση του ωαρίου, στη λέπτυνση του τοιχώματος και ακολούθως στη ρήξη του ωοθυλακίου στην επιφάνεια της ωοθήκης. Η ρήξη του ωοθυλακίου επιτυγχάνεται κυρίως με τη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων όπως η κολλαγονάση και η πλασμίνη, τα οποία βρίσκονται στο ωοθυλακικό υγρό και ενεργοποιούνται από τη δράση της LH και της προγεστερόνης.

Η δεύτερη φάση του κύκλου, η οποία ονομάζεται και ωχρινική, αποτελεί το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την ωοθυλακιορρηξία μέχρι την εμφάνιση της εμμήνου ρύσεως. Η ωχρινική φάση χαρακτηρίζεται από τη λειτουργία του ωχρού σωματίου και την έκκριση κυρίως προγεστερόνης. Έχει σταθερή διάρκεια 14 ± 2 ημέρες. Μετά την ωοθυλακιορρηξία και την απελευθέρωση του ωαρίου ο σχηματισμός του ωοθυλακίου παραμένει, τα κύτταρα καλύπτονται από κιτρινωπό υλικό και το υπόλειμμα αυτό ονομάζεται ωχρό σωματίο. Τα κύτταρα του ωχρού σωματίου εκκρίνουν κυρίως σε μεγάλες ποσότητες την ορμόνη προγεστερόνη (PRG), αλλά και σε μικρότερες ποσότητες 17-β οιστραδιόλη και ανδροστενδιόνη ($\Delta 4A$). Οκτώ ημέρες μετά την ωοθυλακιορρηξία, το ωχρό σωματίο φθάνει στην πλήρη ωριμότητά του και στη μέγιστη ημερήσια παραγωγή προγεστερόνης, ενώ σταδιακά παρατηρείται προοδευτική έκπτωση της λειτουργίας του. Η λειτουργία του ωχρού σωματίου υποστηρίζεται από τη δράση της LH. Η ζωή του ωχρού σωματίου διαρκεί 14 ± 2 ημέρες, στη συνέχεια αυτό εκφυλίζεται και μετατρέπεται σε ανάγγειο ουλώδη ιστό, το λευκό σωματίο.

Σε περίπτωση εγκυμοσύνης, η λειτουργία του ωχρού σωματίου παρατείνεται μέχρι την 12η περίπου εβδομάδα της κύησης, λόγω της υποστήριξης της λειτουργίας του από τη

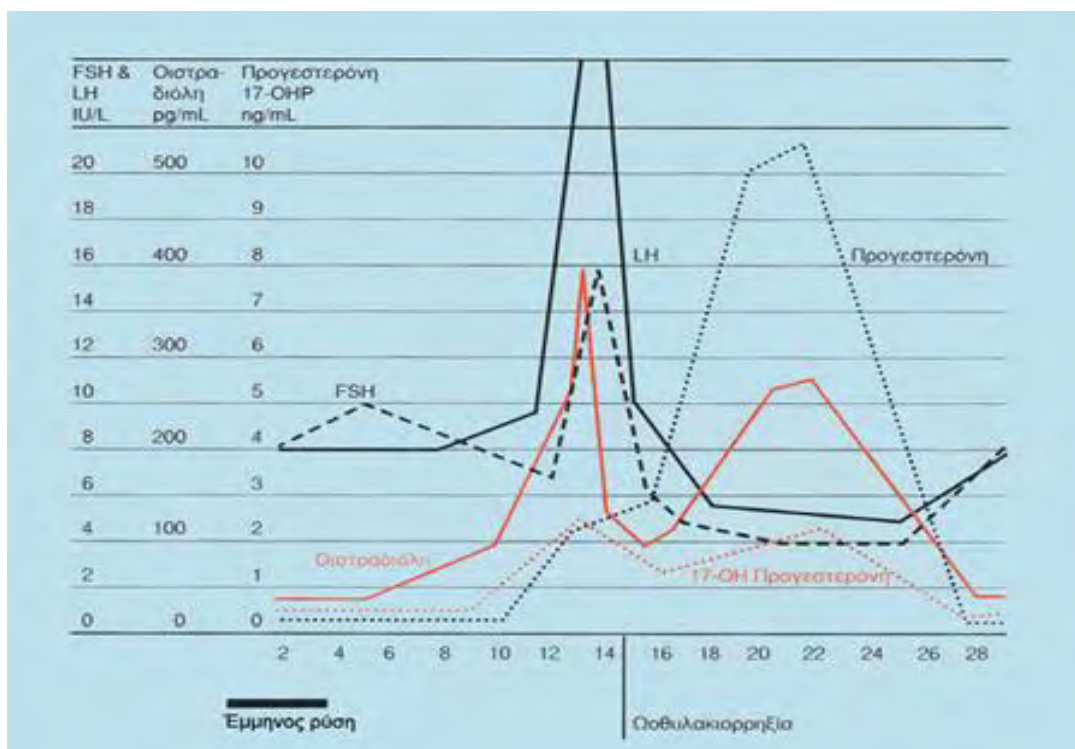
χοριακή γοναδοτροπίνη που παράγεται από την τροφοβλάστη (υποτυπώδη πλακούντα) του εμβρύου. Η δράση της χοριακής γοναδοτροπίνης είναι παρόμοια με τη δράση της LH και έτσι η ζωή του ωχρού σωματίου παρατείνεται με έκκριση προγεστερόνης κυρίως αλλά και οιστρογόνων, που υποστηρίζουν τα αρχικά στάδια της κύησης μέχρις ότου ο πλακούντας αναλάβει την παραγωγή ορμονών (Λαϊνάς Τ., 2006).

Αναλυτικά οι διακυμάνσεις των ορμονών στις διάφορες φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου απεικονίζονται στην εικόνα 6. Συνοπτικά, η FSH παρουσιάζει μια μικρή αύξηση στην αρχή του κύκλου και τη μεγαλύτερη αύξηση της στο μέσο του κύκλου. Η LH αρχίζει να αυξάνεται στην ωοθυλακική φάση περίπου 2 ημέρες πριν την ωοθυλακιόρρηξη φτάνοντας στην μεσοκυκλική αιχμή της περίπου 12-24 ώρες πριν την ωοθυλακιόρρηξη και έπειτα αρχίζει να μειώνεται. Η προγεστερόνη αρχίζει να αυξάνεται στη ωχρινική φάση, παρουσιάζοντας τη μέγιστη τιμή της στο μέσο της ωχρινικής φάσης. Τα οιστρογόνα εμφανίζουν δυο κύματα αύξησης, το πρώτο και μεγαλύτερο παρατηρείται στα μέσα του κύκλου με αιχμή 24-36 ώρες πριν την ωοθυλακιόρρηξη και το δεύτερο μικρότερο στην εκκριτική φάση.

1.8.3 Ενδομητρικός κύκλος

Στο ενδομήτριο, κατά τη διάρκεια του κύκλου, υπό την επίδραση της κυκλικής έκκρισης των ωοθηκικών ορμονών, συμβαίνουν μορφολογικά και βιοχημικά γεγονότα. Τα μορφολογικά περιλαμβάνουν αλλαγές στα αδενικά κύτταρα, στα κύτταρα του στρώματος και στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία οδηγούν κατά την παραγωγική φάση στην υπερτροφία του ενδομητρίου (βλεννογόνου της μήτρας).

Τα βιοχημικά γεγονότα περιλαμβάνουν τη δημιουργία υποδοχέων για στεροειδείς και πρωτεϊνικές ορμόνες, την παραγωγή ενζύμων και ενζυμικών αναστολέων, τη δράση αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών, ιντερλευκινών, ιντερφερόνης- γ , TNF- α , προλακτίνης, ρελαξίνης κ.λπ. Διακρίνουμε τρεις φάσεις του κύκλου, που προκαλούνται από την κυκλική επίδραση των ωοθηκικών ορμονών στη δομή του αναπαραγωγικού συστήματος: 1) την εμμηνορρυσιακή φάση, 2) την παραγωγική φάση και την 3) εκκριτική φάση.



Εικόνα 6. Η διακύμανση των ορμονών FSH, LH, E2, PRG, στη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου (Speroff et al., 1994).

Στην εμμηνορρυσιακή φάση, που διαρκεί συνήθως 3-5 ημέρες, μαζί με το αίμα αποπίπτει και η λειτουργική στοιβάδα του ενδομητρίου. Στο τέλος της εμμήνου ρύσεως το ενδομήτριο είναι λεπτό και ισχαιμικό. Συγκεκριμένα, το καλυπτικό επιθήλιο στην αρχή είναι χαμηλό με κύτταρα κυλινδρικά, οι αδένες είναι βραχείς, ευθείς και στενοί και το στρώμα είναι συμπυκνωμένο.

Στην παραγωγική φάση το καλυπτικό επιθήλιο προοδευτικά αυξάνει και γίνεται υψηλότερο και οι αδένες βαθύτεροι, ευρύτεροι με ελικοειδή πορεία, ενώ αυξάνει το πάχος του στρώματος. Στη δεύτερη εβδομάδα του κύκλου η παραγωγή των οιστρογόνων που εκκρίνονται από το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο προκαλούν αναγέννηση του επιθηλίου και αύξηση του πάχους του ενδομητρίου. Τα κύτταρα του ενδομητρίου αυξάνουν και γίνονται υψηλότερα και οι αδένες βαθύτεροι και ευρύτεροι. Καλείται επίσης θυλακινική ή οιστρογονική φάση λόγω της σημαντικής επίδρασης των οιστρογόνων.

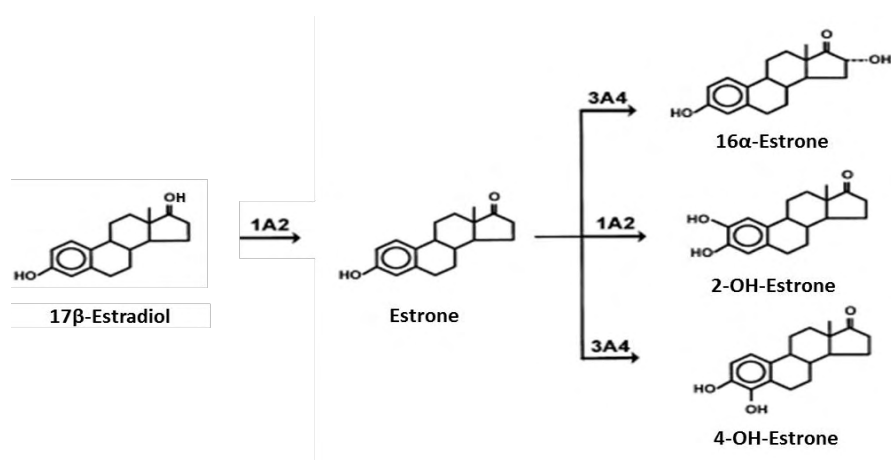
Η εκκριτική φάση αυτή περιλαμβάνει τις δύο τελευταίες εβδομάδες του κύκλου. Αρχίζει μετά την ωοθυλακιορρηξία και έχει σταθερή διάρκεια περί τις 14 ± 2 ημέρες. Υπό την επίδραση της προγεστερόνης που κυριαρχεί σε αυτή τη φάση του κύκλου, αλλά και των οιστρογόνων, οι ενδομητρικοί αδένες επιμηκύνονται, γίνονται πιο δαιδαλώδεις και ευρύτεροι. Η παρουσία της εκκριτικής δραστηριότητας είναι εμφανής στα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία παράγουν μεγάλες ποσότητες γλυκογόνου και άλλων ουσιών όπως πολυσακχαριτών, λιπιδίων κ.λπ. Το πάχος του στρώματος και η αιμάτωση του ενδομητρίου

αυξάνονται, ενώ τα αρτηρίδια γίνονται περισσότερο ελικοειδή, με σκοπό να θρέψουν το στρώμα του ενδομητρίου εφ' όσον επιτευχθεί σύλληψη. Η φάση αυτή ονομάζεται επίσης, ωχρινική και προγεστερονική φάση. Η προεμμηνορρυσιακή ή ισχαιμική φάση πρακτικά αποτελεί μέρος της εκκριτικής φάσης και εμφανίζεται προς το τέλος της. Στην ισχαιμική φάση, δηλαδή 13-14 ημέρες μετά την ωοθυλακιορρηξία, συστέλλονται οι ελικοειδείς αρτηρίες του ενδομητρίου, το λειτουργικό στρώμα γίνεται ωχρό και πτυχώνεται λόγω της ανοξίας και της αναιμίας. Λίγο αργότερα έπεται η αιμορραγία και η φάση της εμμήνου ρύσεως αρχίζει πάλι (Λαϊνάς Τ., 2006).

1.9 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ CYP1A2

Τα οιστρογόνα είναι μια ομάδα στεροειδών χημικών ενώσεων, ονομαζόμενα για τον ρόλο τους στον οιστρικό κύκλο. Τα τρία κύρια οιστρογόνα στις γυναίκες είναι η 17-β οιστραδιόλη (E2), η οιστριόλη (E3) και η οιστρόνη (E1). Η 17-β οιστραδιόλη είναι το κύριο οιστρογόνο με την μεγαλύτερη οιστρογόνο δράση από την εμμηνοαρχή μέχρι την εμμηνόπαυση. Στον οργανισμό και οι τρεις παράγονται από ανδρογόνα μέσω της δράσης ενζύμων. Η οιστραδιόλη βιοσυντίθεται από την τεστοστερόνη ενώ η οιστρόνη από την ανδροστενδιόνη (Guyton, 1991). Ο μεταβολισμός των ενδογενών οιστρογόνων όπως της 17β-οιστραδιόλης και της οιστρόνης καταλύονται από διάφορα ισόενζυμα του P450, τα οποία βρίσκονται τόσο στο ήπαρ όσο και σε εξωηπατικά όργανα-στόχους των οιστρογόνων (Zhu and Conney, 1998). Το CYP1A2 έχει την υψηλότερη καταλυτική ικανότητα από τα υπόλοιπα κυτοχρώματα του P450 στην οξείδωση της 17-β-οιστραδιόλης, έπειτα από μια αρχική μετατροπή της σε οιστρόνη, προς 2-OH και 4-OH μεταβολίτες (Yamazaki et al., 1998) Οι 2-OH μεταβολίτες συνδέονται ασθενώς με τον υποδοχέα των οιστρογόνων, γι' αυτό αυξημένος σχηματισμός τους συνδέεται με μειωμένη εμφάνιση καρκίνου του μαστού, σε αντίθεση με τους 4-OH μεταβολίτες, οι οποίοι σχετίζονται με αυξημένη εμφάνιση καρκίνου του μαστού (Yager and Liehr, 1996). Η 2-υδροξυλίωση της οιστρόνης, η οποία διαμεσολαβείται από το CYP1A2 είναι 6-7 περίπου μεγαλύτερη από την 4-υδροξυλίωση, η οποία διαμεσολαβείται από το ίδιο ένζυμο (Yamazaki et al., 1998). Η 4-υδροξυλίωση της οιστρόνης επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό μέσω του CYP3A4 (Yamazaki et al., 1998; εικόνα 7). Η προγεστερόνη οξειδώνεται κυρίως από ισόενζυμο της υποοικογένειας 3A του P450 (Swinney, 1990). Επιπρόσθετα, μια *in vitro* μελέτη έδειξε πως τα οιστρογόνα (οιστραδιόλη)

μπορούν να αναστείλουν την O- απομεθυλίωση της 7-εθοξυρεσορουφίνης, η οποία διαμεσολαβείται από το CYP1A2 (Eugster et al., 1993), γεγονός που υποδεικνύει ότι τα οιστρογόνα μπορούν να επηρεάζουν την δραστηριότητα του ενζύμου.



Εικόνα 7. Μεταβολισμός της 17β-οιστραδιόλης από το ηπατικό P450 (τροποποιημένη από Yamazaki et al., 1998).

Έχει βρεθεί ότι στην εγκυμοσύνη όπου τα επίπεδα οιστρογόνων και προγεστερόνης αυξάνονται κατά πολύ μειώνεται η δραστηριότητα του CYP1A2 (Aldridge et al., 1981; Vistisen et al., 1992; Tsutsumi et al., 2001; Tracy et al., 2005). Τα από του στόματος συνδυασμένα αντισυλληπτικά χάπια, τα οποία περιέχουν συνδυασμό των δύο ορμονών που παράγουν φυσιολογικά οι ωοθήκες δηλαδή οιστρογόνα και προγεσταγόνα (προγεστερόνη) σε αυστηρά συγκεκριμένες ποσότητες μειώνουν επίσης τη δραστηριότητα του CYP1A2 (Patwardhan et al., 1980; Calahan et al., 1983; Reitveld et al., 1984; Abernethy et Todd, 1985; Guengerich, 1990; Vistisen et al., 1992). Η θεραπεία υποκατάστασης των οιστρογόνων, η οποία εφαρμόζεται στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχει ανασταλτική επίδραση στο μεταβολισμό της καφεΐνης, η οποία διαμεσολαβείται από το CYP1A2, χωρίς να είναι γνωστό αν αυτό οφείλεται σε συναγωνιστική αναστολή ή σε μείωση της σύνθεσης του ισοενζύμου (Pollock et al., 1999). Μέχρι σήμερα, λίγες μελέτες έχουν γίνει όσον αφορά την επίδραση του εμμηνορρυσιακού κύκλου όπου παρατηρούνται μεταβολές στα επίπεδα των οιστρογόνων στην δραστηριότητα του CYP1A2, με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Οι Kashuba et al., 1998, οι Zaigler et al., 2000 και οι Kamimori et al., 1999 έδειξαν ότι δεν επηρεάζεται η δραστηριότητα του CYP1A2 στις διάφορες φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου, ενώ οι Lane et al., 1992 και Bruguerolle et al., 1990 βρήκαν ότι στην εκκριτική φάση μειώνεται η δραστηριότητα του CYP1A2 (πίνακας 5).

Πίνακας 5. Επίδραση ορμονών (οιστρογόνων, προγεστερόνης) στη δραστηριότητα του CYP1A2.

ΟΡΜΟΝΕΣ (ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗ)	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ CYP1A2	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
Αντισυλληπτικά	↓	Patwardhan et al., 1980; Calahan et al., 1983; Reitveld et al., 1984; Abernethy et Todd, 1985; Guengerich et al., 1990; Vistisen et al., 1992
Εγκυμοσύνη	↓	Aldridge et al., 1981; Vistisen et al., 1992; Tsutsumi et al., 2001; Tracy et al., 2005
Θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης	↓	Pollock et al., 1999
Φάσεις εμμηνορρυσιακού κύκλου	↓ ή δεν επηρεάζουν	Lane et al., 1992; Bruguerolle et al., 1990; Kashuba et al., 1998; Kamimori et al., 1999; Zaigler et al., 2000

1.10 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Οι βιολογικές επιδράσεις των οιστρογόνων διαμεσολαβούνται μέσω τριών υποδοχέων: των υποδοχέων των οιστρογόνων ERα και ERβ (ERs), οι οποίοι ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων (Mangelsdorf et al., 1995) και τον συζευγμένο με G-πρωτεΐνες υποδοχέα των οιστρογόνων 1 (GPER1), ο οποίος είναι ένας υποδοχέας της μεμβράνης, γνωστός παλαιότερα ως ορφανός συζευγμένος υποδοχέας των G-πρωτεϊνών 30 (GPR30) (Prossnitz et al., 2008). Η εξαρτώμενη από τα οιστρογόνα σηματοδότηση διακρίνεται, ανάλογα με τα ενδοκυττάρια γεγονότα, στη γονιδιωματική και στη μη-γονιδιωματική, δηλαδή, τη διαφοροποίηση στην έκφραση των γονιδίων ή την ενεργοποίηση των καταρρακτών σηματοδότησης, αντίστοιχα. Επιπλέον, η σύνδεση του συμπλόκου οιστρογόνου-υποδοχέα ER με το DNA μπορεί να είναι είτε άμεση ή έμμεση. Ενεργοποίηση των ERs μπορεί επίσης να γίνει και χωρίς την παρουσία οιστρογόνων. Οι διαφορετικοί μηχανισμοί σηματοδότησης των οιστρογόνων απεικονίζονται στην εικόνα 8.

Άμεση γονιδιωματική σηματοδότηση

Το μονοπάτι της άμεσης γονιδιωματικής σηματοδότης θεωρείται ο κλασικός μηχανισμός σηματοδότησης των οιστρογόνων. Η σύνδεση της 17β-οιστραδιόλης στον ERα ή ERβ στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων στόχων προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση του υποδοχέα με αποτέλεσμα το διμερισμό του και τη μετατόπισή του στον πυρήνα. Στον

πυρήνα το σύμπλοκο οιστραδιόλης-υποδοχέα συνδέεται σε ειδικές αλληλουχίες του DNA που βρίσκονται εντός ή πλησίον του προαγωγέα των γονιδίων-στόχων και ονομάζονται στοιχεία απόκρισης των οιστρογόνων (EREs). Η σύνδεση του συμπλόκου στο DNA προσελκύει πρωτεΐνες που δρουν ως συνενεργοποιητές ή ως συν-καταστολείς οι οποίες μεταβάλλουν τη δομή της χρωματίνης και προάγουν ή καταστέλλουν την μεταγραφή του γονιδίου, αντίστοιχα (Glass, 1994; Mc Kenna et al., 1999). Στις πρωτεΐνες-συνενεργοποιητές ανήκουν οι πρωτεΐνες του υποδοχέα των στεροειδών (SRC-1, SRC-2, SRC-3), οι ακετυλο-τρανσφεράσες των ιστονών (p160, CBP, p300), οι μεθυλ-τρανσφεράσες των ιστονών (CARM, PRMT1) και τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης του νουκλεόσωματος (SWI/SNF), ενώ στις πρωτεΐνες-συνκαταστολείς ανήκουν οι απακετυλάσες των ιστονών (HDACs) και ο συν-καταστολέας του πυρηνικού υποδοχέα (NCoR1) (Smith and O'Malley, 2004). Οι ERs επηρεάζουν μέσω των EREs την μεταγραφή ορμονοεξαρτώμενων γονιδίων όπως της λακτοφερρίνης, της οστεοποντίνης, του θυρεοειδικού υποδοχέα A, της αρωματάσης, του υποδοχέα της προγεστερόνης, της καθεψίνης D, της βιτελλογενίνης και της πρωτεΐνης TFF1 (May, 2014).

Έμμεση γονιδιωματική σηματοδότηση

Η 17β-οιστραδιόλη μπορεί επίσης να επηρεάσει την έκφραση γονιδίων που δεν φιλοξενούν EREs στην περιοχή του προαγωγέα τους. Στην πραγματικότητα, περίπου το ένα τρίτο των αποκρινόμενων στα οιστρογόνα γονιδίων στερούνται ακολουθίες τύπου EREs. Στην ανεξάρτητη από EREs γονιδιωματική σηματοδότηση, τα σύμπλοκα οιστρογόνου-ER δεν συνδέονται άμεσα στο DNA, αλλά μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με άλλους μεταγραφικούς παραγόντες στα αντίστοιχα δικά τους στοιχεία απόκρισης. Αυτός ο μηχανισμός δράσης επιτρέπει την ενεργοποίηση ή την καταστολή της έκφρασης γονιδίων-στόχων των άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Οι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι διευκολύνουν τη σηματοδότηση των οιστρογόνων περιλαμβάνουν: 1. την πρωτεΐνη ενεργοποιητή 1 (**AP-1**), η οποία κωδικοποιεί την ωλευκωματίνη, τον ινσουλινινόμορφο αυξητικό παράγοντα 1 (IGF1), την κολλαγενάση, την κυκλίνη D1 (CCND1) και την χολινοακετυλοτρανσφεράση, 2. τον πυρηνικό παράγοντα κΒ (**NF-κΒ**), ο οποίος καταστέλλει την έκφραση της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), 3. την πρωτεΐνη εξειδίκευσης 1 (**Sp1**), η οποία κωδικοποιεί τον υποδοχέα χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, την συνθετάση του ενδοθηλιακού νιτρικού οξειδίου (eNOS), το ογκογονίδιο c-fos, την κυκλίνη D1 (CCND1), τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέως (RAR), τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα

(VEGF), 4. την πρωτεΐνη σύνδεσης β στον CCAAT/ενισχυτή (**C/EBPβ**), η οποία καταστέλλει την έκφραση της IL-6, 5. την πρωτεΐνη σύνδεσης GATA 1 (**GATA1**), η οποία καταστέλλει την ερυθροποίηση και 6. τον ενεργοποιητή της μεταγραφής 5 (**STAT5**) (Björnström and Sjöberg, 2005; Safe and Kim, 2008).

Μη-γονιδιωματική σηματοδότηση

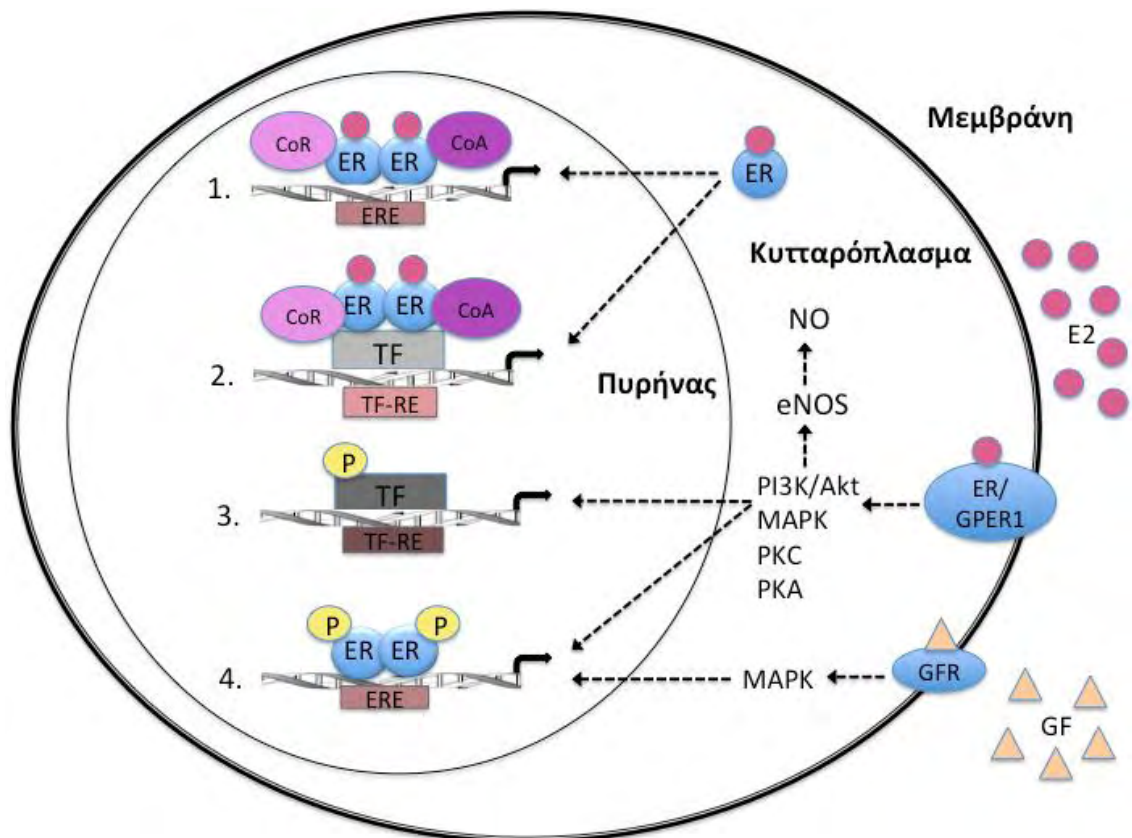
Η μη-γονιδιωματική σηματοδότηση είναι πολύ κοινή στις στεροειδείς ορμόνες και συνήθως σχετίζεται με την ενεργοποίηση αλυσιδωτών αντιδράσεων κινασών-πρωτεϊνών που μπορεί να οδηγήσει σε έμμεσες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση οφειλόμενες σε φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων. Το είδος αυτό της σηματοδότησης πραγματοποιείται μέσω υποδοχέων των οιστρογόνων που συνδεούνται με τη μεμβράνη όπως ο GPER1 καθώς και συγκεκριμένες παραλλαγές του ERα και ERβ. Είναι ταχύτατη και ολοκληρώνεται σε λίγα δευτερόλεπτα ή λεπτά, σε αντίθεση με τη γονιδιωματική σηματοδότηση, η οποία συμβαίνει εντός δύο ωρών. Η σύνδεση των οιστρογόνων σε αυτούς τους υποδοχείς της μεμβράνης προκαλεί κινητοποίηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου, διέγερση της δραστηριότητας του αδενυλικής κυκλάσης, ενεργοποίηση των υποδοχέων κινάσης της τυροσίνης της μεμβράνης (EGF, IGF1) και την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών: α. της ενεργοποιημένης από μιτογόνα πρωτεϊνικής κινάσης (**MAPK**), β. της κινάσης της 3-φωσφοϊνοσιτόλης (**PI3K/AKT**), γ. της φωσφολιπάσης C και της πρωτεϊνικής κινάσης C (**PLC/PKC**) και δ. της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) και της πρωτεϊνικής κινάσης A (**cAMP/PKA**). Η ενεργοποίηση των παραπάνω σηματοδοτικών μονοπατιών από την οιστραδιόλη οδηγεί σε φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων όπως του NF-κB, της AP-1, της Elk-1, των STATs και της πρωτεΐνης σύνδεσης των στοιχείων απόκρισης cAMP (CREB) οδηγώντας σε ενεργοποίηση της μεταγραφής αλλά και των ίδιων των ERs και των συνενεργοποιητών τους, οδηγώντας σε αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα των ERs στα EREs (Björnström and Sjöberg, 2005). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα το μονοπάτι PI3K/Akt οδηγεί στη παραγωγή συνθετασών του οξειδίου του αζώτου (eNOs) και τελικά σε παραγωγή οξειδίου του αζώτου (NO) (Kim et al., 1999).

Σηματοδότηση ανεξάρτητη του συνδέτη

Στη ανεξάρτητη του συνδέτη σηματοδότηση γίνεται φωσφορυλίωση των ERs ή των συνενεργοποιητών τους απουσία της 17β-οιστραδιόλης ή άλλου συνδέτη. Η φωσφορυλίωση γίνεται από εξωκυττάρια σήματα όπως πεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες (IL-2), νευροδιαβιβαστές (ντοπαμίνη) και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνες A και D1). Οι

πεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες αντιπροσωπεύουν ιδιαίτερα σημαντική ομάδα αυτής της σηματοδότησης και περιλαμβάνουν τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF), τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού β (TGFβ) και τον αυξητικό παράγοντα της ινσουλίνης (IGF1) και φωσφορυλιώνουν τους ERs μέσω του μονοπατιού MAPK (Nilsson et al., 2001).

Συνοπτικά, η 17β-οιστραδιόλη μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση του ίδιου γονιδίου-στόχου μέσω πολλαπλών μηχανισμών, τόσο γονιδιωματικών όσο και μη-γονιδιωματικών. Επιπρόσθετα, η ίδια αλληλουχία του προαγωγέα μπορεί να φιλοξενήσει EREs καθώς και στοιχεία απόκρισης άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Επομένως, η γονιδιακή έκφραση εξαρτάται από πολλούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των μεταγραφικών παραγόντων που βρίσκονται στο γονίδιο του προαγωγέα, των επιπέδων αλλά και της κυτταρικής εντόπισης των ERs, των πολυάριθμων συν-ρυθμιστικών πρωτεϊνών, καθώς και από τη φύση των ερεθισμάτων. Δεδομένου ότι αυτές οι μεταβλητές μπορούν να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των διαφόρων τύπων κυττάρων, είναι πιθανόν ότι τα οιστρογόνα ακολουθούν συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον εξασφαλίζοντας με αυτό τρόπο μια πολύ ειδική, για το κάθε κύτταρο, ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου.



Εικόνα 8. Μηχανισμός δράσης των οιστρογόνων. **1. Άμεση γονιδιωματική σηματοδότηση.** Ο ER κατόπιν συνδέσεως με την E2, διμερίζεται, μεταφέρεται στον πυρήνα και προσδένεται απευθείας στο ERE του γονιδίου-στόχου προσελκύοντας συν-ενεργοποιητές και συν-καταστολείς, οι οποίοι προάγουν ή καταστέλλουν την μεταγραφή του γονιδίου, αντίστοιχα. **2. Έμμεση γονιδιωματική σηματοδότηση.** Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο E2-ER συνδέεται στο DNA έμμεσα μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με άλλους μεταγραφικούς παραγόντες (π.χ AP-1, NF-κB, Sp1, STAT5, GATA 1) στα στοιχεία απόκρισης των μεταγραφικών παραγόντων. **3. Μη-γονιδιωματική σηματοδότηση.** Η E2 συνδέεται με μεμβρανικούς υποδοχείς (παραλλαγές των ERs, GPER1), ενεργοποιώντας αλυσιδωτές αντιδράσεις κινασών-πρωτεϊνών (MAPK, PI3K, PKA, PKC), οι οποίες οδηγούν στη φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων (π.χ NF-κB, της AP-1, Elk-1, STATs, CREB) αλλά και των ίδιων των ERs και των συν-ενεργοποιητών τους. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα το μονοπάτι PI3K οδηγεί στην παραγωγή eNOs και τελικά σε παραγωγή NO. **4. Σηματοδότηση ανεξάρτητη του συνδέτη.** Αυξητικοί παράγοντες (EGF, TGFβ, IGF1) ενώνονται με τους υποδοχείς τους και φωσφορυλιώνουν τον Er, ο οποίος συνδέεται στο ERE ενεργοποιώντας την μεταγραφή του γονιδίου απουσία οιστραδιόλης.

E2-17β οιστραδιόλη, GF-αυξητικός παράγοντας, GFR-υποδοχέας αυξητικού παράγοντα, GPER1-συζευγμένος με G-πρωτεΐνες υποδοχέας των οιστρογόνων, ER-υποδοχέας οιστρογόνων, ERE-στοιχείο απόκρισης οιστρογόνων, CoA-συν-ενεργοποιητές, CoR-συν-καταστολείς, TF-μεταγραφικός παράγοντας, TFRE-στοιχείο απόκρισης μεταγραφικών παραγόντων, P-φωσφορυλίωση, MAPK/PI3K/PKC/PKA-σηματοδοτικά μονοπάτια φωσφορυλίωσης, eNOS-συνθετάση του οξειδίου του αζώτου, NO-οξείδιο του αζώτου.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση των διακυμάνσεων των ορμονών (κυρίως των οιστρογόνων) που συμβαίνουν στις διάφορες φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου στην *in vivo* δραστικότητα του ενζύμου CYP1A2, το οποίο ανευρίσκεται αποκλειστικά στο ήπαρ αλλά και των ενζύμων CYP2A6, NAT-2 και XO. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίστηκαν οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης στα ούρα οι οποίοι αντανακλούν τη λειτουργικότητα των ενζύμων και καθορίστηκαν οι τιμές αναφοράς των ενζύμων αυτών σε τρεις συγκεκριμένες φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου (πρώιμη ωοθυλακική-όψιμη ωοθυλακική-ωχρινική) στις οποίες παρατηρούνται μεγάλες μεταβολές στα επίπεδα των ορμονών.

Επιπλέον, προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του γονοτύπου στην φαινοτυπική έκφραση του CYP1A2, μελετήθηκε η κατανομή των δύο πιο συχνών απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών στην 5'-πλευρική περιοχή (CYP1A2*1C) και στο ιντρόνιο-1 (CYP1A2*1F) παράλληλα με τους μεταβολικούς λόγους της καφεΐνης οι οποίοι αντανακλούν τη δραστικότητα του ενζύμου.

Ο συνδυασμός της φαινοτυπικής και της γονοτυπικής ανάλυσης του CYP1A2 στις γυναίκες μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες όσον αφορά την ερμηνεία της μεταβολικής δραστηριότητας του CYP1A2 σε σχέση με τις διακυμάνσεις των τιμών των οιστρογόνων (ενδογενών υποστρωμάτων) στη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΕΘΕΛΟΝΤΡΙΕΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν αρχικά **44** υγιείς γυναίκες με φυσιολογικούς καταμήνιους εμμηνορρυσιακούς κύκλους, οι οποίες δεν έκαναν χρήση αντισυλληπτικών χαπιών και δεν εγκυμονούσαν. Οι εθελόντριες χωρίστηκαν με βάση τις συνήθειες καπνίσματος σε δυο κατηγορίες παρόμοιας ηλικίας: η μία κατηγορία περιελάμβανε 25 μη καπνίστριες και η άλλη κατηγορία 19 καπνίστριες. Όλες οι εθελόντριες είχαν φυσιολογική νεφρική και ηπατική λειτουργία όπως διαπιστώθηκε μετά από έλεγχο της ουρίας, κρετινίνης, τρανσαμινασών (SGOT, SGPT) και της γ-γλουταμινικής τρανσφεράσης (γ-GT). Η μελέτη εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (1862015/24227).

Συλλογή δειγμάτων ούρων και αίματος έγινε σε τρεις φάσεις: 1. κατά τη διάρκεια της πρώιμης ωοθυλακικής (2^η-3^η ημέρα μετά την έναρξη της έμμηνου ρύσεως, ΠΩΦ), 2. της όψιμης ωοθυλακικής (10^η-11^η ημέρα μετά την έναρξη της έμμηνου ρύσεως, ΟΩΦ) και 3. της ωχρινικής φάσεως (21^η-26^η ημέρα μετά την έναρξη της έμμηνου ρύσεως, ΩΦ). Τα επίπεδα της E2, της PRG, της FSH και της LH προσδιορίστηκαν και στις τρεις φάσεις, ενώ ταυτόχρονα με την αιμοληψία πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο της καφεΐνης με δειγματοληψίες ούρων (εικόνα 9). Δύο καπνίστριες εθελόντριες δεν συνέχισαν το πρωτόκολλο στην όψιμη ωοθυλακική και ωχρινική περίοδο, με αποτέλεσμα να έχουν, τελικά, ολοκληρώσει το πρωτόκολλο **42** εθελόντριες (25 μη καπνίστριες και 17 καπνίστριες). Στον έλεγχο του γονοτύπου συμπεριλήφθησαν και οι 44 εθελόντριες.

Σε όλες τις γυναίκες συμπληρώθηκε ερωτηματολόγιο όπου αναγράφονταν τα βασικά δημογραφικά χαρακτηριστικά (ηλικία, βάρος, ύψος), λεπτομέρειες του εμμηνορρυσιακού κύκλου (εμμηναρχή, σταθερότητα και διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου), χρόνιες ασθένειες, χρήση φαρμακευτικών σκευασμάτων, συνήθειες (κάπνισμα, αλκοόλ) και τρόπος ζωής τους (επάγγελμα, έκθεση σε χημικές ουσίες). Στους πίνακες 6 και 7 απεικονίζονται αναλυτικά σε κάθε εθελόντρια η ηλικία, το BMI, η διάρκεια του κύκλου (διάρκεια κύκλου) και οι τιμές των ορμονών (LH, FSH, E2, PRG), στις τρεις φάσεις του κύκλου. Στον πίνακα 6 ανήκουν οι μη καπνίστριες (MK) και στον πίνακα 7 οι καπνίστριες (K), οι οποίες ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο.

Η συλλογή των δειγμάτων ούρων και αίματος γινόταν μετά από ενημέρωση και έγγραφη συγκατάθεση των ατόμων σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. 24 ώρες αποχή από τροφές και ροφήματα που περιέχουν μεθυλοξανθίνες, δηλαδή καφέ, κακάο, σοκολάτα, τσάϊ και κόκα κόλα καθώς και όσων επάγουν ή αναστέλλουν την δραστηριότητα του CYP1A2 (λάχανο, κουνουπίδι, μπρόκολο, γκρέϊπ-φρουτ, κρέας ψητό στα κάρβουνα και στο φούρνο, αλκοόλ). Οι εθελόντριες έκαναν διακοπή της φαρμακευτικής τους αγωγής στις περιπτώσεις που ήταν έφικτο, όμως καμία δεν έλαβε φάρμακα που επάγουν ή αναστέλλουν την δραστηριότητα των υπό μελέτη ενζύμων καθώς επίσης και παρακεταμόλης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο.

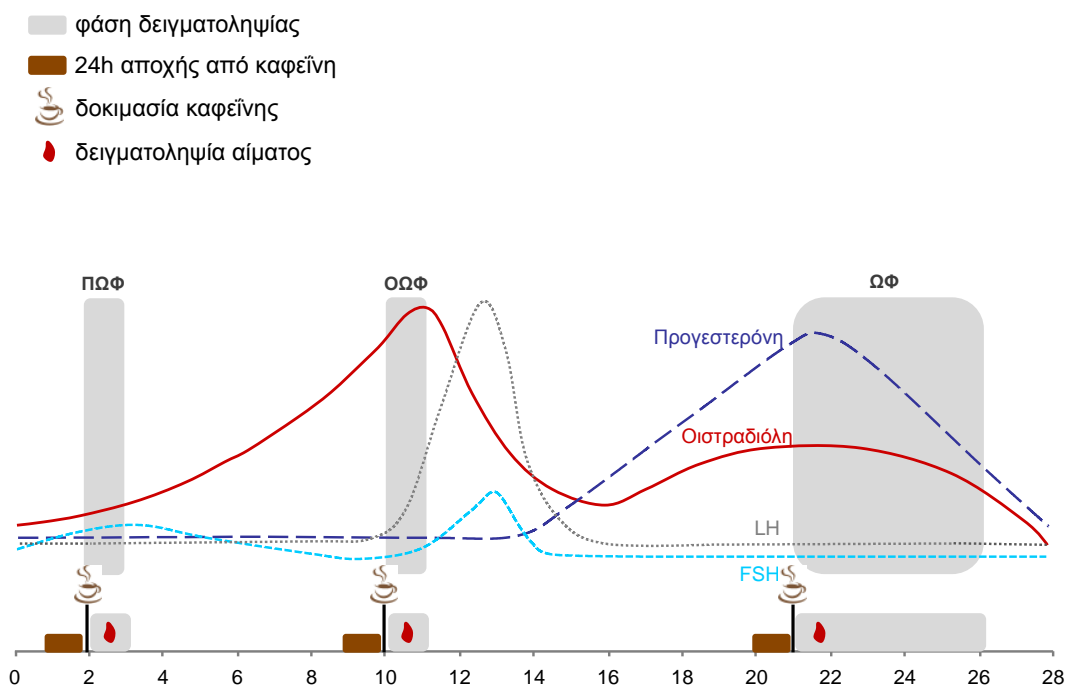
2. Την επόμενη ημέρα το πρωί γινόταν λήψη μίας κάψουλας η οποία περιείχε 200 mg καφεΐνης (Fluka, Ελβετία), μετά από κένωση της ουροδόχου κύστης και συνεχιζόταν η αποχή από όλα τα παραπάνω για τις επόμενες 6 ώρες.

3. Η συλλογή των ούρων πραγματοποιούνταν 6 ώρες μετά τη λήψη της κάψουλας καφεΐνης σε ουροσυλλέκτες που περιείχαν 200 ml 6N υδροχλωρικού οξέος.

Αμέσως μετά την λήψη των ούρων γινόταν ρύθμιση του pH στην τιμή 3,5 περίπου με την προσθήκη διαλύματος HCL 6N, με σκοπό τη μη διάσπαση του AFMU (Wong et al., 2002). Τέλος, δείγματα του 1 ml αποθηκεύονταν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους. Η συλλογή του αίματος γινόταν ακριβώς πριν ή μετά τη λήψη του δείγματος ούρων. Για τον έλεγχο του γονοτύπου το αίμα φυλάσσονταν σε EDTA φιαλίδιο.

Η *in vivo* δραστικότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT-2 προσδιορίστηκε με την βοήθεια της RP-HPLC με τη χρήση των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα (AFMU+1U+1X)/17U, 17U/(17U+17X), 1U/(1X+1U), AFMU/(AFMU+1U+1X), αντίστοιχα. Στην παρούσα μελέτη έγινε, χρήση του μεταβολικού λόγου 17U/(17U+17X) ως εναλλακτικού του λόγου 17U/17X για την μελέτη της δραστικότητας του CYP2A6 λόγω του μικρότερου βαθμού διακύμανσης που παρουσιάζει ο πρώτος λόγος (Begas et al., 2007) σε σχέση με το δεύτερο (Nowell et al., 2002). Παρόλο που η κατάλυση της μετατροπής της 17X προς 17U είναι αντίδραση ειδική για το CYP2A6, η απέκριση της 17X στα ούρα εξαρτάται από το ρυθμό αποβολής των ούρων (Kalow, 1985; Bonati et al., 1982) γεγονός που καθιστά τους μεταβολικούς λόγους που εμπεριέχουν την 17X εξαρτώμενους όχι μόνον από την δραστικότητα του εξεταζομένου ενζύμου αλλά και από την πρόσληψη υγρών καθώς και από την νεφρική λειτουργία.

Κατά την παραλαβή τους τα δείγματα αίματος και ούρων από κάθε εθελόντρια αριθμήθηκαν με ένα κωδικοποιημένο αριθμό και αναλύθηκαν σε δεύτερη φάση χωρίς να είναι γνωστό το όνομα και η φάση του κύκλου στην οποία έγινε η λήψη των δειγμάτων για την αποφυγή προκατειλημμένων αποτελεσμάτων.



Εικόνα 9. Πρωτόκολλο καφεΐνης και λήψη δειγμάτων αίματος για τον προσδιορισμό των ορμονών FSH, LH, E2, PRG στις τρεις φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου: 1. Πρώιμη Ωοθυλακική Φάση (2^η-3^η ημέρα μετά την έναρξη της έμμηνου ρύσεως, ΠΩΦ), 2. Όψιμη Ωοθυλακική Φάση(10^η-11^η ημέρα μετά την έναρξη της έμμηνου ρύσεως, ΟΩΦ) και 3. Ωχρινική Φάση (21^η-26^η ημέρα μετά την έναρξη της έμμηνου ρύσεως, ΩΦ).

Πίνακας 6. Χαρακτηριστικά μη καπνιστριών (ΜΚ) και τιμές των ορμονών (LH, FSH, E2, PRG) στις τρεις φάσεις του κύκλου.

ΜΚ	Ηλικία (Ετη)	BMI (Kg/m ²)	Διάρκεια Κύκλου (Ημέρες)	ΠΩΦ- LH (mIU/ml)	ΠΩΦ -FSH (mIU/ml)	ΠΩΦ-E2 (pg/ml)	ΠΩΦ-PRG (ng/ml)	ΟΩΦ -LH (mIU/ml)	ΟΩΦ-FSH (mIU/ml)	ΟΩΦ-E2 (pg/ml)	ΟΩΦ PRG (ng/ml)	ΩΦ -LH (mIU/ml)	ΩΦ -FSH (mIU/ml)	ΩΦ -E2 (pg/ml)	ΩΦ-PRG (ng/ml)
1. Τ.Φ	23	19,8	29-30	5,1	5,8	19	1,1	10,8	6,2	67	1,0	8,1	2,7	108	10,9
2. Δ.Θ	18	18,8	24-26	2,0	5,4	12	0,4	3,9	5,0	21	0,4	8,6	7,1	24	0,5
3. Τ.Α	32	20,3	25	8,4	11,3	51	0,3	15,1	4,8	302	0,3	2,2	3,4	74	13,5
4. Θ.Α	30	25,2	30	5,2	8,4	31	1,8	12,6	5,1	153	1,4	4,4	4,5	50	7,1
5. Τ.Π	18	17,5	28-30	5,4	7,5	42	0,4	18,1	6,6	369	0,7	1,5	1,5	118	12,0
6. Σ.Α	30	19,9	26	9,2	6,3	9	0,6	6,2	3,4	192	0,7	1,9	2,2	175	10,7
7. Μ.Σ	45	30,5	28-30	4,2	12,9	5	0,3	6,0	10,0	71	0,3	4,7	7,7	74	12,3
8. Γ.Ν	32	20,3	28	4,8	8,5	41	0,3	74,4	26,1	131	0,6	5,0	3,6	63	15,8
9. Τ.Α	33	24,2	28	2,9	9,0	12	0,7	6,3	11,4	43	1,0	2,4	3,2	236	17,0
10. Τ.Ε	19	21,2	29	4,2	7,8	27	0,9	46,5	12,4	446	1,5	2,3	1,6	147	8,2
11. Σ.Χ	36	28,1	28	3,6	7,2	29	0,4	17,5	9,0	325	0,5	5,2	4,4	103	4,8
12. Σ.Ι	33	20,4	28-30	6,1	6,7	20	0,4	18,6	9,3	203	1,4	4,9	3,9	176	12,5
13. Κ.Α	44	40,6	28	2,0	4,8	60	0,4	5,2	4,2	101	0,4	1,9	2,8	122	6,2
14. Κ.Σ	27	20,6	27-28	8,2	8,1	55	0,7	9,9	5,6	98	0,6	2,2	3,3	174	11,9
15. Κ.Ε	32	35,1	28	5,2	8,2	65	0,4	7,5	3,5	320	0,3	5,7	3,0	164	15,5
16. Ν.Α	25	23,4	30-32	3,9	5,9	59	0,3	4,1	4,3	221	0,2	2,4	2,9	206	19,2
17. Α.Ε	30	21,2	28-30	7,5	7,2	61	0,4	11,5	7,3	52	0,4	16,3	3,9	103	2,3
18. Σ.Ο	28	26,5	28	3,7	6,3	76	0,5	6,8	5,2	107	0,4	6,0	1,7	95	5,0
19. Γ.Σ	40	29,7	28	3,8	8,0	63	0,4	9,9	4,9	327	0,6	3,7	3,7	17	0,9
20. Τ.Α	35	22,0	30-32	7,7	11,8	39	0,5	7,5	3,7	211	0,5	4,3	6,3	101	28,2
21. Τ.Β	34	34,3	28-30	4,2	5,1	35	0,7	10,0	5,1	27	0,6	8,5	4,4	34	0,5
22. Σ.Σ	30	21,8	26-28	4,6	7,1	58	0,4	11,3	5,3	148	0,4	5,1	3,2	119	14,8
23. Τ.Β	30	20,5	30-33	1,6	3,6	29	0,5	7,8	6,6	33	0,4	9,3	2,9	73	5,4
24. Δ.Α	30	24,6	28	5,8	7,2	21	0,3	2,2	2,3	65	0,1	2,4	4,7	54	18,2
25. Μ.Σ	44	30,1	26-29	4,7	13,8	17	0,2	4,4	4,8	60	0,1	8,8	6,1	72	0,7

Πίνακας 7. Χαρακτηριστικά καπνιστριών (Κ) και τιμές των ορμονών (LH, FSH, E2, PRG) στις τρεις φάσεις του κύκλου.

Κ	Ηλικία(Έτη)	BMI (Kg/m ²)	Διάρκεια Κύκλου (Ημέρες)	ΠΩΦ-LH (mIU/ml)	ΠΩΦ-FSH (mIU/ml)	ΠΩΦ-E2 (pg/ml)	ΠΩΦ-PRG (ng/ml)	ΟΩΦ-LH (mIU/ml)	ΟΩΦ-FSH (mIU/ml)	ΟΩΦ-E2 (pg/ml)	ΟΩΦ PRG (ng/ml)	ΩΦ-LH (mIU/ml)	ΩΦ-FSH (mIU/ml)	ΩΦ-E2 (pg/ml)	ΩΦ-PRG (ng/ml)
1. Δ.Κ	20	20,1	29-30	4,9	6,0	27	0,8	7,3	4,3	33	0,8	6,2	2,5	39	1,7
2. Δ.Π	26	24,6	29	4,5	6,0	32	1,6	6,1	6,4	40	1,7	9,7	4,8	94	3,4
3. Π.Π	21	23,1	28	4,5	6,7	25	0,4	5,2	3,4	88	0,3	8,0	2,2	269	22,2
4. Ι.Κ	30	20,2	25-28	6,2	9,0	44	0,5	7,9	6,9	81	0,5	13,0	6,1	198	13,2
5. Μ.Μ	37	24,0	35	5,3	6,6	8	0,6	7,1	7,8	69.8	0,5	2,7	2,6	76	1,9
6. Δ.Χ	42	30,8	28-30	3,1	4,0	79	0,3	5,6	6,5	87	4,4	4,4	8,3	53	0,6
7. Π.Π	40	33,9	24-28	5,3	6,3	82	0,6	25,1	13,4	230	1,2	1,8	2,6	146	8,5
8. Π.Α	33	20,9	28	9,2	7,9	60	0,5	7,7	3,5	367	0,5	3,4	3,5	109	10,9
9. Λ.Ε	21	20,7	29-30	4,5	7,1	51	0,7	5,2	5,6	134	0,8	7,7	2,5	428	16,6
10. Κ.Θ	20	19,7	28-30	5,4	5,6	61	0,8	10,6	4,6	284	0,9	6,0	3,2	216	19,5
11. Κ.Ε	18	19,8	30-32	4,3	4,3	45	0,6	4,5	2,9	178	0,7	2,3	1,5	82	18,0
12. Τ.Κ	35	18,6	26-28	4,6	6,6	86	0,5	13,6	5,6	325	0,5	3,5	2,8	204	21,8
13. Λ.Β	40	22,5	25-30	4,0	13,4	87	0,6	40,8	20,7	218	0,9	0,9	2,3	102	6,3
14. Γ.Π	44	23,9	22-25	2,6	6,8	54	0,3	3,9	6,2	157	0,3	9,8	4,8	88	2,6
15. Μ.Β	30	24,2	28	6,0	6,8	52	0,5	6,0	5,5	103	0,5	4,3	3,5	145	16,2
16. Κ.Σ	31	22,4	28	6,7	4,5	79	0,6	5,0	3,9	49	3,2	2,9	2,3	76	7,0
17. Ζ.Ε	41	23,7	22-26	5,3	12,3	64	0,3	7,5	7,4	24	0,9	1,3	4,1	76	27,7

2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

Οι ορμόνες LH, FSH, E2, PRG στις διάφορες φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου μετρήθηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροχημειοφωταύγειας με τον αυτόματο αναλυτή Cobas e 411. Η μέτρηση των FSH και LH έγινε σε μονάδες mIU/ml, της E2 σε pg/ml και της PRG σε ng/ml.

2.3 ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ CYP11A2

Ο διαχωρισμός του DNA από το αίμα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το μίνι κιτ της Invitrogen Purelink για το γενωμικό DNA (Invitrogen Corp, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του κατασκευαστή και φυλάχθηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω ανάλυσή του. Για τον έλεγχο του γονοτύπου χρησιμοποιήσαμε τις μεθόδους της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και πολυμορφισμού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP). Η PCR εκτελέστηκε στη συσκευή MJ Research PCR (BIORAD). Προστέθηκαν 4 μl του DNA σε κάθε σωληνάριο που περιείχε 1X PCR ρυθμιστικό διάλυμα-buffer, 1,6 mM dNTPs, 2 mM MgCl_2 , 400 nM από κάθε εκκινητή-primer (Pentabase APS, Denmark) και 1,5 U της Taq πολυμεράσης σε συνολικό όγκο 50 μl (Fermentas Inc., Hanover, MD). Τα προϊόντα της PCR διασπάστηκαν με τη βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων (restriction enzymes) BspI και PspOMI για τους πολυμορφισμούς $-3860\text{G}\rightarrow\text{A}$ και $-163\text{A}\rightarrow\text{C}$, αντίστοιχα. Τα προϊόντα της PCR καθώς και τα τμήματα DNA που προέκυψαν μετά τη δράση των περιοριστικών ενζύμων (θραύσματα) διαχωρίστηκαν με βάση το μέγεθός τους, μέσω της ηλεκτροφόρησης σε 3% πηκτή αγαρόζης. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, τα τμήματα DNA που διαχωρίστηκαν στην πηκτή έγιναν ορατά με τη χρήση μια φθορίζουσας χρωστικής του βρωμιούχου αιθιδίου, η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA. Η χρωστική αυτή είχε προστεθεί στην πηκτή πριν αυτή φτιαχτεί και χρησιμοποιηθεί, αλλά η παρουσία της έγινε ορατή χρησιμοποιώντας ένα ψηφιακό σύστημα ανάλυσης της πηκτής (miniBIS pro, DNR Bio-Imaging systems). Αναλυτικά, η μέθοδος PCR-RFLP που χρησιμοποιήθηκε απεικονίζεται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8. Έλεγχος των πολυμορφισμών (SNPs) -3860 G→A και -163 C→A στο γονίδιο του CYP1A2 με τη μέθοδο PCR-RFLP.

SNPs	Όνομα Εκκινητή	Αλληλουχία (5'→3')	Πρόγραμμα PCR	[Mg ⁺] (mM)	Μήκος Ζώνης	Περιοριστικά Ένζυμα	Θερμοκρασία Επώσεως	Διάταξη ζωνών
-3860 G→A	Fw3 Rv2	GCTACACATGATCGAGCTATAC CAGGTCTCTTCACTGTAAAGTTA	94°C 10min-35x (30s94 °C- 30s56 °C- 1min72 °C)	2	568bp	BsII	55 °C	G:343-132-93 A:475-93
-163 C→A	Fw1 Rv1	TGAGGCTCCTTCCAGCTCTCA AGAAGCTCTGTGGCCGAGAAGG	94°C 10min-35x (30s94 °C- 30s60 °C- 1min72 °C)	2.5	265 bp	PspOMI	37 °C	A:265 C:211-54

2.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η προμήθεια των προτύπων μεταβολιτών της καφεΐνης 1X, 3X, 7X, 37X, 17X, 1U, 3U, 7U, 13U, 17U, 137U και της 4-ακεταμιδοφαινόλης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο, έγινε από τη Sigma (Steinheim, Γερμανία). Η προμήθεια του πρότυπου μεταβολίτη 13X και της ισοπροπανόλης έγινε από τη Merck (Darmstadt, Γερμανία) και της καφεΐνης όπως επίσης και του 37U από τη Fluca (Buchs, Ελβετία). Το AFMU, καθαρότητας 98%, ήταν ευγενική χορηγία του Δρ. W. Pfeleiderer (Πανεπιστήμιο Konstanz, Γερμανία). Το ακετονιτρίλιο, η μεθανόλη, το υδροχλωρικό οξύ, το οξικό οξύ, το χλωροφόρμιο και το θειϊκό αμμώνιο αγοράστηκαν από την Riedel-de Haen (Seelze, Γερμανία). Το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη ήταν βαθμού καθαρότητας HPLC, ενώ το υδροχλωρικό οξύ, το οξικό οξύ, το χλωροφόρμιο και το θειϊκό αμμώνιο ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Σε όλα τα στάδια της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε υπερκαθαρό ύδωρ, αγωγιμότητας 0,055 μ Siemens.

2.5 ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Οι συσκευές χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν για τη χρωματογραφική ανάλυση της καφεΐνης και των μεταβολιτών περιελάμβαναν μια αντλία υψηλής πίεσης Marathon III (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη), έναν ανιχνευτή υπεριώδους/ορατού FASMA 500 με μεταβλητό μήκος κύματος (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη), μια βαλβίδα εισαγωγής δείγματος Rheodyne 7010 (Rheodyne, California, ΗΠΑ), η οποία είχε βρόγχο όγκου 20 μ l και μια χρωματογραφική στήλη Kromasil 100 C18, διαμέτρου σωματιδίων πλήρωσης 5 μ m, μήκους 250 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm (Macherey-Nagel, Γερμανία) μέσω της οποίας πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διαλύτης αποτελούμενος από 0,1% οξικό οξύ/μεθανόλη/ακετονιτρίλιο, σε αναλογίες όγκων 92:4:5 σύμφωνα με το πρόγραμμα ροής του πίνακα 9. Ο αέρας που περιέχονταν στην κινητή φάση απομακρυνόταν συνεχώς μέσω της εν σειρά χρήσης ενός ηλεκτρικού απαερωτή δημιουργίας κενού (Alltech Associates Inc., Deefield IL, ΗΠΑ). Η πρόσληψη και η ανάλυση των αναλογικών/ψηφιακών δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος

Chrom&Spec (Ampersand Ltd, Ρωσία). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (23 °C).

Πίνακας 9. Πρόγραμμα ροής για τη χρωματογραφική ανάλυση των 5 μεταβολιτών της καφεΐνης.

Χρόνος	Διαλύτης A (%)	Ταχύτητα Ροής (ml/min)
0	100	0.7
5	100	0.7
5	100	1.1
19	100	1.1

2.6 ΠΡΟΕΤΟΙ ΜΑΣΙΑ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Τα πυκνά διαλύματα της καφεΐνης και καθενός από τους μεταβολίτες της ξεχωριστά, παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 5 mM. Προετοιμάστηκαν διαλύματα καφεΐνης, 137U, 13X, 17X και 13U με διάλυση των αντιστοίχων προτύπων ουσιών σε υπερκαθαρό ύδωρ ενώ τα διαλύματα της 37X, του 17U, του 37U και του 3U παρασκευάστηκαν σε 2,5 mM NaOH και τα διαλύματα της 1X, της 3X, της 7X, του 1U και του 7U σε 5,0 mM NaOH. Τα διαλύματα της AFMU (5mM) και του εσωτερικού προτύπου (4-ακεταμιδοφαινόλη, 10mM) παρασκευάστηκαν σε 0,1% οξικό οξύ. Όλα τα πυκνά διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Ένα πρότυπο μίγμα αποτελούμενο από 1U, 1X, 17U, 17X και AFMU σε συγκέντρωση 1 mM παρασκευάστηκε από τα πυκνά διαλύματα και αποθηκεύτηκε στους -20 °C. Το pH του μίγματος των 1U, 1X, 17U και 17X ρυθμίστηκε στην τιμή 3,5 πριν από την προσθήκη του AFMU. Το μίγμα αυτό των 5 μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των κατάλληλων προτύπων διαλυμάτων των ανωτέρω μεταβολιτών σε ούρα υγιούς ατόμου τα οποία συλλέχτηκαν κατόπιν τετραήμερης αποχής από τροφές και ροφήματα που περιέχουν μεθυλοξανθίνες.

2.7 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ

Σε κάθε δείγμα 200ml ούρων προστέθηκαν 250 mg θειϊκού αμμωνίου με σκοπό την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών που ενδεχομένως να υπήρχαν, 200 ml διαλύματος οξικού οξέος 0,1%, 20 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου και το δείγμα αναδεύτηκε ισχυρά.

Έπειτα, έγινε προσθήκη 6ml διαλύματος χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης σε αναλογία όγκων 85/15 και ακολούθησε ανάμιξη για 30". Ακολούθησε φυγοκέντρηση του κάθε δείγματος για 2' στις 5000 rpm με σκοπό την διάσπαση του τυχόν δημιουργηθέντος γαλακτώματος, την κατακρήμνιση του ιζήματος και τον καλύτερο διαχωρισμό των δυο φάσεων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός υδατικής-οργανικής φάσης με τη χρήση ενός διαχωριστικού χωνιού και εξάτμιση της οργανικής φάσης σε ήπιο ρεύμα N₂ στους 45 °C. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 200 μl οξικού οξέος 0,1%, αναδεύθηκε ισχυρά για 15" και διηθήθηκε με πλαστικό φίλτρο (διαμέτρου πόρων 0,2 μm). Τέλος, 20 μl του δείγματος αυτού εγχύθηκαν στη χρωματογραφική στήλη. Έγινε ανάλυση όλων των δειγμάτων των ούρων εις διπλούν. Τα διαλύματα βαθμονόμησης και τα διαλύματα ποιοτικού ελέγχου παρασκευάστηκαν μετά από ανάμιξη 200 μl ούρων που δεν περιείχαν μεθυλοξανθίνες με 200 μl των προτύπων μιγμάτων των 5 μεταβολιτών σε διάφορες συγκεντρώσεις και επεξεργασία τους όπως προαναφέρθηκε.

2.8 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

2.8.1 Γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης

Οι καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν με σκοπό να επιβεβαιώσουν την γραμμική συσχέτιση μεταξύ των λόγων των υψών των υπό εξέταση μεταβολιτών προς το ύψος του εσωτερικού προτύπου και των προκαθορισμένων συγκεντρώσεων τους σε ούρα ελεύθερα μεθυλοξανθινών. Τα δείγματα βαθμονόμησης σε συγκεντρώσεις 10, 20, 50, 100, 200 και 500 μM παρασκευάστηκαν με την ανάμιξη ούρων που δεν περιείχαν μεθυλοξανθίνες με πρότυπα μίγματα των 5 μεταβολιτών στις ανωτέρω συγκεντρώσεις και του εσωτερικού προτύπου. Τα δείγματα ούρων που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση εκχυλίστηκαν και αναλύθηκαν με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως. Οι πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν με τη χρήση της μεθόδου της γραμμικής παλινδρόμησης. Νέες πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάζονταν κάθε φορά που ολοκληρωνόταν η ανάλυση 30 δειγμάτων.

2.8.2 Ακρίβεια και επαναληψιμότητα

Παρασκευάστηκαν τρία δείγματα ελέγχου ποιότητας (Quality Control, QC) με την ανάμιξη ούρων ελευθέρων από μεθυλοξανθίνες με ένα πρότυπο διάλυμα αποτελούμενο από τους πέντε υπό εξέταση μεταβολίτες και του εσωτερικού προτύπου σε χαμηλές (25 μM), μεσαίες (150 μM) και υψηλές (400 μM) συγκεντρώσεις για κάθε μεταβολίτη. Πριν από κάθε ημερήσια χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων ούρων, γινόταν ανάλυση των τριών δειγμάτων ελέγχου ποιότητας. Συνολικά αναλύθηκαν 10 δείγματα ελέγχου χαμηλών, 10 δείγματα μεσαίων και 10 δείγματα υψηλών συγκεντρώσεων. Η συγκέντρωση των μεταβολιτών σε κάθε δείγμα ποιοτικού ελέγχου προσδιορίστηκε μέσω των εξισώσεων των αντίστοιχων ευθειών γραμμικής παλινδρόμησης.

2.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα αποτελέσματα της ηλικίας, του δείκτη μάζας σώματος (BMI), της οιστραδιόλης (E2), της προγεστερόνης (PRG) και των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης για τα ένζυμα CYP1A2, CYP2A6, XO, NAT-2 παρουσιάζονται ως μέσες τιμές (MT) με τυπική απόκλιση (TA) παράλληλα με την ενδιάμεση τιμή (ET) και το εύρος των τιμών. Η ύπαρξη τυχόν διαφορών μεταξύ μη καπνιστριών και καπνιστριών όσον αφορά την ηλικία, το BMI και τους μεταβολικούς λόγους της καφεΐνης των υπό εξεταζόμενων ενζύμων στην πρώιμη ωοθυλακική φάση διερευνήθηκαν με την παραμετρική δοκιμασία t-test και την αντίστοιχη μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney test στις περιπτώσεις μη ύπαρξης κανονικής κατανομής. Για την ανεύρεση διαφορών όσον αφορά τις τιμές της E2, της PRG και τους μεταβολικούς λόγους των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, XO, ταχέων και βραδέων ακετυλιωτριών της NAT-2, στις τρεις φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου στις ομάδες των εθελοντριών χρησιμοποιήθηκε η παραμετρική δοκιμασία ανάλυσης διασποράς για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (One Way Repeated Measures Analysis of Variance –One Way RM ANOVA). Στις περιπτώσεις μη ύπαρξης κανονικής κατανομής εφαρμόστηκε η αντίστοιχη μη παραμετρική δοκιμασία (RM ANOVA on Ranks). Για τις πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήθηκε η διόρθωση Tukey test. Η δραστηριότητα του CYP1A2 μεταξύ των τριών φάσεων εμμηνορρυσιακού κύκλου σε όλες τις εθελόντριες διερευνήθηκε με το γενικό γραμμικό μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (Repeated Measures

General Linear Model). Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SPSS έκδοσης 21.0. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατικά σημαντικές με επίπεδο σημαντικότητας μικρότερο του 5% ($p < 0,05$). Η γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης προσδιορίστηκε με ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης.

3.0 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Οι καμπύλες βαθμονόμησης των AFMU, 1U, 1X, 17U και 17X ήταν γραμμικές στο εύρος των συγκεντρώσεων 10-500 μM . Οι συντελεστές συσχέτισης (R^2) ήταν μεγαλύτεροι από 0,99 για τους πέντε μεταβολίτες. Η ακρίβεια των μετρήσεων κυμάνθηκε από 94,04-105,65% και η επαναληψιμότητα (συντελεστής μεταβλητότητας-CV%) από 2,30-9,62% (πίνακας 11).

3.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΘΕΛΟΝΤΡΙΩΝ

Οι εθελόντριες, οι οποίες ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο ήταν στο σύνολο τους 42 άτομα, εκ των οποίων 25 ήταν μη καπνίστριες και 17 καπνίστριες. Οι 42 εθελόντριες είχαν μέση ηλικία (\pm τυπική απόκλιση) $31,2 \pm 7,5$ έτη (ενδιάμεση τιμή 30,5, εύρος 18-45), μέσο δείκτη μάζας σώματος-BMI (\pm τυπική απόκλιση) (υπολογίζεται ως B/H^2 , όπου B το βάρος σε Kg και H το ύψος σε m) $24,0 \pm 6,0$ (ενδιάμεση τιμή 22,4, εύρος 17,5-40,6) και διάρκεια εμμηνορρυσιακού κύκλου (\pm τυπική απόκλιση) $30,1 \pm 7,1$ ημέρες (ενδιάμεση τιμή 30,0, εύρος 27,0-33,0) (πίνακας 10).

Πίνακας 10. Χαρακτηριστικά των 42 εθελοντριών.

Μεταβλητή	ΜΤ \pm ΤΑ	ΕΤ (εύρος)
Ηλικία (έτη)	$31,2 \pm 7,5$	30,5 (18-45)
Δείκτης μάζας σώματος (BMI, kg/m^2)	$24,0 \pm 6,0$	22,4 (17,5-40,6)
Διάρκεια εμμηνορρυσιακού κύκλου (ημέρες)	$30,1 \pm 7,1$	30,0 (27,0-33,0)
Μη καπνίστριες (n=25)		
Καπνίστριες (n=17)		

Πίνακας 11. Ακρίβεια και επαναληψιμότητα των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου.

	AFMU			1U			1X			17U			17X		
ΠΣ (μM)	ΜΜΣ (μM)	CV (%)	Ακρίβεια (%)	ΜΜΣ (μM)	CV (%)	Ακρίβεια (%)	ΜΜΣ (μM)	CV (%)	Ακρίβεια (%)	ΜΜΣ (μM)	CV (%)	Ακρίβεια (%)	ΜΜΣ (μM)	CV (%)	Ακρίβεια (%)
(n=10)															
25	25,69	8,88	102,76	24,53	4,56	98,13	25,14	8,3	100,54	26,05	5,69	104,19	26,41	9,62	105,65
150	153,44	6,35	102,30	155,07	3,87	103,38	151,41	3,44	100,94	147,54	3,70	98,36	141,05	5,97	94,04
400	404,76	5,22	101,19	389,45	4,17	97,36	395,95	2,30	98,99	388,19	3,51	97,31	396,77	4,81	99,19

ΠΣ: Προσθεθείσα Συγκέντρωση, ΜΜΣ: Μέση Μετρηθείσα Συγκέντρωση, CV%: συντελεστής μεταβλητότητας

3.3 ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΤΙΣ ΟΜΑΔΕΣ ΤΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΡΙΩΝ ΣΤΙΣ ΤΡΕΙΣ ΦΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Στις 25 μη καπνίστριες, οι μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) της 17- β οιστραδιόλης ήταν σημαντικά υψηλότερες στην όψιμη ωοθυλακική ($163,7 \pm 122,5$ pg/ml) σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική ($37,4 \pm 20,6$ pg/ml; $p < 0,001$) και την ωχρινική φάση ($107,3 \pm 57,3$ pg/ml; $p = 0,027$), ενώ υπήρξε και στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ πρώιμης ωοθυλακικής και ωχρινικής φάσεως ($p = 0,005$, One Way RM ANOVA). Τα επίπεδα της προγεστερόνης ήταν σημαντικά υψηλότερα στην ωχρινική ($10,2 \pm 6,9$ ng/ml) σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική ($0,5 \pm 0,3$ ng/ml; $p < 0,05$) και την όψιμη ωοθυλακική φάση ($0,6 \pm 0,4$ ng/ml; $p < 0,05$), ενώ δεν ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ πρώιμης ωοθυλακικής και όψιμης ωοθυλακικής φάσεως ($p > 0,05$, RM ANOVA on Ranks).

Στις 17 καπνίστριες, όσον αφορά τα επίπεδα της 17- β οιστραδιόλης προέκυψε στατιστικώς σημαντική διαφορά μόνο μεταξύ της πρώιμης ωοθυλακικής ($55,0 \pm 23,3$) σε σύγκριση με την όψιμη ωοθυλακική ($145,2 \pm 106,2$; $p < 0,05$) και την ωχρινική φάση ($141,2 \pm 97,9$; $p < 0,05$, RM ANOVA on Ranks). Τα επίπεδα της προγεστερόνης ήταν σημαντικά υψηλότερα μόνο στην ωχρινική φάση ($11,6 \pm 8,5$) σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική ($0,6 \pm 0,3$; $p < 0,05$) και την όψιμη ωοθυλακική φάση ($1,1 \pm 1,1$; $p < 0,05$, RM ANOVA on Ranks). Τα επίπεδα των ορμονών στις τρεις φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου στις μη καπνίστριες ($n=25$) και στις καπνίστριες ($n=17$) απεικονίζονται στον πίνακα 12.

Στις καπνίστριες, σε αντίθεση με το αναμενόμενο, δεν ανιχνεύθηκε διαφορά στα επίπεδα της οιστραδιόλης μεταξύ της όψιμης ωοθυλακικής και των δυο άλλων φάσεων. Με αφορμή το γεγονός αυτό, θεωρήθηκε σημαντικό να διαπιστωθεί αν η χρονική στιγμή της δειγματοληψίας αίματος και ούρων αντιστοιχούσε πραγματικά στις τρεις φάσεις του κύκλου. Για το σκοπό αυτό, απεικονίσαμε ξεχωριστά για την κάθε γυναίκα τις φάσεις στις οποίες έγινε η λήψη των δειγμάτων αίματος και ούρων σε ένα πρότυπο διάγραμμα μεταβολής των ορμονών (FSH, LH, E2, PRG) κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Η απεικόνιση πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπ'όψιν τα επίπεδα των ορμονών (FSH, LH, E2, PRG) της κάθε γυναίκας και συγκρίνοντάς τα με τα πρότυπα επίπεδα των ορμονών στις τρεις φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου (πίνακας 4). Τα διαγράμματα αποκάλυψαν ότι τόσο στις μη καπνίστριες όσο και στις καπνίστριες, σε μερικές περιπτώσεις, υπήρχε αναντιστοιχία μεταξύ των επιπέδων των ορμονών και στην κατ'εκτίμηση φάση του κύκλου

στο οποίο γινόταν η δειγματοληψία. Ενδεικτικά, στην εικόνα 10Α απεικονίζεται περίπτωση εθελόντριας στην οποία υπήρχε αντιστοιχία των επιπέδων των ορμονών με τις τρεις φάσεις του κύκλου και στην εικόνα 10B περίπτωση εθελόντριας στην οποία η δεύτερη φάση δεν αντιστοιχούσε στην όψιμη ωοθυλακική, αλλά λάμβανε χώρα νωρίτερα, λίγο μετά την πρώιμη ωοθυλακική φάση.

Στην συνέχεια, κατόπιν της δεύτερης εξέτασης του δείγματος των εθελοντριών, αφαιρέθηκαν εκείνες οι γυναίκες στις οποίες το ορμονικό προφίλ δεν συνέπιπτε με τις φάσεις του κύκλου, με αποτέλεσμα να πραγματοποιηθεί στατιστική ανάλυση σε 14 μη καπνίστριες και 7 καπνίστριες στις οποίες υπήρχε αντιστοιχία των φάσεων της δειγματοληψίας με τις φάσεις του κύκλου. Στις 14 μη καπνίστριες, οι μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) της 17- β οιστραδιόλης ήταν σημαντικά υψηλότερες στην όψιμη ωοθυλακική φάση ($246,8 \pm 101,5$) σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική ($43,6 \pm 19,2$; $p < 0,001$) και την ωχρινική φάση ($114,8 \pm 54,1$; $p < 0,001$), ενώ υπήρξε και στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ πρώιμης ωοθυλακικής και ωχρινικής φάσεως ($p = 0,025$, One Way RM ANOVA). Όσον αφορά, τα επίπεδα της προγεστερόνης ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μόνο μεταξύ ωχρινικής ($12,0 \pm 6,9$) με την πρώιμη ωοθυλακική ($0,5 \pm 0,4$; $p < 0,001$) και την όψιμη ωοθυλακική φάση ($0,7 \pm 0,4$; $p < 0,001$), ενώ δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στην πρώιμη ωοθυλακική και την όψιμη ωοθυλακική φάση ($p = 0,996$, One Way RM ANOVA) (πίνακας 13).

Στις 7 καπνίστριες, οι μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) της 17- β οιστραδιόλης ήταν σημαντικά υψηλότερες στην όψιμη ωοθυλακική φάση ($251,3 \pm 77,1$) σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική ($67,8 \pm 16,9$; $p < 0,001$) και την ωχρινική φάση ($135,0 \pm 55,1$; $p = 0,001$), ενώ ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά και μεταξύ της πρώιμης ωοθυλακικής και της ωχρινικής φάσεως ($p = 0,042$, One Way RM ANOVA). Τα επίπεδα της προγεστερόνης ήταν σημαντικά υψηλότερα μόνο στην ωχρινική φάση ($12,5 \pm 7,3$) σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική ($0,5 \pm 0,1$; $p < 0,05$) και την όψιμη ωοθυλακική φάση ($0,7 \pm 0,3$; $p < 0,05$, RM ANOVA on Ranks) (πίνακας 13).

Πίνακας 12. Επίπεδα της 17-β οιστραδιόλης (E2) και της προγεστερόνης (PRG) στις τρεις φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου στο συνολικό δείγμα των εθελοντριών.

Φάση του Κύκλου	Μη καπνίστριες (n=25)		Καπνίστριες (n=17)	
	E2 (pg/ml)	PRG (ng/ml)	E2 (pg/ml)	PRG (ng/ml)
	MT ± TA ET (εύρος)	MT ± TA ET (εύρος)	MT ± TA ET (εύρος)	MT ± TA ET (εύρος)
ΠΩΦ	37,4 ± 20,6* 35,0 (5,0-76,0)	0,5 ± 0,3 0,4 (0,2-1,8)	55,0 ± 23,3 [§] 54,0 (8,0-87,0)	0,6 ± 0,3 0,6 (0,3-1,6)
ΟΩΦ	163,7 ± 122,5** 131,0 (21,0-446,0)	0,6 ± 0,4 0,5 (0,1-1,5)	145,2 ± 106,2 103,0 (24,0-367,0)	1,1 ± 1,1 0,8 (0,3-4,4)
ΩΦ	107,3 ± 57,3*** 103,0 (17,0-236,0)	10,2 ± 6,9# 10,9 (0,5-28,2)	141,2 ± 97,9 102,0 (39,0-428,0)	11,6 ± 8,5* 10,9 (0,6-27,7)

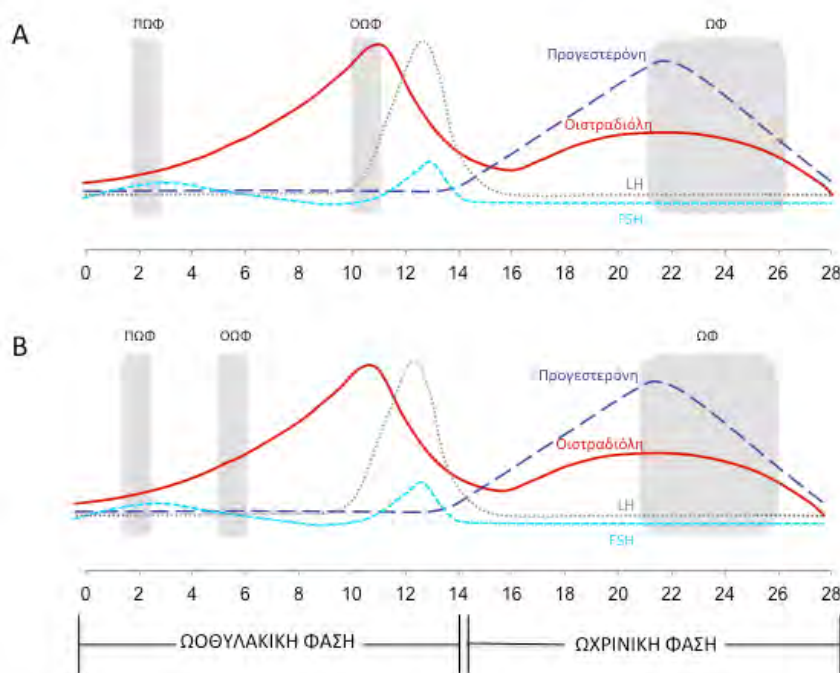
ΠΩΦ-Πρώιμη Ωοθυλακική Φάση, ΟΩΦ-Όψιμη Ωοθυλακική Φάση, ΩΦ-Ωχρινική Φάση

*p<0,001 μεταξύ ΠΩΦ και ΟΩΦ, **p=0,027 μεταξύ ΟΩΦ και ΩΦ, ***p=0,005 μεταξύ ΩΦ και ΠΩΦ, One Way RM ANOVA

#p<0,05 μεταξύ ΩΦ και ΠΩΦ και μεταξύ ΩΦ και ΟΩΦ, RM ANOVA on Ranks

§p<0,05 μεταξύ ΠΩΦ και ΟΩΦ και μεταξύ ΠΩΦ και ΩΦ, RM ANOVA on Ranks

*p<0,05 μεταξύ ΩΦ και ΠΩΦ και μεταξύ ΩΦ και ΟΩΦ, RM ANOVA on Ranks



Εικόνα 10. Πρότυπα διαγράμματα μεταβολής των ορμονών (FSH, LH, E2, PRG) κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου και φάσεις στις οποίες έγινε η λήψη δειγμάτων αίματος και ούρων. Α. Παράδειγμα εθελόντριας στην οποία η πρώτη φάση λήψης των δειγμάτων αίματος και ούρων αντιστοιχεί στην πρώιμη ωοθυλακική, η δεύτερη φάση αντιστοιχεί στην όψιμη ωοθυλακική και η τρίτη φάση αντιστοιχεί στην ωχρινική φάση. Β. Παράδειγμα εθελόντριας, στην οποία η πρώτη και η τρίτη φάση αντιστοιχούν στην πρώιμη ωοθυλακική και ωχρινική φάση, αντίστοιχα, ενώ η δεύτερη

φάση δεν αντιστοιχεί στην όψιμη ωοθυλακική αλλά έλαβε χώρα νωρίτερα, λίγο μετά την πρώιμη ωοθυλακική φάση, όπου τα επίπεδα των οιστρογόνων βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα (βλ. κείμενο).

Πίνακας 13. Επίπεδα της 17-β οιστραδιόλης (E2) και της προγεστερόνης (PRG) στις εθελόντριες στις οποίες υπάρχει πλήρης αντιστοιχία των επιπέδων των ορμονών με τις τρεις φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου.

Φάση του Κύκλου	Μη καπνίστριες (n=14)		Καπνίστριες (n=7)	
	E2 (pg/ml)	PRG (ng/ml)	E2 (pg/ml)	PRG (ng/ml)
	MT ± TA ET (εύρος)	MT ± TA ET (εύρος)	MT ± TA ET (εύρος)	MT ± TA ET (εύρος)
ΠΩΦ	43,6 ± 19,2 41,5 (9,0-76,0)	0,5 ± 0,4 0,4 (0,3-1,8)	67,8 ± 16,9 [§] 61,0 (45,0-87,0)	0,5 ± 0,1 0,6 (0,3-0,8)
ΟΩΦ	246,8 ± 101,5* 216,0 (107,0-446,0)	0,7 ± 0,4 0,5 (0,2-1,5)	251,3 ± 77,1 ^{§§} 230,0 (157,0-367,0)	0,7 ± 0,3 0,7 (0,3-1,2)
ΩΦ	114,8 ± 54,1** 110,5 (17,0-206,0)	12,0 ± 6,9* 12,2 (0,9-28,2)	135,0 ± 55,1 ^{§§§} 109,0 (82,0-216,0)	12,5 ± 7,3* 10,9 (2,6-21,8)

ΠΩΦ-Πρώιμη Ωοθυλακική Φάση, ΟΩΦ-Όψιμη Ωοθυλακική Φάση, ΩΦ-Ωχρινική Φάση

*p<0,001 μεταξύ ΟΩΦ και ΠΩΦ και μεταξύ ΟΩΦ και ΩΦ, **p=0,025 μεταξύ ΩΦ και ΠΩΦ, One Way RM ANOVA

#p<0,001 μεταξύ ΩΦ και ΠΩΦ και μεταξύ ΩΦ και ΟΩΦ, One Way RM ANOVA

§p<0,001 μεταξύ ΠΩΦ και ΟΩΦ, §§p=0,001 μεταξύ ΟΩΦ και ΩΦ, §§§p=0,042 μεταξύ ΩΦ και ΠΩΦ, One Way RM ANOVA

*p<0,05 μεταξύ ΩΦ και ΠΩΦ και μεταξύ ΩΦ και ΟΩΦ, RM ANOVA on Ranks

3.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΙ ΛΟΓΟΙ ΤΗΣ ΚΑΦΕΪΝΗΣ ΠΟΥ ΑΝΤΑΝΑΚΛΟΥΝ ΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ CYP1A2, CYP2A6, ΧΟ, NAT-2 ΣΤΙΣ ΟΜΑΔΕΣ ΤΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΡΙΩΝ ΣΤΙΣ ΤΡΕΙΣ ΦΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Στην πρώιμη ωοθυλακική φάση, όπου οι τιμές των οιστρογόνων και της προγεστερόνης είναι χαμηλές, οι μέσες τιμές (τυπική απόκλιση) του μεταβολικού λόγου AFMU+1X+1U/17U που αντικατοπτρίζει τη δραστηριότητα του CYP1A2, στις 25 μη καπνίστριες ήταν 3,18 ± 1,00 και στις 17 καπνίστριες 5,20 ± 2,11 διαφέροντας στατιστικώς σημαντικά (p<0,001, Mann-Whitney test). Όσον αφορά, το μεταβολικό λόγο 17U/(17U+17X) που αντανακλά τη δραστηριότητα του CYP2A6 οι μέσες τιμές (± τυπική απόκλιση) στις 25 μη καπνίστριες ήταν 0,59 ± 0,12 και στις 17 καπνίστριες 0,62 ± 0,12 και δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά (p=0,421, t-test). Οι μέσες τιμές (± τυπική απόκλιση) του μεταβολικού λόγου 1U/(1X+1U) που αντικατοπτρίζει τη δραστηριότητα της ΧΟ στις 25 μη

καπνίστριες ήταν $0,51 \pm 0,06$ και στις 17 καπνίστριες $0,53 \pm 0,05$ και δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά ($p=0,326$, t-test).

Η NAT-2 είναι πολυμορφικό ένζυμο και για το λόγο αυτό οι εθελόντριες χωρίστηκαν σε δυο ομάδες: των βραδέων και των ταχέων ακετυλιωτριών. Ο διαχωρισμός έγινε με βάση την οριακή τιμή (cut-off point) 0,25, η οποία αναφέρεται σε μελέτη που αφορά δείγμα ελληνικού πληθυσμού (Begas et al., 2007). Από τις 42 εθελόντριες, οι 27 εθελόντριες (64,3%) είχαν τιμές μικρότερες του 0,25 και χαρακτηρίστηκαν ως βραδείες ακετυλιώτριες και οι 15 εθελόντριες (35,7%) είχαν τιμές μεγαλύτερες του 0,25 και χαρακτηρίστηκαν ως ταχείες ακετυλιώτριες. Σε κανένα άτομο δε μεταβλήθηκε ο φαινότυπος της βραδέως ή της ταχέως ακετυλιώτριας στις διάφορες φάσεις του κύκλου.

Από τις 25 μη καπνίστριες, οι 17 ήταν βραδείες ακετυλιώτριες και οι 8 ήταν ταχείες ακετυλιώτριες και από τις 17 καπνίστριες, οι 10 ήταν βραδείες και οι 7 ταχείες ακετυλιώτριες της NAT-2. Στην πρώιμη ωοθυλακική φάση, οι μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) του μεταβολικού λόγου $AFMU/(AFMU+1U+1X)$ που αντανακλά τη δραστηριότητα της NAT-2 στις 17 βραδείες ακετυλιώτριες μη καπνίστριες ήταν $0,08 \pm 0,03$ και στις 10 βραδείες ακετυλιώτριες καπνίστριες $0,08 \pm 0,02$ και δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά ($p=0,939$, Mann-Whitney test). Επίσης, οι μέσες τιμές (τυπική απόκλιση) στις 8 ταχείες ακετυλιώτριες μη καπνίστριες ήταν $0,39 \pm 0,05$ και στις 7 ταχείες ακετυλιώτριες καπνίστριες $0,36 \pm 0,05$ και δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά ($p=0,303$, t-test).

Η δραστηριότητα του CYP1A2 μεταξύ των τριών φάσεων εμμηνορρυσιακού κύκλου στο συνολικό δείγμα των εθελοντριών ($n=42$) λαμβάνοντας υπόψιν τις διαφορετικές συμμεταβλητές, δηλαδή, την ηλικία, το BMI, το κάπνισμα και τον πολυμορφισμό CYP1A2*1F διερευνήθηκε με το γενικό γραμμικό μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (Repeated Measures General Linear Model). Η δραστηριότητα του CYP1A2 ήταν σημαντικά χαμηλότερη στην όψιμη ωοθυλακική φάση (3.42 ± 0.19) σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική (3.89 ± 0.25 ; $p<0.05$) και την ωχρινική φάση (3.92 ± 0.26 ; $p<0.05$), ενώ δεν ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στην πρώιμη ωοθυλακική και την ωχρινική φάση. Από όλες τις συμμεταβλητές, μόνο το κάπνισμα βρέθηκε να επηρεάζει την δραστηριότητα του CYP1A2 ($p<0.05$, Repeated Measures General Linear Model).

Αναλυτικότερα, στο συνολικό δείγμα των 25 μη καπνιστριών, οι μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) του μεταβολικού λόγου για το CYP1A2 ήταν σημαντικά χαμηλότερες στην όψιμη

ωοθυλακική φάση ($2,76 \pm 0,77$) σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική ($3,18 \pm 1,00$; $p < 0,05$) και την ωχρινική φάση ($3,06 \pm 0,84$; $p < 0,05$), ενώ δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ πρώιμης ωοθυλακικής και ωχρινικής φάσεως ($p > 0,05$, RM ANOVA on Ranks). Στο συνολικό δείγμα των 17 καπνιστριών, δεν ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη δραστηριότητα του CYP1A2 στις τρεις φάσεις του κύκλου: $5,20 \pm 2,11$ στην πρώιμη ωοθυλακική, $4,41 \pm 1,26$ στην όψιμη ωοθυλακική και $4,93 \pm 1,49$ στην ωχρινική φάση ($p = 0,134$, One Way RM ANOVA). Στις 14 μη καπνίστριες, στις οποίες υπήρχε αντιστοιχία των φάσεων της δειγματοληψίας με τις τρεις φάσεις του κύκλου, οι μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) του μεταβολικού λόγου του CYP1A2 ήταν σημαντικά χαμηλότερες στην όψιμη ωοθυλακική φάση ($2,57 \pm 0,67$) σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική ($2,96 \pm 0,69$; $p = 0,008$) και την ωχρινική φάση ($3,00 \pm 0,87$; $p = 0,004$), ενώ δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ πρώιμης ωοθυλακικής και ωχρινικής φάσεως ($p = 0,959$, One Way RM ANOVA). Στις 7 καπνίστριες, στις οποίες υπήρχε αντιστοιχία των φάσεων της δειγματοληψίας με τις τρεις φάσεις του κύκλου, δεν ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη δραστηριότητα των CYP1A2 μεταξύ των τριών φάσεων του κύκλου: $5,25 \pm 2,21$ στην πρώιμη ωοθυλακική, $4,06 \pm 1,05$ στην όψιμη ωοθυλακική και $4,73 \pm 1,52$ στην ωχρινική φάση ($p = 0,230$, One Way RM ANOVA). Οι τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης που αντανακλούν τη δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2 στις ομάδες των εθελοντριών στις τρεις φάσεις του κύκλου απεικονίζονται στον πίνακα 14.

Μελέτες έχουν δείξει ότι το κάπνισμα δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα του CYP2A6 (Begas et al., 2007; Nowell et al., 2002; Sinues et al., 2008), της XO (Begas et al., 2007; Saruwatari et al., 2002; Aklillu et al., 2003; Carrillo and Benitez, 1994; Benowitz et al., 2003; Rasmussen and Brosen., 1996; Chung et al., 2000) και της NAT-2 (Le Marchand et al., 1996; Begas et al., 2007; Benowitz et al., 2003; Saruwatari et al., 2002; Rasmussen and Brosen., 1996), σε αντίθεση με τη δραστηριότητα του CYP12A. Προκειμένου να διερευνήσουμε την επίδραση του εμμηνορρυσιακού κύκλου και ειδικότερα των οιστρογόνων στη δραστηριότητα των CYP2A6, XO και NAT-2, εφόσον το κάπνισμα δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα τους συμπεριλάβαμε σε μια κατηγορία τις μη καπνίστριες ($n=14$) και καπνίστριες ($n=7$) εθελόντριες, στις οποίες υπάρχει πλήρης αντιστοιχία των επιπέδων των ορμονών με τις τρεις φάσεις του κύκλου.

Στις 21 εθελόντριες (μη καπνίστριες, $n=14$ και καπνίστριες, $n=7$) στις οποίες υπήρχε πλήρης αντιστοιχία των επιπέδων των ορμονών με τις τρεις φάσεις του εμμηνορρυσιακού

κύκλου, οι μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) του μεταβολικού λόγου για το CYP2A6 ήταν σημαντικά υψηλότερες στην όψιμη ωοθυλακική φάση ($0,70 \pm 0,13$) σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική φάση ($0,60 \pm 0,12$; $p < 0,05$), ενώ δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ όψιμης ωοθυλακικής και ωχρινικής φάσεως ($0,63 \pm 0,12$; $p > 0,05$) καθώς επίσης και μεταξύ πρώιμης ωοθυλακικής και ωχρινικής φάσεως ($p > 0,05$, RM ANOVA on Ranks).

Στις 21 εθελόντριες, δεν ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη δραστηριότητα της ΧΟ μεταξύ των τριών φάσεων του κύκλου. Αναλυτικά, οι μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) του μεταβολικού λόγου για την ΧΟ στην πρώιμη ωοθυλακική φάση ήταν $0,52 \pm 0,06$, στην όψιμη ωοθυλακική φάση ήταν $0,52 \pm 0,05$ και στην ωχρινική φάση $0,51 \pm 0,05$ ($p = 0,675$, One Way RM ANOVA).

Όσον αφορά τη NAT-2, από τις 14 μη καπνίστριες, οι 10 ήταν βραδείες και οι 4 ταχείες ακετυλιώτριες. Επίσης, από τις 7 καπνίστριες, μόνο 1 ήταν βραδεία ακετυλιώτρια και οι υπόλοιπες 6 ταχείες ακετυλιώτριες. Προέκυψαν τελικά 11 βραδείες και 10 ταχείες ακετυλιώτριες. Στις 11 βραδείες ακετυλιώτριες, οι μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) του μεταβολικού λόγου για τη NAT-2 ήταν σημαντικά υψηλότερες στην όψιμη ωοθυλακική φάση ($0,09 \pm 0,02$) σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική ($0,07 \pm 0,02$; $p = 0,002$) και την ωχρινική φάση ($0,07 \pm 0,02$; $p < 0,001$), ενώ δεν ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ πρώιμης ωοθυλακικής και ωχρινικής φάσεως ($p = 0,971$, One Way RM ANOVA). Στις ταχείες ακετυλιώτριες δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών φάσεων του κύκλου. Αναλυτικά, οι μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) του μεταβολικού λόγου της NAT-2 στις 11 ταχείες ακετυλιώτριες ήταν $0,36 \pm 0,05$ στην πρώιμη ωοθυλακική φάση, $0,38 \pm 0,06$ στην όψιμη ωοθυλακική και $0,36 \pm 0,04$ στην ωχρινική φάση ($p = 0,536$, One Way RM ANOVA). Οι τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης που αντανακλούν τη δραστηριότητα των ενζύμων CYP2A6, ΧΟ και NAT-2 (βραδείες και ταχείες ακετυλιώτριες) στις 21 εθελόντριες (μη καπνίστριες, $n = 14$ και καπνίστριες, $n = 7$), στις οποίες υπάρχει πλήρης αντιστοιχία των επιπέδων των ορμονών με τις τρεις φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου παρουσιάζονται στον πίνακα 15.

Πίνακας 14. Τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης που αντανακλούν τη δραστικότητα του ενζύμου CYP1A2 στις τρεις φάσεις του κύκλου, στο συνολικό δείγμα των μη καπνιστριών (n=25) και καπνιστριών (n=17) καθώς επίσης στις μη καπνίστριες (n=14) και στις καπνίστριες (n=7), στις οποίες υπάρχει αντιστοιχία των φάσεων της δειγματοληψίας με τις τρεις φάσεις του κύκλου.

CYP1A2 MT ± TA ET (εύρος)	ΜΗ ΚΑΠΝΙΣΤΡΙΕΣ (n=25)	ΚΑΠΝΙΣΤΡΙΕΣ (n=17)	ΜΗ ΚΑΠΝΙΣΤΡΙΕΣ (n=14)	ΚΑΠΝΙΣΤΡΙΕΣ (n=7)
ΠΩΦ	3,18 ± 1,00 3,06 (1,79-6,30)	5,20 ± 2,11 4,45 (2,42-9,27)	2,96 ± 0,69 [§] 3,09 (1,79-3,96)	5,25 ± 2,21 4,45 (2,53-9,27)
ΟΩΦ	2,76 ± 0,77* 2,59 (1,86-4,36)	4,41 ± 1,26 4,37 (2,50-7,05)	2,57 ± 0,67 ^{§§} 2,54 (1,86-4,34)	4,06 ± 1,05 4,37 (2,50-5,38)
ΩΦ	3,06 ± 0,84 2,99 (1,75-5,09)	4,93 ± 1,49 4,75 (2,55-7,48)	3,00 ± 0,87 3,03 (1,75-5,09)	4,73 ± 1,52 4,39 (2,86-7,48)

ΠΩΦ-Πρώιμη Ωοθυλακική Φάση, ΟΩΦ-Όψιμη Ωοθυλακική Φάση, ΩΦ-Ωχρινική Φάση

*p<0,05, μεταξύ ΟΩΦ με ΠΩΦ και μεταξύ ΟΩΦ με ΩΦ, RM ANOVA on Ranks

[§]p=0,008 μεταξύ ΠΩΦ και ΟΩΦ, ^{§§}p=0,004 μεταξύ ΟΩΦ και ΩΦ, One Way RM ANOVA

Πίνακας 15. Τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης που αντανακλούν τη δραστικότητα των ενζύμων CYP2A6, ΧΟ και NAT-2 (βραδείες και ταχείες ακετυλιώτριες) στις τρεις φάσεις του κύκλου στις 21 εθελόντριες (Μη Καπνίστριες, n=14 και Καπνίστριες, n=7), στις οποίες υπάρχει αντιστοιχία των φάσεων της δειγματοληψίας με τις φάσεις του κύκλου.

ΜΗ ΚΑΠΝΙΣΤΡΙΕΣ (n=14) ΚΑΙ ΚΑΠΝΙΣΤΡΙΕΣ (n=7)	CYP2A6 MT ± TA ET (εύρος)	ΧΟ MT ± TA ET (εύρος)	NAT-2, Βραδείες Ακετυλιώτριες MT ± TA ET (εύρος)	NAT-2, Ταχείες Ακετυλιώτριες MT ± TA ET (εύρος)
ΠΩΦ	0,60 ± 0,12 0,59 (0,32-0,80)	0,52 ± 0,06 0,52 (0,41-0,61)	n=11 0,07 ± 0,02 [§] 0,07 (0,05-0,12)	n=10 0,36 ± 0,05 0,35 (0,29-0,44)
ΟΩΦ	0,70 ± 0,13* 0,74 (0,42-0,91)	0,52 ± 0,05 0,53 (0,41-0,62)	n=11 0,09 ± 0,02 ^{§§} 0,09 (0,06-0,12)	n=10 0,38 ± 0,06 0,40 (0,27-0,44)
ΩΦ	0,63 ± 0,13 0,66 (0,42-0,86)	0,51 ± 0,05 0,50 (0,43-0,59)	n=11 0,07 ± 0,02 0,07 (0,05-0,10)	n=10 0,36 ± 0,04 0,34 (0,32-0,45)

ΠΩΦ-Πρώιμη Ωοθυλακική Φάση, ΟΩΦ-Όψιμη Ωοθυλακική Φάση, ΩΦ-Ωχρινική Φάση

*p<0,05, μεταξύ ΟΩΦ με ΠΩΦ, RM ANOVA on Ranks

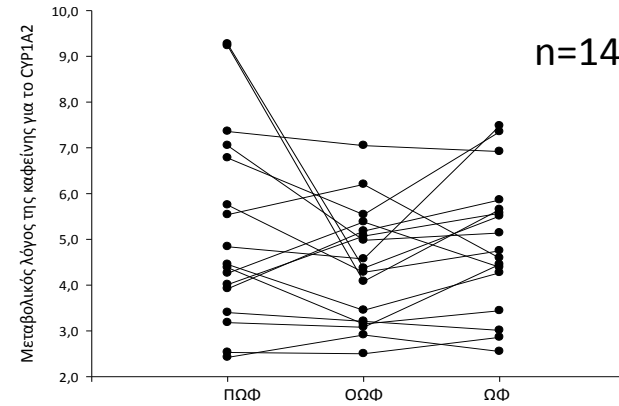
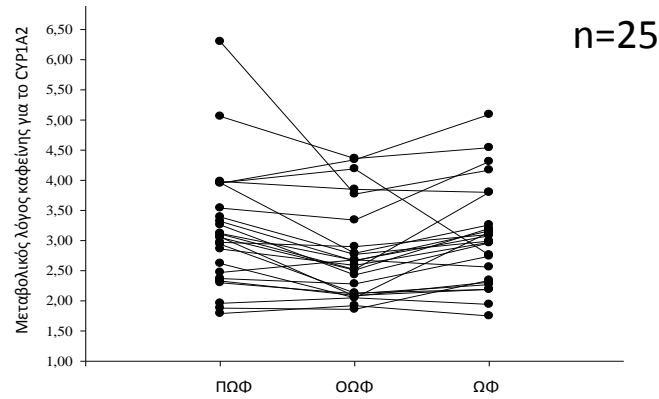
[§]p=0,002 μεταξύ ΠΩΦ και ΟΩΦ, ^{§§}p<0,001 μεταξύ ΟΩΦ και ΩΦ, One Way RM ANOVA

Οι διασπορές των τιμών των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης για το CYP1A2 στις τρεις φάσεις του κύκλου στις ομάδες των εθελοντριών παρουσιάζονται στην εικόνα 11. Τα ραβδογράμματα των μέσων τιμών του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για το CYP1A2, την 17-β οιστραδιόλη και την προγεστερόνη στις διάφορες ομάδες των εθελοντριών στις τρεις

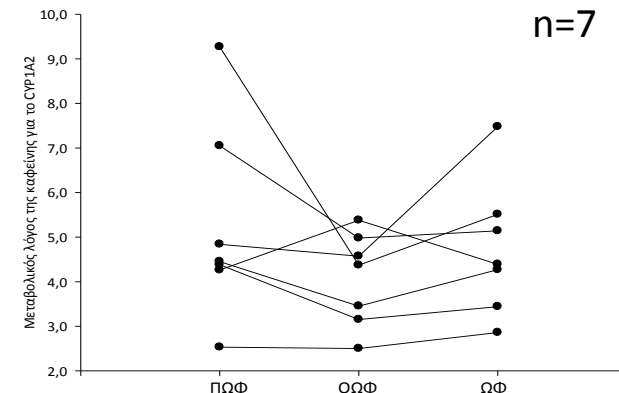
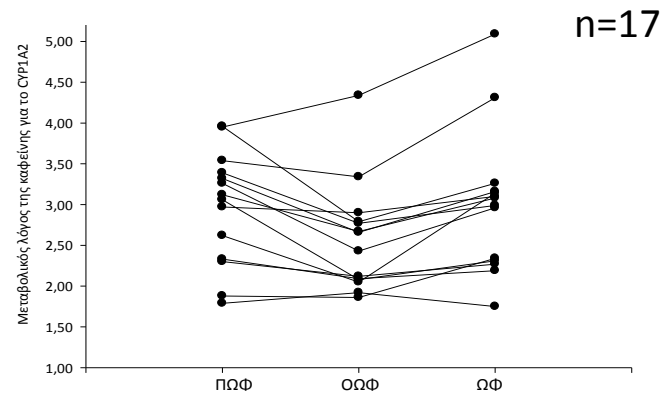
φάσεις του κύκλου απεικονίζονται στις εικόνες 12 και 13. Τα ραβδογράμματα των μέσων τιμών του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για το CYP2A6, την XO και της NAT-2 (βραδείες ακετυλιώτριες και ταχείες ακετυλιώτριες) στις 21 εθελόντριες (14 μη καπνίστριες και 7 καπνίστριες), στις οποίες υπάρχει αντιστοιχία των φάσεων της δειγματοληψίας με τις τρεις φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου απεικονίζονται στην εικόνα 14.

CYP1A2 CMR

A Μη καπνίστριες



B Καπνίστριες



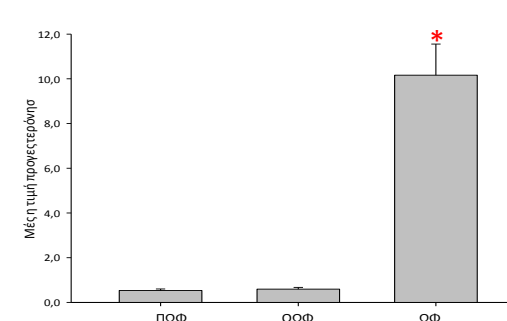
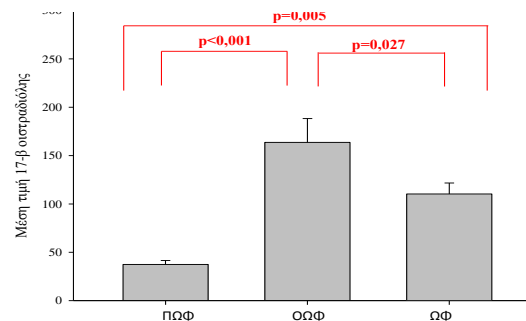
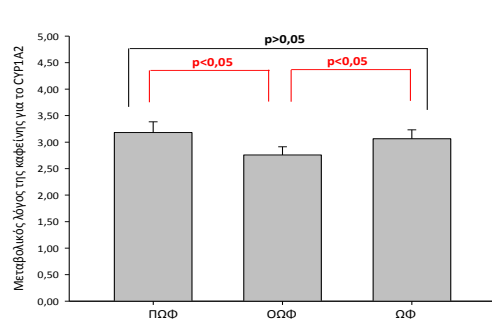
Εικόνα 11. Διαγράμματα των διασπορών των τιμών του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για το CYP1A2. **A.** στο συνολικό δείγμα των εθελοντριών, μη καπνίστριες (n=25) και καπνίστριες (n=17) στις τρεις φάσεις του κύκλου και **B.** στις εθελόντριες στις οποίες υπάρχει αντιστοιχία των φάσεων της δειγματοληψίας με τις τρεις φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου, μη καπνίστριες (n=14) και καπνίστριες (n=7). Π0Φ-Πρώιμη Ωοθυλακική Φάση, Ο0Φ-Όψιμη Ωοθυλακική Φάση, ΩΦ-Ωχρινική Φάση.

CYP1A2 CMR

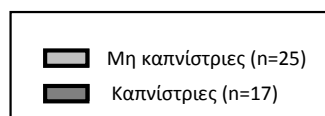
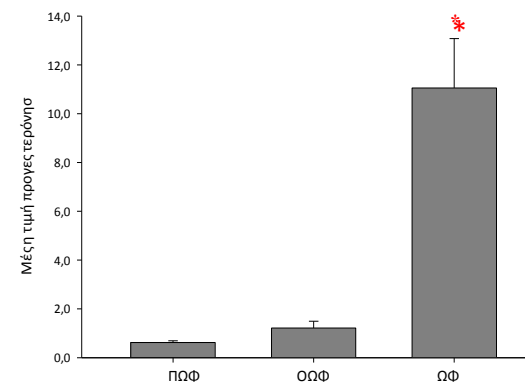
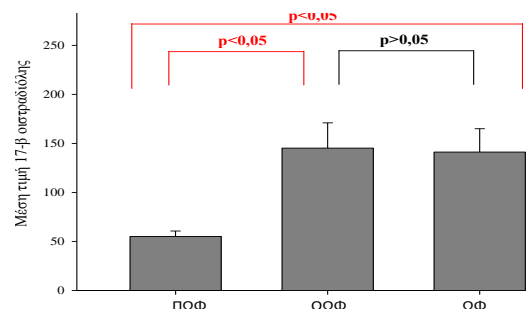
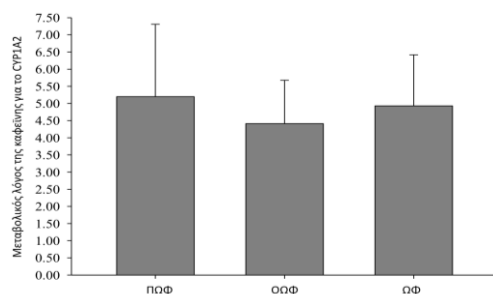
E2

PRG

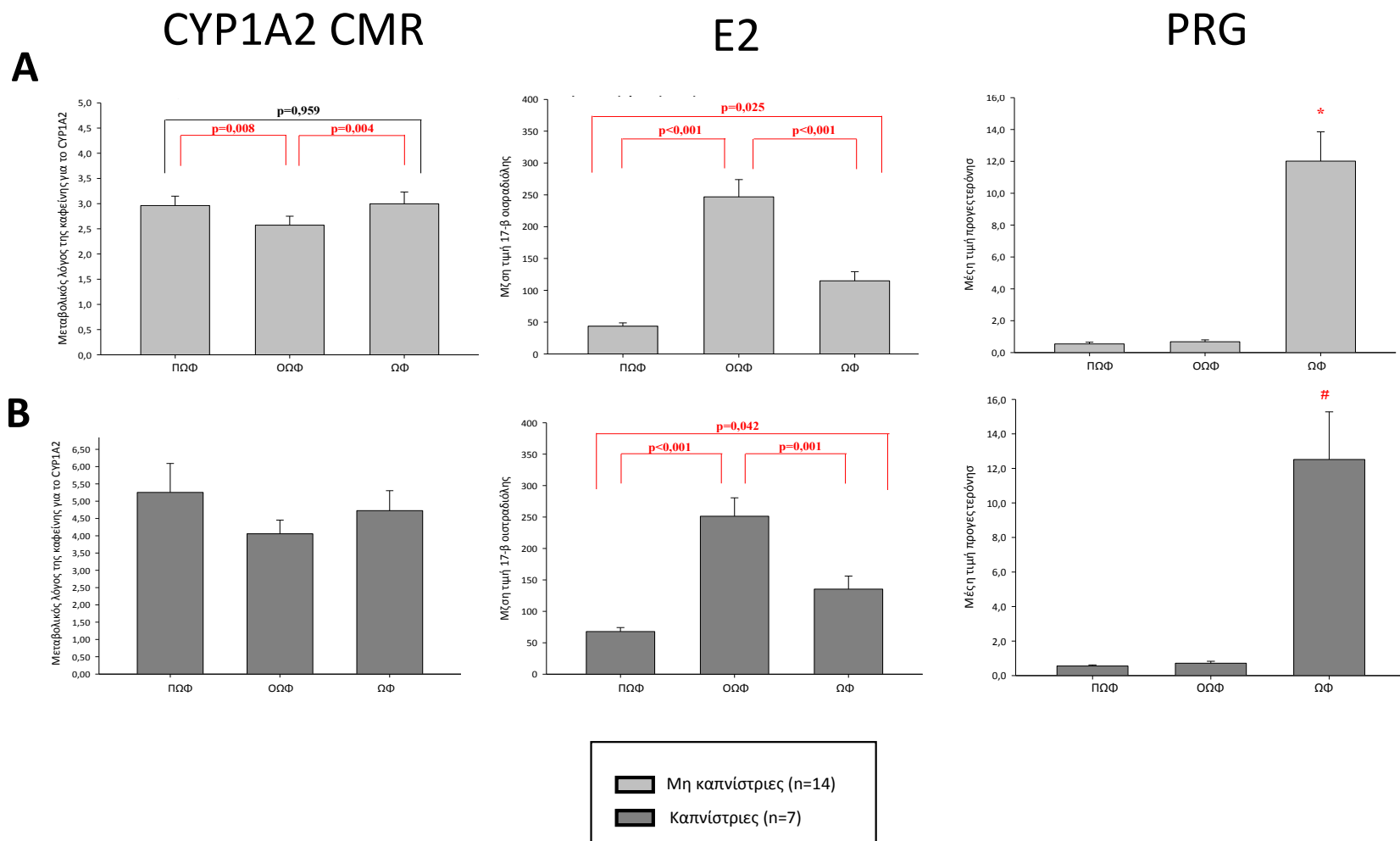
A



B

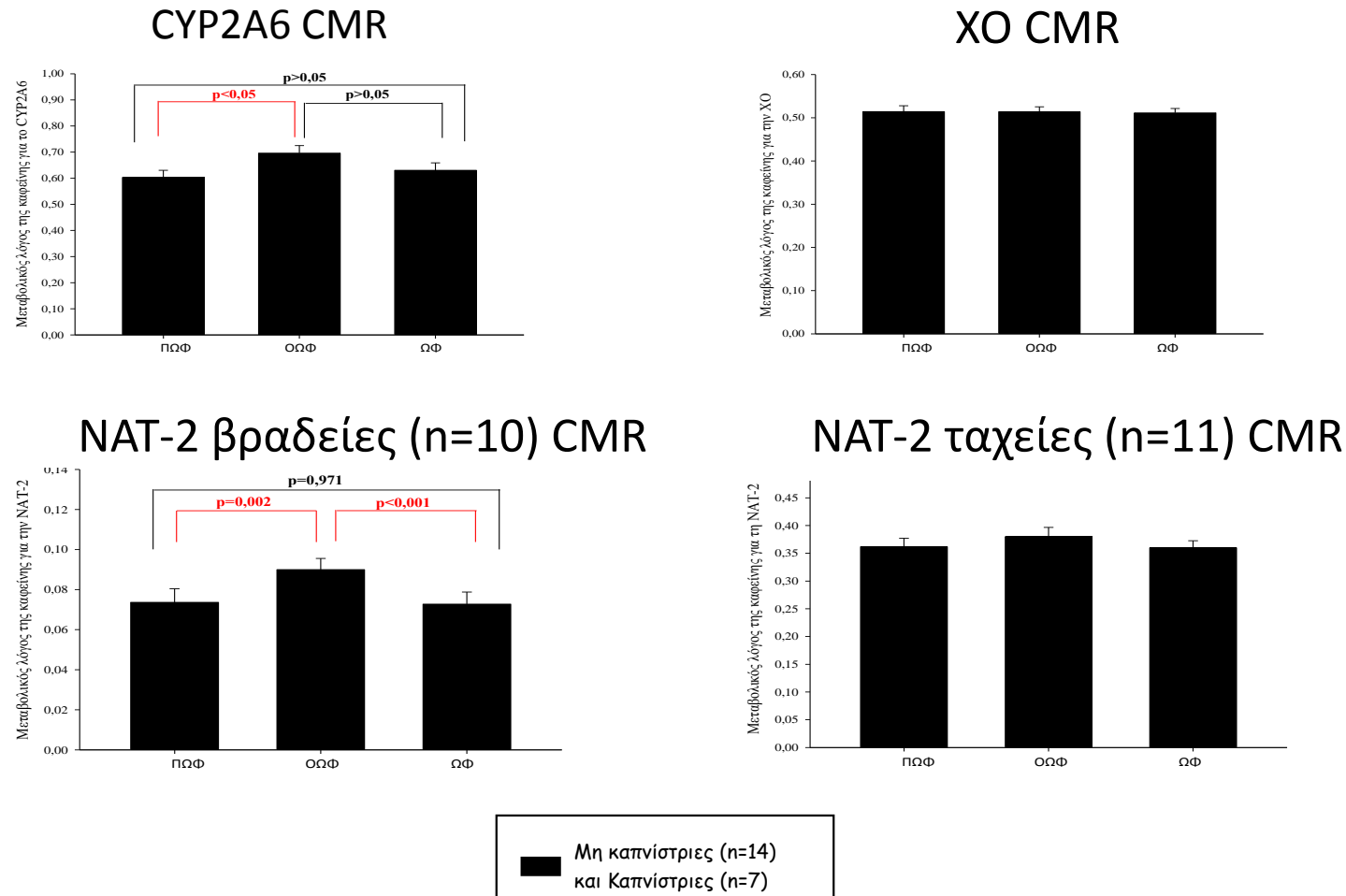


Εικόνα 12. Ραβδογράμματα των μέσων τιμών του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για το CYP1A2, της 17-β οιστραδιόλης (E2) και της προγεστερόνης (PRG). **A.** στο συνολικό δείγμα των μη καπνίστριων (n=25) και **B.** στο συνολικό δείγμα των καπνιστριών (n=17) στις τρεις φάσεις του κύκλου. * $p < 0,05$ μεταξύ ΩΦ και ΠΩΦ και μεταξύ ΩΦ και ΟΩΦ, RM ANOVA on Ranks. ΠΩΦ-Πρώιμη Ωοθυλακική Φάση, ΟΩΦ-Όψιμη Ωοθυλακική Φάση, ΩΦ-Ωχρινική Φάση.



Εικόνα 13. Ραβδογράμματα των μέσων τιμών του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για το CYP1A2, της 17-β οιστραδιόλης (E2) και της προγεστερόνης (PRG). **A.** στις μη καπνίστριες (n=14) και **B.** στις καπνίστριες (n=7), στις οποίες υπάρχει αντιστοιχία των φάσεων της δειγματοληψίας με τις τρεις φάσεις κύκλου.

* $p < 0,05$ μεταξύ ΩΦ και ΠΩΦ και μεταξύ ΩΦ και ΟΩΦ, RM ANOVA on Ranks, # $p < 0,001$ μεταξύ ΩΦ και ΠΩΦ και μεταξύ ΩΦ και ΟΩΦ, One Way RM ANOVA. ΠΩΦ-Πρώιμη Ωοθυλακική Φάση, ΟΩΦ-Όψιμη Ωοθυλακική Φάση, ΩΦ-Ωχρινική Φάση.



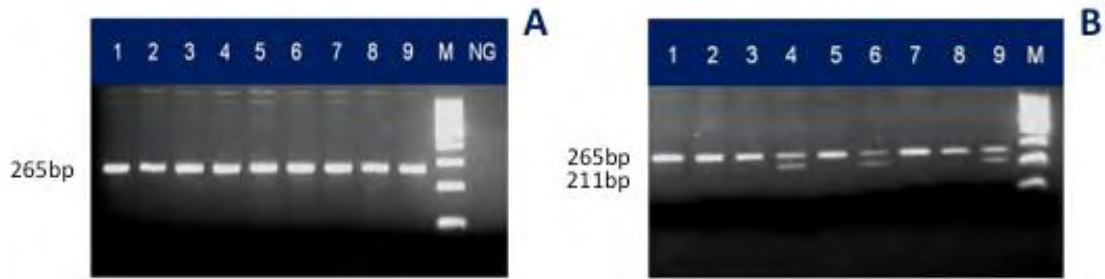
Εικόνα 14. Ραβδογράμματα των μέσων τιμών του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για CYP2A6, XO, βραδείες ακετυλιώτριες (n=11) της NAT-2 και ταχείες ακετυλιώτριες (n=10) της NAT-2 στις 21 εθελόντριες (14 μη καπνίστριες και 7 καπνίστριες), στις οποίες υπάρχει αντιστοιχία των φάσεων της δειγματοληψίας με τις τρεις φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Πρφ-Πρώιμη Ωοθυλακική Φάση, Ορφ-Όψιμη Ωοθυλακική Φάση, Ρφ-Ωχρινική Φάση.

3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ CYP1A2*1F ΚΑΙ CYP1A2*1C ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ CYP1A2

Οι συχνότητες για τον πολυμορφισμό CYP1A2*1F (-163 C>A) ήταν 25/44 (56,8%) για το γονότυπο C/A, 18/44 (40,9%) για το γονότυπο A/A και 1/44 (2,3%) για το γονότυπο C/C, ενώ ο πολυμορφισμός G>A στην -3860 θέση (CYP1A2*1C) δεν ανιχνεύθηκε. Αναλυτικότερα, από τις 25 μη καπνίστριες οι 14 είχαν γονότυπο C/A, οι 10 A/A και 1 C/C και από τις 19 καπνίστριες οι 11 είχαν γονότυπο C/A και οι 8 A/A. Οι αναμενόμενες συχνότητες των γονοτύπων, σύμφωνα με το μοντέλο Hardy-Weinberg είναι 18,72, 21,13 και 4,15 για τους γονοτύπους C/A, A/A και C/C αντίστοιχα. Οι παρατηρηθείσες συχνότητες δεν διέφεραν σημαντικά από τις αναμενόμενες σύμφωνα με τη δοκιμασία χ^2 (chi square test, $p=0,084$).

Στην εικόνα 15 απεικονίζονται τα προϊόντα πολλαπλασιασμού της PCR από τα γενωμικά DNAs που διαχωρίστηκαν από το περιφερικό αίμα των 44 εθελοντριών και τα προϊόντα πολλαπλασιασμού της PCR-RFLP για τον πολυμορφισμό CYP1A2*1F. Τα προϊόντα της PCR διασπάστηκαν με τη βοήθεια του περιοριστικού ενζύμου BslI και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης. Τα διάφορα τμήματα του DNA απεικονίζονται σαν ζώνες πάνω στην πηκτή αγαρόζης. Ο A/A γονότυπος ανιχνεύεται στις θέσεις 1,2,3,5,7,8 και ο γονότυπος C/A στις θέσεις 4,6,9.

Έγινε εκτίμηση της επίδρασης του γονοτύπου του πολυμορφισμού CYP1A2*1F στη φαινοτυπική δραστηριότητα του CYP1A2. Η φαινοτυπική δραστηριότητα του ενζύμου ανάμεσα στις A/A και τις C/A εθελόντριες προσδιορίστηκε υπολογίζοντας τους μεταβολικούς λόγους της καφεΐνης (AFMU+1U+1X)/17U στην πρώιμη ωοθυλακική φάση του κύκλου, στην οποία τα οιστρογόνα βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα. Οι μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στις μη καπνίστριες με γονότυπο A/A ήταν $3,09 \pm 0,52$ και στις μη καπνίστριες με γονότυπο C/A ήταν $3,35 \pm 1,22$ μη διαφέροντας στατιστικώς σημαντικά ($p=0,537$, t-test). Αντίθετα, οι καπνίστριες με γονότυπο A/A είχαν μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) $5,71 \pm 1,69$ σημαντικά υψηλότερες σε σύγκριση με τις καπνίστριες με γονότυπο C/A και μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) $4,32 \pm 1,63$ ($p=0,048$, Mann-Whitney test; πίνακας 16; εικόνα 16).

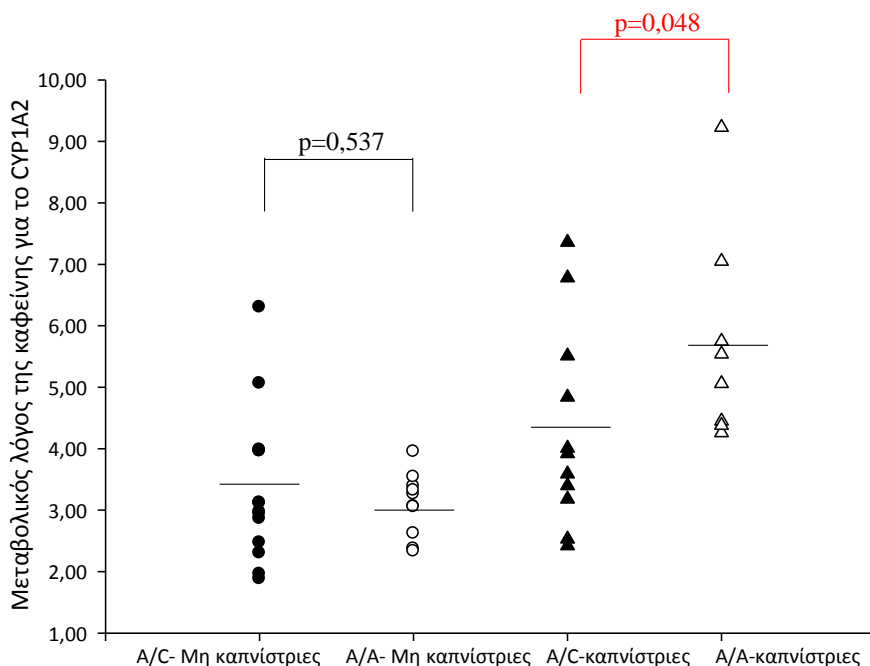


Εικόνα 15. Τα προϊόντα της PCR και της PCR-RFLP. **A.** Τα προϊόντα πολλαπλασιασμού της PCR M: 100 bp DNA μάρτυρας (Fermentas Inc., Hanover, MD), N: αρνητικό δείγμα. **B.** Τα προϊόντα πολλαπλασιασμού της PCR-RFLP για τον πολυμορφισμό CYP1A2*1F. A/A γονότυπος: θέσεις 1,2,3,5,7,8 και C/A γονότυπος: θέσεις 4, 6, 9.

Πίνακας 16. Γονότυπος (πολυμορφισμός CYP1A2*1F) και φαινότυπος (τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης που αντανακλούν τη δραστηριότητα του CYP1A2) σε μη καπνίστριες και καπνίστριες.

ΜΗ ΚΑΠΝΙΣΤΡΙΕΣ (n=25)			ΚΑΠΝΙΣΤΡΙΕΣ (n=19)		
ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ CYP1A2*1F		ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ CYP1A2 MT ± TA ET (εύρος)	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ CYP1A2*1F		ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ CYP1A2 MT ± TA ET (εύρος)
A/A	n=10	3,09 ± 0,52 3,16 (2,33-3,95)	A/A	n=8	5,71 ± 1,69 [#] 5,30 (4,26-9,23)
C/A	n=14	3,35 ± 1,22 3,04 (1,88-6,30)	C/A	n=11	4,32 ± 1,63 3,92 (2,42-9,27)
C/C	n=1	1,79	C/C	n=0	-

[#]p=0,048, μεταξύ καπνιστριών με γονότυπο AA και καπνιστριών με γονότυπο AC, Mann-Whitney test



Εικόνα 16. Κατακόρυφες κατανομές των τιμών του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για το CYP1A2 στις μη καπνίστριες (n=25) και στις καπνίστριες (n=19) σε σχέση με το γονότυπο του πολυμορφισμού CYP1A2*1F (Μη καπνίστριες με γονότυπο C/A, Μη καπνίστριες με γονότυπο A/A, Καπνίστριες με γονότυπο C/A, Καπνίστριες με γονότυπο A/A). Η μέση τιμή του CYP1A2 σε κάθε ομάδα σημειώνεται με παύλα.

Επιπρόσθετα, για την ανίχνευση πιθανής συσχέτισης του γονοτύπου του πολυμορφισμού CYP1A2*1F με τα επίπεδα των οιστρογόνων, εκτιμήθηκε η φαινοτυπική δραστηριότητα του ενζύμου στις τρεις φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου μέσα στον ίδιο γονότυπο. Αναλυτικά, από τις 25 μη καπνίστριες οι 10 με γονότυπο A/A είχαν μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης σημαντικά χαμηλότερες στην όψιμη ωοθυλακική φάση ($2,65 \pm 0,71$) σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική ($3,09 \pm 0,52$; $p=0,018$) και την ωχρινική φάση ($3,21 \pm 0,88$; $p=0,003$), ενώ δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ πρώιμης ωοθυλακικής και ωχρινικής φάσεως ($p=0,681$, One Way RM ANOVA). Όμοια, από τις 25 μη καπνίστριες οι 14 με γονότυπο C/A είχαν μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης σημαντικά χαμηλότερες στην όψιμη ωοθυλακική φάση ($2,89 \pm 0,82$) σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική ($3,35 \pm 1,22$; $p<0,05$) και την ωχρινική φάση ($3,06 \pm 0,79$; $p<0,05$), ενώ δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ πρώιμης ωοθυλακικής και ωχρινικής φάσεως ($p>0,05$; RM ANOVA on Ranks). Από τις 17 συνολικά καπνίστριες, οι οποίες ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο, τόσο οι 10 με γονότυπο C/A όσο και οι 7 με γονότυπο A/A δεν εμφάνισαν

στατιστικώς σημαντική διαφορά στις μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στις τρεις φάσεις του κύκλου. Αναλυτικά, οι 10 με γονότυπο C/A είχαν μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης $4,77 \pm 2,29$ στην πρώιμη ωοθυλακική φάση, $4,35 \pm 1,43$ στην όψιμη ωοθυλακική φάση και $5,16 \pm 1,86$ στην ωχρινική φάση ($p=0,202$, One Way RM ANOVA) και οι 7 με γονότυπο A/A $5,81 \pm 1,81$, $4,50 \pm 1,08$ και $4,60 \pm 0,70$ αντίστοιχα ($p=0,076$, One Way RM ANOVA). Από τις 14 μη καπνίστριες, στις οποίες υπήρχε αντιστοιχία των φάσεων της δειγματοληψίας με τις τρεις φάσεις του κύκλου, οι 5 με γονότυπο C/A είχαν μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης σημαντικά χαμηλότερες στην όψιμη ωοθυλακική φάση ($2,47 \pm 0,45$) σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική ($2,85 \pm 0,80$; $p<0,05$) και την ωχρινική φάση ($2,81 \pm 0,47$; $p<0,05$), ενώ δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ πρώιμης ωοθυλακικής και ωχρινικής φάσεως ($p>0,05$, RM ANOVA on Ranks) και οι 8 με γονότυπο A/A είχαν μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης σημαντικά χαμηλότερες στην όψιμη ωοθυλακική φάση ($2,72 \pm 0,79$) σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική ($3,18 \pm 0,51$; $p=0,049$) και την ωχρινική φάση ($3,27 \pm 0,98$; $p=0,02$), ενώ δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ πρώιμης ωοθυλακικής και ωχρινικής φάσεως ($p=0,881$, One Way RM ANOVA). Από τις 7 καπνίστριες, στις οποίες υπήρχε αντιστοιχία των φάσεων της δειγματοληψίας με τις τρεις φάσεις του κύκλου, οι 3 είχαν γονότυπο C/A και οι 4 γονότυπο A/A και δεδομένου του μικρού αριθμού σε συνδυασμό με την επαγωγή του καπνίσματος δεν προχωρήσαμε σε στατιστική ανάλυση. Τα ανωτέρω αποτελέσματα είναι όμοια με αυτά στα οποία καταλήξαμε και όταν δε διαχωρίσαμε τις εθελόντριες με βάση το γονότυπο τους και απεικονίζονται στον πίνακα 17.

Πίνακας 16. Τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης που αντανακλούν τη δραστηριότητα του CYP1A2- MT ± TA, ET (εύρος) στις τρεις φάσεις του κύκλου, στις ομάδες των εθελοντριών με βάση το γονότυπό τους (πολυμορφισμός CYP1A2*1F)

Γονότυπος CYP1A2*1F	Μη καπνίστριες (n=25)		Μη καπνίστριες (n=14)		Καπνίστριες (n=17)	
	A/A (n=10)	C/A (n=14)	A/A (n=8)	C/A (n=5)	A/A (n=7)	C/A (n=10)
ΠΩΦ	3,09 ± 0,52 3,16 (2,33-3,95)	3,35 ± 1,22 3,04 (1,88-6,30)	3,18 ± 0,51 3,29 (2,33-3,95)	2,85 ± 0,80 2,97 (1,88-3,96)	5,81 ± 1,81 5,54 (4,26-9,23)	4,77 ± 2,29 3,96 (2,42-9,27)
ΟΩΦ	2,65 ± 0,71* 2,47 (2,05-4,34)	2,89 ± 0,82# 2,67 (1,86-4,36)	2,72 ± 0,79 [§] 2,54 (2,05-4,34)	2,47 ± 0,45 ^κ 2,67 (1,86-2,90)	4,50 ± 1,08 4,28 (3,15-6,20)	4,35 ± 1,43 4,47 (2,50-7,05)
ΩΦ	3,21 ± 0,88** 3,06 (2,19-5,09)	3,06 ± 0,79 3,02 (1,94-4,54)	3,27 ± 0,98 ^{§§} 3,06 (2,19-5,09)	2,81 ± 0,47 3,08 (2,27-3,26)	4,60 ± 0,70 4,59 (3,44-5,65)	5,16 ± 1,86 5,54 (2,55-7,48)

ΠΩΦ-Πρώιμη Ωοθυλακική Φάση, ΟΩΦ-Όψιμη Ωοθυλακική Φάση, ΩΦ-Ωχρινική Φάση

*p=0,018 μεταξύ ΟΩΦ και ΠΩΦ, **p=0,003 μεταξύ ΩΦ και ΟΩΦ, One Way RM ANOVA

#p<0,05 μεταξύ ΟΩΦ και ΠΩΦ και μεταξύ ΟΩΦ και ΩΦ, RM ANOVA on Ranks

§p=0,049 μεταξύ ΟΩΦ και ΠΩΦ, §§p=0,02 μεταξύ ΩΦ και ΟΩΦ, One Way RM ANOVA

κp<0,05 μεταξύ ΟΩΦ και ΠΩΦ και μεταξύ ΟΩΦ και ΩΦ, RM ANOVA on Ranks

4.0 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με βάση στατιστικές μελέτες, ο γυναικείος πληθυσμός υπερτερεί αριθμητικά αυτού του ανδρικού και περισσότερες γυναίκες απ'ότι άνδρες διαγνώσκονται με χρόνιες παθήσεις. Είναι φανερό λοιπόν, ότι είναι κρίσιμης σημασίας η ανάγκη να γνωρίζουμε την επίδραση των φαρμάκων στις γυναίκες. Επίσης, είναι γνωστό ότι τα ορμονικά σκευάσματα συνιστούν μια από τις πλέον συνταγογραφούμενες ομάδες φαρμάκων στο γυναικείο πληθυσμό και έχουν διατυπωθεί ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια κατά τη χορήγησή τους.

Η συντριπτική πλειοψηφία των κλινικών μελετών, οι οποίες θεωρητικά αντιπροσωπεύουν τον γενικότερο πληθυσμό περιλαμβάνουν ως δείγμα μελέτης μόνο άνδρες παρά το γεγονός ότι συνεχώς αυξανόμενες πληροφορίες υποδεικνύουν ότι μεταξύ των δύο φύλων υφίστανται διαφορές τόσο στη φυσιολογία όσο και στη παθολογία τους, πέραν εκείνων, βεβαίως, που σχετίζονται με το αναπαραγωγικό σύστημα. Κατά συνέπεια, υπάρχουσες διαφορές στη φαρμακινητική και φαρμακοδυναμική δεν έχουν διερευνηθεί, ενώ ελάχιστες είναι οι μελέτες εκείνες που έχουν αξιολογήσει την επίδραση που ασκούν οι υπάρχουσες διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο φύλων στη γονιδιακή ρύθμιση και έκφραση, στο ορμονικό προφίλ, καθώς και στην αλληλεπίδραση αυτών. Η κατανόηση των διαφορών μεταξύ των δύο φύλων όσον αφορά στην απαντητικότητα τους στα φάρμακα, αναμένεται να βοηθήσει στην αύξηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων και να επιτρέψει την εξατομίκευση θεραπειών τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες.

Οι μεγάλες διακυμάνσεις στα επίπεδα των ορμονών που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου θα μπορούσαν να έχουν σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό των φαρμάκων. Ωστόσο, μικρός μόνο αριθμός αναφορών, που δείχνουν την επίδραση του εμμηνορρυσιακού κύκλου στην φαρμακοκινητική των φαρμάκων, είναι διαθέσιμος μέχρι σήμερα. Έχει παρατηρηθεί αυξημένος μεταβολισμός της μεθακαλόνης (κατασταλτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος) κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιωρρηξίας (Wilson et al., 1982), της φαινυτοΐνης κατά τη διάρκεια της εμμηνορρυσίας (Shavit et al., 1984) και της μεθυλπρεδνιζολόνης κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης (Lew et al., 1993) του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Αντίθετα, μειωμένος μεταβολισμός έχει παρατηρηθεί στη θεοφυλλίνη (Bruguerolle et al., 1990) και στην παρακεταμόλη κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης (Wojciki et al., 1979), καθώς και στην

ομепραζόλη κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης (Nazir et al., 2015) του εμμηνορρυσιακού κύκλου.

Για να ελεγχθεί η παραπάνω υπόθεση, διερευνήθηκε η επίδραση των διαφόρων φάσεων του εμμηνορρυσιακού κύκλου (πρώιμη ωοθυλακική-όψιμη ωοθυλακική-ωχρινική φάση) στην *in vivo* δραστικότητα του ενζύμου του ηπατικού μεταβολισμού CYP1A2, αλλά και των ενζύμων CYP2A6, XO και NAT-2. Οι τρεις συγκεκριμένες φάσεις του κύκλου επιλέχθηκαν με κριτήριο τις σημαντικές αλλαγές που συμβαίνουν στα επίπεδα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, ώστε να ανιχνευθεί επίδραση των ορμονών φύλου στη δραστηριότητα των συγκεκριμένων ενζύμων.

CYP1A2

Στη μελέτη μας, παρατηρήθηκε μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2 στην όψιμη ωοθυλακική φάση σε σύγκριση με τις δυο άλλες φάσεις τόσο στις μη καπνίστριες όσο και στις καπνίστριες, αλλά η διαφορά ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο στις μη καπνίστριες ($p < 0,05$). Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε στις 25 μη καπνίστριες και 17 καπνίστριες του συνολικού δείγματος των 42 εθελοντριών και στις 14 μη καπνίστριες και 7 καπνίστριες του δείγματος των 21 εθελοντριών, το οποίο προέκυψε μετά την αφαίρεση εκείνων των εθελοντριών των οποίων το ορμονικό προφίλ δεν συνέπιπτε με τις φάσεις του κύκλου. Οι 25 μη καπνίστριες και οι 17 καπνίστριες στην όψιμη ωοθυλακική φάση είχαν τα υψηλότερα επίπεδα οιστραδιόλης σε σύγκριση με τις δυο άλλες φάσεις, αν και στις 17 καπνίστριες τα επίπεδα οιστραδιόλης ήταν ηπίως πιο αυξημένα σε σύγκριση με την ωχρινική φάση. Στις 14 μη καπνίστριες και στις 7 καπνίστριες, στις οποίες υπήρχε πλήρης αντιστοιχία των επιπέδων των ορμονών φύλου με τις τρεις φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου, τα επίπεδα των οιστρογόνων ήταν σημαντικά υψηλότερα στην όψιμη ωοθυλακική φάση σε σύγκριση με τις δυο άλλες φάσεις του κύκλου.

Η μείωση της δραστικότητας του CYP1A2 είναι ευρέως γνωστή καθώς χρήση των αντισυλληπτικών έχει σχετισθεί με αύξηση στον χρόνο ημίσειας ζωής της καφεΐνης από 47 έως 235% και μείωση στην κάθαρση της καφεΐνης από 39 έως 66% (Patwardhan et al., 1980; Callahan et al., 1983; Abernethy and Todd, 1985). Επιπλέον, το τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης σχετίζεται με αύξηση 200% στον χρόνο ημίσειας ζωής της καφεΐνης και 70% μείωση στην κάθαρση της καφεΐνης (Aldridge et al., 1981). Η μειωμένη δραστικότητα του CYP1A2, η οποία παρατηρήθηκε σε αυξημένη συγκέντρωση οιστραδιόλης στην παρούσα

μελέτη συμφωνεί με τους Lane et al., 1992 οι οποίοι βρήκαν σημαντική μείωση της κάθαρσης της καφεΐνης κατά την ωχρινική φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Αξίζει, βέβαια να σημειωθεί ότι η προαναφερθείσα μελέτη παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις από την παρούσα: α) η επίδραση του εμμηνορρυσιακού κύκλου μελετήθηκε σε δύο μόνο φάσεις (1-5 ημέρες από την έναρξη του εμμηνορρυσιακού κύκλου η οποία αντιστοιχεί περίπου στην πρώιμη ωοθυλακική φάση της δικής μας μελέτης και -2 έως -12 ημέρες από την έναρξη του επόμενου εμμηνορρυσιακού κύκλου, η οποία αντιστοιχεί, κατά προσέγγιση, στην δική μας ωχρινική φάση), β) δεν αναφέρθηκε κατηγοριοποίηση του δείγματος σε καπνίστριες και μη καπνίστριες και γ) το δείγμα περιελάμβανε μόνο 10 προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Προς την ίδια κατεύθυνση, δηλαδή μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 στο μέσον του κύκλου, βρέθηκε και σε φαρμακοκινητική μελέτη της θεοφυλλίνης, γνωστού υποστρώματος του CYP1A2, που πραγματοποιήθηκε σε 9 προεμμηνοπαυσιακές μη καπνίστριες γυναίκες στις τρεις φάσεις του κύκλου τους (0, 10, 20 ημέρες από την έναρξη του εμμηνορρυσιακού κύκλου) (Bruguerolle et al., 1990). Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, η μέγιστη συγκέντρωση της θεοφυλλίνης στο πλάσμα, ο ελάχιστος μέσος χρόνος παραμονής και ο ελάχιστος χρόνος ημίσειας ζωής παρατηρήθηκαν στο μέσον του κύκλου (10^η ημέρα). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στην προαναφερθείσα μελέτη ο προσδιορισμός των τριών φάσεων του εμμηνορρυσιακού κύκλου έγινε σε παρόμοιους χρόνους με την παρούσα μελέτη καταλήγοντας στο ίδιο συμπέρασμα.

Υπάρχουν άλλες μελέτες οι οποίες δεν αναδεικνύουν διαφορά στην επίδραση του εμμηνορρυσιακού κύκλου στη δραστηριότητα του CYP1A2, οι οποίες, όμως, παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα. Ένα από τα μειονεκτήματα αυτά είναι ο μικρός αριθμός εθελοντριών όπως για παράδειγμα η μελέτη των Kamimori et al., 1999 στην οποία συμμετείχαν 10 υγιείς προεμμηνοπαυσιακές μη καπνίστριες. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι δεν υπήρχε διαφορά στη δραστηριότητα του CYP1A2 μεταξύ των τριών φάσεων του κύκλου. Παρά τον ορθό σχεδιασμό του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό των τριών φάσεων του κύκλου (2-6 ημέρες, 13-16 ημέρες και 22-26 ημέρες μετά την έναρξη της εμμήνου ρύσεως), μόνο οι 3 από τις 10 εθελόντριες παρουσίασαν μέγιστη συγκέντρωση οιστρογόνων στην όψιμη ωοθυλακική φάση σε σύγκριση με τις δύο άλλες φάσεις. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η φαρμακοκινητική μελέτη της καφεΐνης, και επομένως της δραστηριότητας του CYP1A2, πραγματοποιήθηκε σε τρεις φάσεις του κύκλου οι οποίες

ουσιαστικά δεν αντιστοιχούσαν στην πρώιμη, όψιμη ωοθυλακική και ωχρινική φάση. Σε μια δεύτερη μελέτη που διεξήχθη, επίσης, σε 10 προεμμηνοπαυσιακές μη καπνίστριες, χρησιμοποιώντας τον ίδιο μεταβολικό λόγο της καφεΐνης στα ούρα (AFMU+1U+1X)/17U που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή, δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην δραστηριότητα του CYP1A2 μεταξύ δύο φάσεων του κύκλου (5-8 και 17-20 ημέρες από την έναρξη του εμμηνορρυσιακού κύκλου) που μελετήθηκαν (Kashuba et al., 1998). Πλέον του μικρού δείγματος συμμετεχόντων, ένα σημαντικό μειονέκτημα της μελέτης αυτής αποτέλεσε η έλλειψη προσδιορισμού των επιπέδων των οιστρογόνων και της προγεστερόνης στις δύο φάσεις του κύκλου με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η συσχέτιση της επίδρασης των οιστρογόνων στη δραστηριότητα του CYP1A2. Επιπρόσθετα, η μελέτη δεν αναφέρει αν οι εθελόντριες απείχαν από φάρμακα ή τροφές που επηρεάζουν την δραστηριότητα του CYP1A2 καθώς σε μερικές εθελόντριες οι μέσες τιμές των μεταβολικών λόγων του CYP1A2 ήταν πολύ υψηλές σε σχέση με αυτές που παρατηρούνται σε μη καπνίστριες. Ομοίως, οι Zaigler et al., 2000 βρήκαν ότι δεν υπήρχε διαφορά στην κάθαρση της καφεΐνης από δείγματα σιέλου χρησιμοποιώντας το μεταβολικό λόγο 17X/137X σε 15 προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε δύο φάσεις του κύκλου (4-9 ημέρες από την έναρξη του εμμηνορρυσιακού κύκλου και -4 έως -9 ημέρες από την έναρξη του επόμενου εμμηνορρυσιακού κύκλου). Και σε αυτή τη μελέτη, μεγάλο μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι δεν υπήρξε πιστοποίηση των δύο φάσεων του κύκλου με ορμονικούς δείκτες, ενώ το δείγμα περιελάμβανε και καπνίστριες (2/15 εθελόντριες).

Μηχανισμός μειωμένης δραστηριότητας του CYP1A2 στην όψιμη ωοθυλακική φάση

Η μείωση στη δραστηριότητα του CYP1A2 που παρατηρήθηκε στην όψιμη ωοθυλακική φάση της παρούσας μελέτης είναι δυνατόν να αποδοθεί στα υψηλά επίπεδα της οιστραδιόλης κατά την φάση αυτή. Πράγματι, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι τα οιστρογόνα, όπως από του στόματος αντισυλληπτικά χάπια τα οποία περιέχουν αιθινυλοιστραδιόλη, αυξάνουν τις συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων του CYP1A2 στο πλάσμα, όπως της θεοφυλλίνης (Roberts et al., 1983), της καφεΐνης (Abernethy et Todd, 1985) και της τιζανιδίνης *in vivo* (Granfors et al., 2005). Επιπλέον, οι Pollock et al., 1999 χρησιμοποιώντας ως φάρμακο-δείκτη την καφεΐνη, έδειξαν ότι η θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες μειώνει σημαντικά τη δραστηριότητα του CYP1A2.

Η μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2 που παρατηρήθηκε στην όψιμη ωοθυλακική φάση της παρούσας μελέτης δεν μπορεί να αποδοθεί σε αλλαγή των επιπέδων προγεστερόνης καθώς, αντίθετα με την οιστραδιόλη, τα επίπεδα της προγεστερόνης δεν αυξάνονται στη φάση αυτή. Επιπλέον, *in vitro* μελέτες σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα αναφέρουν ότι η προγεστερόνη έχει μικρή ανασταλτική επίδραση στη δραστικότητα του CYP1A2 (ακόμα και στην μέγιστη συγκέντρωση των 100μM που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες αυτές); αντίθετα, η προγεστερόνη παρουσιάζει ανασταλτική δράση στο CYP3A4 και στο CYP2C9 (Zhang et al., 2006; Karjalainen et al., 2008).

Το γεγονός ότι δεν ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη δραστικότητα του CYP1A2 στις καπνίστριες μπορεί να αποδοθεί, ενδεχομένως, στο ότι το κάπνισμα ως επαγωγέας του CYP1A2 μπορεί να συγκαλύψει την ανασταλτική δράση της οιστραδιόλης. Στις 7 καπνίστριες, στις οποίες υπήρχε πλήρης αντιστοιχία των επιπέδων των ορμονών φύλου με τις τρεις φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου, το μικρό μέγεθος του δείγματος πιθανώς, σε συνδυασμό με την επαγωγή του CYP1A2 λόγω του καπνίσματος, να περιορίσει το βαθμό σημαντικότητας. Επιπρόσθετα, το περιορισμένο δείγμα σε αυτή την ομάδα των καπνιστριών δεν επέτρεψε την συσχέτιση του βαθμού καπνίσματος (αριθμός τσιγάρων, είδος καπνού κοκ), και επομένως τον βαθμό επαγωγής του CYP1A2, με τη δραστηριότητα του ενζύμου.

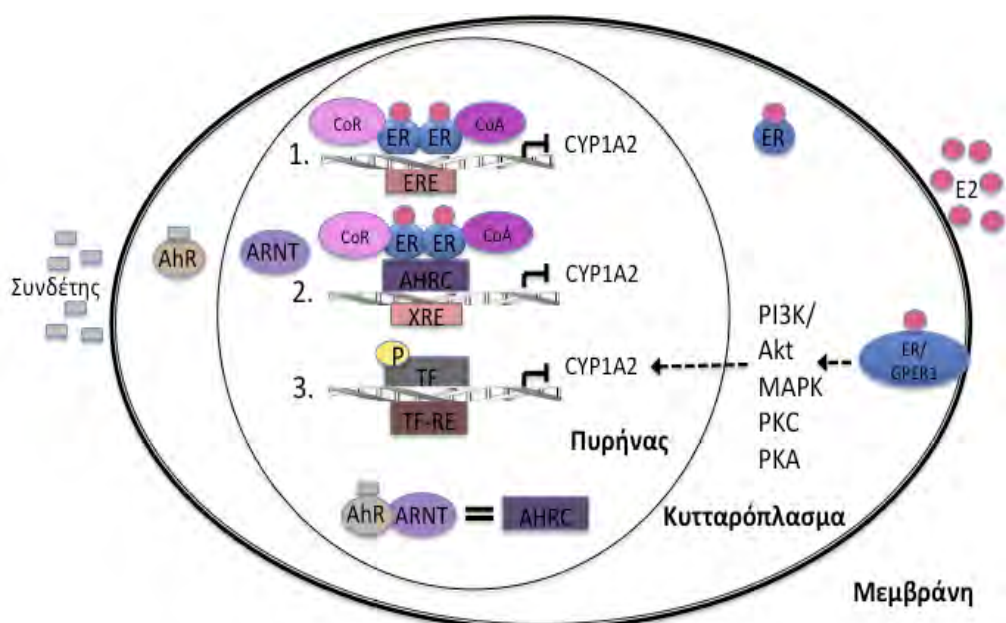
Ο ακριβής τρόπος μέσω του οποίου τα οιστρογόνα μειώνουν τη δραστικότητα του CYP1A2 στην παρούσα μελέτη δεν είναι γνωστός. Εν τούτοις, δύο πιθανοί μηχανισμοί μπορούν να προταθούν για την επεξήγηση του φαινομένου αυτού:

α) *ανταγωνισμός μεταξύ υποστρωμάτων για το ένζυμο CYP1A2*: σύμφωνα με αυτόν το μηχανισμό, υφίσταται ανταγωνισμός μεταξύ των δύο υποστρωμάτων, δηλαδή των οιστρογόνων και της καφεΐνης, για το μεταβολικό ένζυμο. Το είδος του ανταγωνισμού μεταξύ των υποστρωμάτων, συναγωνιστικός έναντι μη-συναγωνιστικού, και επομένως οι ακριβείς θέσεις πρόσδεσης των υποστρωμάτων (ενεργό κέντρο του ενζύμου έναντι άλλης θέσης) παραμένει άγνωστος (Pelkonen, 2008). Ωστόσο, ανεξαρτήτως του είδους του ανταγωνισμού, η σημαντική αύξηση των οιστρογόνων που παρατηρείται κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση είναι πιθανόν να επιφέρει μείωση των διαθέσιμων μορίων του ενζύμου που προσδένονται με την καφεΐνη και επομένως μείωση του μεταβολισμού του υποστρώματος αυτού.

β) μείωση της έκφρασης του γονιδίου του CYP1A2 σε μεταγραφικό επίπεδο: Ένας άλλος μηχανισμός που θα μπορούσε να εξηγήσει τη μείωση του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση, είναι η μειωμένη σύνθεση του ισοενζύμου. Στοιχεία από *in vitro* μελέτες έδειξαν πως η 17-α αιθινυλοιστραδιόλη αποτελεί ασθενή συναγωνιστικό αναστολέα του CYP1A2, προτείνοντας ότι η μείωση της έκφρασης του γονιδίου του CYP1A2 είναι ο πιο πιθανός μηχανισμός μείωσης της δραστηριότητας του CYP1A2 (Chang et al., 2009; Karjalainen et al., 2008).

Όπως έχει προαναφερθεί, η δράση των οιστρογόνων διαμεσολαβείται από τους πυρηνικούς υποδοχείς ERα και ERβ (ERs) και τον συζευγμένο με G-πρωτεΐνες υποδοχέα των οιστρογόνων 1 (GPER1) μέσω τεσσάρων διαφορετικών μηχανισμών σηματοδότησης: 1) άμεση γονιδιωματική σηματοδότηση (επίσης γνωστή ως κλασική οδό του δράση οιστρογόνου), 2) έμμεση γονιδιωματική σηματοδότηση, 3) μη γονιδιωματική σηματοδότηση και 4) ανεξάρτητη του συνδέτη σηματοδότηση (Vrtačnik et al, 2014). Τα οιστρογόνα μπορούν να προκαλέσουν καταστολή της έκφρασης του γονιδίου CYP1A2 μέσω της κλασικής οδού σηματοδότησης τους, μολονότι στοιχεία απόκρισης των οιστρογόνων (ERES) δεν έχουν ακόμη βρεθεί στο γονίδιο του CYP1A2 (εικόνα 17). Ο πιθανός αυτός μηχανισμός, υποστηρίζεται από το γεγονός ότι το κλασικό ER-εξαρτώμενο μονοπάτι συμμετέχει στην έκφραση διαφόρων ισοενζύμων του CYP όπως του CYP2C19 (Mwinyi et al., 2010), του CYP1B1 (Tsuchiya et al., 2004), του CYP2A6 (Higashi et al., 2007) και του CYP2B6 (Lo et al., 2010). Επιπρόσθετα, η έκφραση του CYP1A2 μπορεί να ανασταλεί με την έμμεση γονιδιωματική οδό μέσω διασταυρούμενης συνομιλίας (cross-talk) του ERα με μεταγραφικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα τον υποδοχέα των αρωματικών υδρογονανθράκων (AhR), έναν γνωστό επαγωγέα της οικογένειας CYP1 (Ramadoss et al., 2005). Πράγματι, υπάρχει βιβλιογραφία που επιβεβαιώνει την διασταυρούμενη συνομιλία του ERα με τον AhR (Matthews et al., 2005; Ohtake et al, 2003; Safe and Wormke, 2003). Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι ο ERα καταστέλλει την μεταγραφή των επαγομένων από την 2,3,7,8-тетραχλωροδιβενζο-ρ-διοξίνη (TCDD) CYP1A1 και CYP1B1 μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με το σύμπλοκο του υποδοχέα των αρωματικών υδρογονανθράκων (AHRC) (Beischlag and Perdew, 2005), το οποίο συνδέεται στα στοιχεία απόκρισης ξενοβιοτικών ουσιών (XRES) (Hankinson, 1995). Επομένως, η ανασταλτική δράση των οιστρογόνων στην δραστηριότητα του CYP1A2 είναι πιθανόν να προκαλείται από την αλληλεπίδραση του ERα με μεταγραφικό παράγοντα που οδηγεί σε trans-καταστολή του

AhR (εικόνα 17). Η αναγνώριση των βοηθητικών παραγόντων που συμμετέχουν στην trans-καταστολή αποτελεί ένα ενδιαφέρον πεδίο για μελλοντική έρευνα. Επιπλέον, η καταστολή του CYP1A2 μπορεί να διαμεσολαβείται μέσω της μη-γονιδιωματικής σηματοδότησης με τη φωσφορυλίωση των μεταγραφικών παραγόντων (εικόνα 17). Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από μια μελέτη που αναφέρει ότι η ταμοξιφαίνη, ένας ανταγωνιστής του ER, καταστέλλει την έκφραση του CYP2E1, πιθανώς μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/AKT στα ποντίκια (Konstadi et al., 2013). Απαιτείται πρόσθετη έρευνα για να συσχετιστούν συγκεκριμένα μοριακά μονοπάτια με την ανασταλτική δράση των οιστρογόνων στην έκφραση του CYP1A2, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την αποσαφήνιση της μείωσης της δραστηριότητας CYP1A2 κατά τον εμμηνορρυσιακό κύκλο.



Εικόνα 17. Προτεινόμενοι μηχανισμοί μείωσης της έκφρασης του CYP1A2 μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών των οιστρογόνων. 1. Άμεση γονιδιωματική σηματοδότηση ή κλασική σηματοδότηση: το ενεργοποιημένο σύμπλοκο οιστραδιόλης-υποδοχέα των οιστρογόνων (E2-ER) αλληλεπιδρά απευθείας με τα στοιχεία απόκρισης των οιστρογόνων (ERE) στον προαγωγέα του γονιδίου του CYP1A2 προσελκύοντας συν-ενεργοποιητές και συν-καταστολείς. Οι συν-καταστολείς είναι δυνατόν να καταστείλουν την έκφραση του CYP1A2 γονιδίου. 2. Έμμεση γονιδιωματική σηματοδότηση: το ενεργοποιημένο σύμπλοκο E2-ER συνδέεται με μεταγραφικούς παραγόντες στα δικά τους στοιχεία απόκρισης (TF-RE), με αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου του CYP1A2. Ως παράδειγμα, το ενεργοποιημένο σύμπλοκο E2-ER, κατόπιν συνδέσεως με το σύμπλοκο του υποδοχέα των αρωματικών υδρογονανθράκων (AHRC), το οποίο σχηματίζεται από τον υποδοχέα των αρωματικών υδρογονανθράκων (AhR), και την πρωτεΐνη πυρηνικής μετατόπισης αρωματικών υδρογονανθράκων (ARNT), είναι πιθανόν να καταστείλει την έκφραση του γονιδίου του CYP1A2

μέσω αλληλεπιδράσεως με τα στοιχεία απόκρισης των ξενοβιοτικών ουσιών (XRE). 3. *Μη-γονιδιωματική σηματοδότηση*: η σύνδεση της E2 με μεμβρανικούς υποδοχείς (παραλλαγές των ERs, GPER1) ενεργοποιεί αλυσιδωτές αντιδράσεις κινασών-πρωτεϊνών (MAPK, PI3K/Akt, PKA, PKC), οι οποίες οδηγούν στην καταστολή του CYP1A2 μέσω φωσφορυλίωσης μεταγραφικών παραγόντων.

CYP2A6

Η δραστικότητα του CYP2A6 βρέθηκε να είναι σημαντικώς αυξημένη στην όψιμη σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική φάση στις 21 εθελόντριες, καπνίστριες και μη καπνίστριες, στις οποίες υπήρχε πλήρης αντιστοιχία των επιπέδων των ορμονών φύλου με τις τρεις φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Ο μηχανισμός στον οποίο οφείλεται αυτό το αποτέλεσμα πιθανόν να σχετίζεται με τις ορμόνες φύλου και κυρίως τα οιστρογόνα καθώς προηγούμενες μελέτες φαίνεται να ενισχύουν αυτή την υπόθεση. Οι Sinues et al., 2008 έδειξαν ότι η δραστηριότητα του CYP2A6 ήταν σημαντικά αυξημένη σε 26 προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (13 καπνίστριες και 13 μη καπνίστριες), οι οποίες έκαναν χρήση αντισυλληπτικών χαπιών σε σύγκριση με 76 γυναίκες, οι οποίες δε χρησιμοποιούσαν αντισυλληπτικά, και 76 άντρες. Επιπλέον, έχει αναφερθεί, ότι η εγκυμοσύνη αυξάνει σημαντικά τον μεταβολισμό των υποστρωμάτων του CYP2A6 νικοτίνης και κουμαρίνης κατά 60% και 140%, αντίστοιχα (Dempsey et al., 2002). Από τις προαναφερθείσες μελέτες δεν προκύπτει ξεκάθαρα αν τα οιστρογόνα ή η προγεστερόνη ευθύνονται για την αύξηση της δραστικότητας του CYP2A6. Αντίθετα, σε μια άλλη μελέτη γυναίκες που έκαναν χρήση αντισυλληπτικών μόνο με οιστρογόνα εμφάνισαν υψηλότερη κάθαρση νικοτίνης από εκείνες οι οποίες έκαναν χρήση αντισυλληπτικών μόνο με προγεστερόνη, αλλά και εκείνες που δεν έκαναν καθόλου χρήση αντισυλληπτικών (Benowitz et al., 2006), υποδηλώνοντας ότι τα οιστρογόνα αυξάνουν τη δραστικότητα του CYP2A6.

Προς την ίδια κατεύθυνση βρίσκονται τα αποτελέσματα *in vitro* μελετών. Πράγματι, οι Choi et al., (2013) σε *in vitro* μελέτη ανθρωπίνων ηπατοκυττάρων έδειξαν ότι η οιστραδιόλη αυξάνει την έκφραση του CYP2A6, ενώ η προγεστερόνη επάγει ελάχιστα την έκφραση του CYP2A6 σε συγκεντρώσεις ορμονών ανάλογες αυτών της εγκυμοσύνης. Ο μηχανισμός αύξησης της μεταγραφικής ικανότητας του CYP2A6 φαίνεται να εμπλέκει την ενεργοποίηση του υποδοχέα των οιστρογόνων ERα (Higashi et al., 2007). Αντίθετα, οι Hukkanen et al., 2005 έδειξαν ότι δεν υπάρχει διαφορά στην κάθαρση της νικοτίνης και της κοτινίνης στην όψιμη ωοθυλακική σε σύγκριση με τη ωχρινική φάση του κύκλου. Ενδεχομένως, μικρές αλλαγές των επιπέδων των οιστρογόνων δεν μπορεί να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την

δραστηριότητα ή την έκφραση του CYP2A6 στο ήπαρ, για το λόγο αυτό και δεν ανιχνεύθηκε στη μελέτη μας στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ όψιμης ωοθυλακικής και εκκριτικής φάσεως, όπως και στη μελέτη των Hukkanen et al., 2005, ενώ η χρήση αντισυλληπτικών και η εγκυμοσύνη, όπου αυξάνεται εντυπωσιακά το επίπεδο των οιστρογόνων, έχουν ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του CYP2A6. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι οι αλλαγές στην κάθαρση της καφεΐνης που σχετίζονται με τις φάσεις του κύκλου είναι σχετικά μικρές σε σύγκριση με τις αλλαγές που σχετίζονται με τη χρήση αντισυλληπτικών χαπιών ή στη εγκυμοσύνη.

ΧΟ

Στη μελέτη μας, δεν εμφανίστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στις διάφορες φάσεις του κύκλου στις 21 γυναίκες. Μέχρι σήμερα μόνο μια μελέτη έχει γίνει όσον αφορά τη επίδραση του εμμηνορρυσιακού κύκλου στην δραστηριότητα της ξανθίνης της οξειδάσης στην οποία δεν ανιχνεύθηκε διαφορά στην δραστηριότητα του ενζύμου μεταξύ της μέσης ωοθυλακικής σε σύγκριση με την μέση εκκριτική φάση (Kashuba et al., 1998). Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος μεταβολικός λόγος της καφεΐνης που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία, δηλαδή $1U/(1X+1U)$, καθιστώντας τα αποτελέσματα των δύο μελετών συγκρίσιμα. Επιπλέον, μειονεκτήματα της παραπάνω μελέτης αποτελούν το μικρό δείγμα εθελοντριών (10 μη καπνίστριες) και η έλλειψη προσδιορισμού των επιπέδων των οιστρογόνων και προγεστερόνης στις φάσεις του κύκλου.

Έμμεσο στοιχείο μη επίδρασης των ορμονών φύλου στη δραστηριότητα της ΧΟ αποτελεί το γεγονός ότι το φύλο δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα της ΧΟ όπως αυτή προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του μεταβολικού λόγου $1U/1X$ (Rasmussen and Brosen, 1996; Nowell et al., 2002; Chung et al., 2000) και του μεταβολικού λόγου $1U/(1U+1X)$ (Begas et al., 2007; Aklillu et al., 2003; Saruwatari et al., 2002; Vistisen et al., 1992).

NAT-2

Η δραστηριότητα της NAT-2 βρέθηκε να είναι σημαντικώς αυξημένη στην όψιμη ωοθυλακική φάση σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική φάση και την εκκριτική φάση στις βραδείες ακετυλιώτριες (10 εκ των 21 εθελοντριών). Στις ταχείες ακετυλιώτριες (11 εκ των 21 εθελοντριών) δεν ανιχνεύθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών

φάσεων του κύκλου παρόλο που παρατηρήθηκε αύξηση της NAT-2 στην όψιμη ωοθυλακική φάση σε σύγκριση με τις δυο άλλες φάσεις. Ενδεχομένως, η αύξηση στην δραστικότητα της NAT-2 στη δεύτερη φάση να σχετίζεται με την αύξηση των οιστρογόνων. Έμμεσο στοιχείο που μπορεί να υποστηρίξει την υπόθεση αυτή αποτελεί το γεγονός ότι έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση του m-RNA της NAT-1 σε καρκίνους μαστού θετικούς σε υποδοχείς των οιστρογόνων (Perou et al., 2000; Adam et al., 2003). Τα οιστρογόνα μέσω των υποδοχέων τους μπορεί να εμπλέκονται και στη μεταγραφή της NAT-2. Η ανίχνευση στατιστικά σημαντικής διαφοράς μόνο στις βραδείες ακετυλιώτριες και όχι στις ταχείες μπορεί να οφείλεται στην μεγαλύτερη επίδραση των οιστρογόνων πιθανώς λόγω της μικρότερης ποσότητας ενεργού ενζύμου που έχουν οι βραδείες ακετυλιώτριες. Στη διεθνή βιβλιογραφία, μόνο μια μελέτη, αυτή των Kashuba et al., 1998, η οποία και προαναφέρθηκε ερεύνησε την επίδραση του εμμηνορρυσιακού κύκλου στην δραστηριότητα της NAT-2 χρησιμοποιώντας το μεταβολικό λόγο της καφεΐνης AFMU/(AFMU+1X+1U) σε 7 βραδείες ακετυλιώτριες και σε 3 ταχείες ακετυλιώτριες μη καπνίστριες στην μέση ωοθυλακική σε σύγκριση με την μέση εκκριτική φάση σε τρεις συνεχόμενους κύκλους και στην οποία δεν ανιχνεύθηκε διαφορά στην δραστηριότητα του ενζύμου στις δυο φάσεις του κύκλου τόσο στις βραδείες όσο και στις ταχείες ακετυλιώτριες.

Στο συνολικό δείγμα των 42 εθελοντριών, οι 27 εθελόντριες (64,3%) χαρακτηρίστηκαν ως βραδείες ακετυλιώτριες και οι 15 εθελόντριες (35,7%) ως ταχείες εθελόντριες όπως προαναφέρθηκε. Η αναλογία των βραδέων με τις ταχείες ακετυλιώτριες στη μελέτη μας προσεγγίζει την αντίστοιχη αναλογία 60-40%, η οποία απαντάται στους Καυκάσιους. Στους Καναδούς (Tang et al., 1991), Γάλλους (Pontes et al., 1993), Ισπανούς (Carrillo and Benitez, 1994), Έλληνες (Asproдини et al., 1998; Begas et al., 2007) και Γερμανούς (Cascorbi et al., 1995) το ποσοστό των ταχέων ακετυλιωτών ήταν 59, 61,3, 65,4, 66,3, 63,6 και 55,1% αντίστοιχα, και το ποσοστό των βραδέων ακετυλιωτριών ήταν 41, 38,7, 34,6, 33,7, 36,7 και 44,9% αντίστοιχα.

Γονότυπος του CYP1A2

Στη μελέτη μας βρήκαμε ότι οι συχνότητες για τον πολυμορφισμό CYP1A2*1F (-163 C>A) ήτανε 25/44 (56,8%) για το γονότυπο C/A, 18/44 (40,9%) για το γονότυπο A/A και 1/44 (2,3%) για το γονοτύπο C/C, ποσοστά που συμβαδίζουν με προηγούμενες μελέτες. Οι Dobrinas et al., 2011 ανέφεραν ότι οι συχνότητες των γονοτύπων C/A, A/A και C/C σε ένα

δείγμα πληθυσμού 186 καπνιστών ήταν 43,5%, 46,2 και 10,2% αντίστοιχα. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη 108 ασθενών με σχιζοφρένεια ευρωπαϊκής προέλευσης, οι συχνότητες των γονοτύπων C/A, A/A, και C/C ήταν 45,3%, 35,8% και 18,9% αντίστοιχα (Kohlrausch et al., 2013). Επίσης, η παρατηρούμενη συχνότητα του αλληλόμορφου C ήταν 30,7 %, ποσοστό ανάλογο μελέτης σε 114 Βρετανούς, στην οποία το αλληλόμορφο C του πολυμορφισμού CYP1A2*1F απαντήθηκε στο 33,3% των συμμετεχόντων (Sachse et al., 2003), ενώ η συχνότητα του αλληλόμορφου A ήταν 69,3%, ποσοστό που συμβαδίζει με την μελέτη των Ghotbi et al., 2007, οι οποίοι ανέφεραν 71,4% συχνότητα του πολυμορφισμού C>A σε 194 Σουηδούς.

Ο πολυμορφισμός G>A στην θέση -3860 (CYP1A2*1C) δεν ανιχνεύθηκε στις εθελόντριες μας, υποδηλώνοντας ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός είναι αρκετά σπάνιος στον ελληνικό πληθυσμό, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες σε Καυκάσιους πληθυσμούς. Ο πολυμορφισμός G>A ανιχνεύθηκε στην προαναφερθείσα εργασία των Sachse et al., 2003 μόνο σε 2 από τα 114 άτομα, στη μελέτη των Dobrinas et al., 2011 σε 5 από τα 186 άτομα και στην μελέτη των Kohlrausch et al., 2013 σε 18 από τους 108 ασθενείς. Επιπρόσθετα στη μελέτη των Ghotbi et al., 2007, η συχνότητα του πολυμορφισμού G>A ήταν 0,8%.

Επίσης, τόσο στις μη καπνίστριες με γονότυπο C/A όσο και στις μη καπνίστριες με γονότυπο A/A ανιχνεύσαμε μειωμένη δραστικότητα του CYP1A2 στην όψιμη ωοθυλακική φάση σε σύγκριση με τις δυο άλλες φάσεις, ενώ στις καπνίστριες με γονότυπο C/A και στις καπνίστριες με γονότυπο A/A δεν ανιχνεύθηκε διαφορά στη δραστικότητα του ενζύμου στις διάφορες φάσεις, αποτελέσματα όμοια με αυτά στα οποία καταλήξαμε χωρίς την κατηγοριοποίηση των εθελοντριών με βάση το γονότυπο. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει την θεωρία που υποστηρίζει πως τα οιστρογόνα επηρεάζουν τη δραστικότητα του ενζύμου, μιας και ο γονότυπος στην κάθε εθελόντρια παραμένει ο ίδιος στις διάφορες φάσεις του κύκλου. Στη μελέτη μας, πραγματοποιήσαμε γονοτυπική ανάλυση του CYP1A2 σε συνδυασμό με τη φαινοτυπική ανάλυση και τα επίπεδα των ορμονών φύλου στις διάφορες φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες που εξέτασαν τη δραστικότητα του CYP1A2 σε σχέση με το γονότυπο, χρησιμοποιώντας δείγματα πληθυσμού και των δύο φύλων, χωρίς αναφορά στην ορμονική κατάσταση των γυναικών (Sachse et al., 1999; Sachse et al., 2003; Castorena-Torres et al., 2005; Ghotbi et al., 2007; Dobrinas et al., 2011).

Επιπρόσθετα, η συσχέτιση του γονοτύπου του πολυμορφισμού CYP1A2*1F με τη φαινοτυπική δραστηριότητα του ενζύμου αποκάλυψε ότι οι καπνίστριες με γονότυπο A/A εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη δραστηριότητα του CYP1A2 σε σύγκριση με τις καπνίστριες με γονότυπο C/A σε αντίθεση με τις μη καπνίστριες, στις οποίες δεν ανιχνεύθηκε ανάλογη διαφορά. Παρόμοια ευρήματα, μέσω του λόγου παραξανθίνης/καφεΐνης στο πλάσμα, παρατηρήθηκαν και από άλλους ερευνητές (Sachse et al, 1999; Ghotbi et al, 2007; Gunes et al, 2009). Επίσης, υψηλότερη δραστηριότητα του CYP1A2 παρατηρήθηκε σε άνδρες με γονότυπο A/A σε σύγκριση με φορείς C/A κατόπιν έκθεσης σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Castorena-Torres et al., 2005). Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι ο γονότυπος A/A προσδίδει ενισχυμένη επαγωγικότητα του CYP1A2 σε συνθήκες έκθεσης του ενζύμου σε επαγωγείς, πιθανώς μέσω της διαφορικής σύνδεσης εν δυνάμει ρυθμιστικών πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα υψηλότερο ποσοστό αδρανοποίησης υποστρωμάτων του CYP1A2, όπως τα συνταγογραφούμενα φάρμακα.

Το παραπάνω εύρημα μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας για την προσαρμογή της δοσολογίας των χορηγούμενων φαρμάκων που μεταβολίζονται από το CYP1A2 σε άτομα που είναι καπνιστές και εκτείνονται σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες ή άλλους επαγωγείς του CYP1A2. Στη μελέτη των Kohlrausch et al., 2013 παρατηρήθηκε ότι ο γονότυπος A/A σχετίστηκε σημαντικά με επιληπτικές κρίσεις επαγόμενες από την κλοζαπίνη σε ασθενείς με σχιζοφρένεια συνδέοντας την παρενέργεια του φαρμάκου με το γονότυπο του CYP1A2. Επομένως, η φαινοτυπική και γονοτυπική ανάλυση του CYP1A2 αποτελεί σημαντική βοήθεια όταν παρουσιάζονται απροσδόκητες παρενέργειες των φαρμάκων ή μη ανταπόκριση στη θεραπεία.

Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι γενετικοί πολυμορφισμοί του CYP1A2 και συγκεκριμένοι γονότυποι σχετίζονται με αυξημένο ή μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Σε μελέτη 220 προεμμηνοπαυσιακών γυναικών, στην οποία ερευνήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των οιστρογόνων στον ορό και γενετικών πολυμορφισμών βρέθηκε ότι οι εθελόντριες με γονότυπο C/C του πολυμορφισμού CYP1A2*1F είχαν 26,3% χαμηλότερα επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό από τις εθελόντριες με γονότυπο C/A και A/A, υποδηλώνοντας ότι ο γονότυπος C/C μπορεί να σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (Lurie et al., 2005). Επίσης, αυξημένος κίνδυνος καρκίνου του μαστού συνδέθηκε με αυξημένη δραστηριότητα του CYP1A2 σε μελέτη στην οποία συμμετείχαν 146 προεμμηνοπαυσιακές και 149 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Hong et al.,

2004). Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός αυτό, μπορεί να υποτεθεί ότι οι γυναίκες που εκτίθενται σε παράγοντες που επάγουν το CYP1A2 και φέρουν τον γονότυπο A/A μπορεί να εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού. Ο πολυμορφισμός CYP1A2*1F, έχει συσχετιστεί με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου με τους φορείς A/A να διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης αδενωμάτων του παχέος εντέρου, σε σύγκριση με τους φορείς C/A και C/C, λόγω της μεγαλύτερης ικανότητας να παράγουν μεταλλαξιόγόνες ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες (Moonen et al., 2005). Υψηλότερη μεταβολική δραστηριότητα του CYP1A2 συσχετίστηκε επίσης με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου ή πολυπόδων νόσου σε διάφορες μελέτες, ιδιαίτερα σε άτομα που εκτίθενται σε ετεροκυκλικές αμίνες και είναι καπνιστές (Lang et al., 1994, Le Marchand et al., 2002).

Λαμβάνοντας υπόψιν την σημαντικότητα του ρόλου του CYP1A2 στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών καθώς και στο μεταβολισμό των οιστρογόνων, συνεπάγεται ότι ο συνδυασμός της φαινοτυπικής δραστηριότητας και της γονοτυπικής ανάλυσης του CYP1A2 μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την εξατομίκευση θεραπειών, τον κίνδυνο εμφάνισης και την πρόληψη καρκίνου.

Ο εμμηνορρυσιακός κύκλος είναι ένα δυναμικό φαινόμενο, η διάρκεια του οποίου ποικίλει από γυναίκα σε γυναίκα καθώς και στην ίδια γυναίκα από κύκλο σε κύκλο και τα επίπεδα των ορμονών φύλου μεταβάλλονται διαρκώς. Για το λόγο αυτό καθίσταται δύσκολη η ανίχνευση υψηλών επιπέδων των οιστρογόνων μόνο από την επιλογή συγκεκριμένων ημερών στις διάφορες φάσεις του κύκλου. Στη μελέτη μας, από τις 42 αρχικά εθελόντριες που ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο κατόπιν απεικόνισης καθεμίας ξεχωριστά σε πρότυπα διαγράμματα επιπέδων των ορμονών φύλου στις τρεις φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου, μόνο σε 21 τελικά η κάθε φάση (πρώιμη ωοθυλακική, όψιμη ωοθυλακική, εκκριτική) του κύκλου αξιολογήθηκε σωστά, γεγονός που το έδειξαν και οι συγκεντρώσεις των ορμονών τους, στην κάθε φάση του κύκλου.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη τα στοιχεία δείχνουν μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 στην όψιμη ωοθυλακική φάση, και προτείνει ότι οι φυσιολογικές διακυμάνσεις στα επίπεδα της οιστραδιόλης στις διάφορες φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου μπορεί να σχετίζονται με διακύμανση στη δραστηριότητα του CYP1A2, γεγονός που ενισχύεται και από την ανάλυση του γονοτύπου, ο οποίος δεν

φαίνεται να επηρεάζει τη δραστηριότητα του CYP1A2 στις διάφορες φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου.

Ενδεχομένως, απαιτούνται περισσότερες μελέτες που να περιλαμβάνουν μεγαλύτερο αριθμό γυναικών, περισσότερες φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου και συνεχόμενους εμμηνορρυσιακούς κύκλους για την ασφαλή εκτίμηση των επιδράσεων του εμμηνορρυσιακού κύκλου στην δραστικότητα του CYP1A2.

5.0 ΣΥΝΟΨΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της διατριβής ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του εμμηνορρυσιακού κύκλου στην *in vivo* δραστικότητα του ειδικού για το ήπαρ ενζύμου CYP1A2, αλλά και των ενζύμων CYP2A6, XO και NAT-2, τα οποία συμμετέχουν στο μεταβολισμό πολλών κλινικά σημαντικών φαρμάκων. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν συνοπτικά πως στην όψιμη ωοθυλακική φάση παρατηρήθηκε: 1) μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2, 2) αύξηση της δραστηριότητας του CYP2A6 και 3) αύξηση της δραστηριότητας της NAT-2 στις βραδείες ακετυλιώτριες. Η δραστηριότητα της XO και της NAT-2 στις ταχείες ακετυλιώτριες δε διαφοροποιήθηκε στις διάφορες φάσεις του κύκλου.

Επίσης, από τη συσχέτιση του γονοτύπου του πολυμορφισμού CYP1A2*1F με τη φαινοτυπική δραστηριότητα του ενζύμου βρέθηκε ότι οι καπνίστριες με γονότυπο A/A είχαν υψηλότερη δραστικότητα του CYP1A2 σε σύγκριση με τις καπνίστριες με γονότυπο C/A σε αντίθεση με τις μη καπνίστριες, στις οποίες δεν ανιχνεύθηκε ανάλογη διαφορά. Ο γονότυπος A/A φαίνεται ότι προσδίδει ενισχυμένη επαγωγιμότητα του CYP1A2 σε συνθήκες έκθεσης του ενζύμου σε επαγωγείς, με αποτέλεσμα να σχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου και υψηλότερο ποσοστό αδρανοποίησης υποστρωμάτων του CYP1A2 όπως τα συνταγογραφούμενα φάρμακα.

Η μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2, η οποία παρατηρείται στην όψιμη ωοθυλακική φάση θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν κατά τη χορήγηση φαρμάκων που αποτελούν υποστρώματα του ενζύμου για την αύξηση της αποτελεσματικότητας και την αποφυγή τοξικότητας. Επίσης, είναι σημαντική η γνώση όλων των παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργικότητα του ειδικού για το ήπαρ CYP1A2 συμπεριλαμβανομένου και του εμμηνορρυσιακού κύκλου για την κλινική πράξη, με μακροπρόθεσμο στόχο την εξατομίκευση δοσολογίας φαρμάκων που αποτελούν υποστρώματα του CYP1A2 καθώς και τον ορθολογικό σχεδιασμό κλινικών μελετών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abernethy DR, Todd EL. Impairment of caffeine clearance by chronic use of low-dose oestrogen-containing oral contraceptives. *Eur J Clin Pharmacol* 28(4): 425-8, 1985.
2. Adam PJ, Berry J, Loader JA, Tyson KL, Craggs G, Smith P, De Belin J, Steers G, Pezzella F, Sachsenmeir KF, Stamps AC, Herath A, Sim E, O'Hare MJ, Harris AL, Terrett JA. Arylamine N-acetyltransferase-1 is highly expressed in breast cancers and conveys enhanced growth and resistance to etoposide in vitro. *Mol Cancer Res* 1(11): 826-35, 2003.
3. Aklillu E, Carrillo JA, Makonnen E, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. Xanthine oxidase activity is influenced by environmental factors in Ethiopians. *Eur J Clin Pharmacol* 59: 533-536, 2003.
4. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Βασικέ Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας, σελ.184. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2000.
5. Aldridge A, Bailey J, Neims AH. The disposition of caffeine during and after pregnancy. *Semin Perinatol* 5(4): 310-314, 1981.
6. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Brasure JR, Michalek AM, Laughlin R, Nemoto T, Gillenwater KA, Shields PG. Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 genetic polymorphisms, and breast cancer risk. *Jama* 276(18): 1494-501, 1996.
7. Arnaud MJ. Metabolism of caffeine and other components of coffee. In: Garattini S. (ed). *Caffeine, coffee, and health*. New York: Raven Press: 43-95, 1993.
8. Asproдини EK, Zifa E, Papageorgiou I, and Benakis A. Determination of N-acetylation phenotyping using caffeine as a metabolic probe. *Eur J Drug Metab Pharmacokin* 23: 501-506, 1998.
9. Bebia Z, Buch S, Wilson J, Frye R, Romkes M, Cecchetti A, Gnecco-Chaves D, Branch R. Bioequivalence revisited: Influence of age and sex on CYP enzymes. *Clin Pharmacol Ther* 76(6): 618-27, 2004.
10. Bechtel YC, Haffen E, Lelouet H, Brientini MP, Paintaud G, Miguet JP, Bechtel PR. Relationship between the severity of alcoholic liver cirrhosis and the metabolism of caffeine in 226 patients. *Int J Clin PharmacolTherap* 38(10): 467-475, 2000.

11. Begas E, Kouvaras E, Tsakalof A, Papakosta S, Asproдини EK. In vivo evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and Xanthine Oxidase activities in a Greek population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and Xanthine Oxidase activities in Greeks. *Biomed Chromatogr* 21:190-200, 2007.
12. Beischlag TV and Perdew GH. ER alpha-AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription. *J Biol Chem* 280(22): 21607-11, 2005.
13. Bendriss EK, Bechtel Y, Bendriss A, Humbert P, Paintaud G, Magnette J, Agache P, Bechtel PR. Inhibition of caffeine metabolism by 5-methoxypsoralen in patients with psoriasis. *Br J Clin Pharmacol* 41: 421-424, 1996.
14. Bendriss EK, Bechtel YC, Paintaud G, Brientini MP, Manton G, Miguet JP, Bennani AM, Bechtel PR. Acetylation polymorphism expression in patients before and after liver transplantation: influence of host/graft genotypes. *Pharmacogenetics* 8(3): 201-209, 1998.
15. Benowitz NL. Clinical pharmacology of caffeine. *Annu Rev Med* 41: 277-88, 1990.
16. Benowitz NL, Peng M, Jacob III P. Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on chlorzoxazone and caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 2003, 74:468-474.
17. Benowitz NL, Lessov-Schlaggar CN, Swan GE, Jacob P. Female sex and oral contraceptive use accelerate nicotine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 79: 480-488, 2006.
18. Berthou F, Ratanasavanh D, Riche C, Picart D, Voirin T, Guillouzo A. Comparison of caffeine metabolism by slices, microsomes and hepatocyte cultures from adult human liver. *Xenobiotica* 19(4):401-417, 1989.
19. Berthou F, Flinois J-P, Ratanasavanh D, Beaune P, Riche C, Guillouzo A. Evidence for the involvement of several cytochromes P-450 in the first steps of caffeine metabolism by human liver microsomes. *Drug Metab Disp* 19(3): 561-567, 1991.
20. Bertilsson L, Carrillo JA, Dahl ML, Llerena A, Alm C, Bondesson U, Lindstrom L, Rodriguez de la Rubia I, Ramos S, Benitez J. Clozapine disposition covaries with CYP1A2 activity determined by a caffeine test. *Brit J Clin Pharmacol* 38: 471-473, 1994.
21. Björnström L and Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 19: 833-42, 2005.

22. Blum M, Grant DM, McBride W, Heim M, Meyer UA. Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. *DNA Cell Biol* 9(3): 193-203, 1990.
23. Bologna M, Tang B, Klein J, Tesoro A, Koren G. Pregnancy-induced changes in drug metabolism in epileptic women. *J Pharmacol Exp Ther* 257(2): 735-40, 1991.
24. Bonati M, Latini R, Galleti F, Young JF, Tognoni G, Garattini S. Caffeine disposition after oral doses. *Clin Pharmacol Ther* 32(1): 98-106, 1982.
25. Brosen K, Skjelbo E, Rasmussen BB, Poulsen HE, Loft S. Fluvoxamine is potent inhibitor of cytochrome P4501A2. *Biochem Pharmacol* 45: 1211-1214, 1993.
26. Bruguerolle B, Toumi M, Faraj F, Vevoloet D, Razzouk H. Influence of the menstrual cycle on theophylline pharmacokinetics in asthmatics. *Eur J Clin Pharmacol* 39(1): 59-61, 1990.
27. Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Kadlubar FF. Human cytochrome P-450pa (P-4501A2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7696-7700, 1989.
28. Butler MA, Lang NP, Young JF, Caporaso NE, Vineis P, Hayes RB, Teitel CH, Massengill JP, Lawsen MF, Kadlubar FF. Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics* 2(3): 116-127, 1992.
29. Γεωργιάτσος Ι.Γ. Εισαγωγή στη Βιοχημεία, σελ. 10-111. Εκδόσεις Γιαχούδη- Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, 1993.
30. Calahan MM, Robertson RS, Branfman AR, McComish MF, Yesair DW. Comparison of caffeine metabolism in three nonsmoking populations after oral administration of radiolabeled caffeine. *Drug Metab Dispos* 11(3): 211-7, 1983.
31. Campbell ME, Spielberg SP, Kalow W. A urinary metabolite ratio that reflects systemic caffeine clearance. *Clin Pharmacol Ther* 42(2): 157-165, 1987a.
32. Campbell ME, Grant DM, Inaba T, Kalow W. Biotransformation of caffeine, paraxantine, theophylline, and theobromine by polycyclic aromatic hydrocarbon-inducible cytochrome(s) P-450 in human liver microsomes. *Drug Metabol Dispos* 15: 237-249, 1987b.
33. Camus AM, Geneste O, Honkakoski P, Bereziat JC, Henderson CJ, Wolf CR, Bartsch H, Lang MA. High variability of nitrosamine metabolism among individuals: role of

- cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in mice and humans. *Mol Carcinog* 7(4): 268-275, 1993.
34. Carrillo JA, Benitez J. Caffeine metabolism in a healthy Spanish population: N-acetylator phenotype and oxidation pathways. *Clin Pharmacol Ther* 55(3): 293-304, 1994.
 35. Carrillo JA, Benitez J. CYP1A2 activity, gender and smoking, as variables influencing the toxicity of caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 41:605-608, 1996.
 36. Carrillo JA, Christensen M, Ramos SI, Alm C, Dahl M-L, Benitez J, Bertilsson L. Evaluation of Caffeine as an In Vivo Probe for CYP1A2 Using Measurements in Plasma, Saliva, and Urine. *Therap. Drug Monitor* 22:409-417, 2000.
 37. Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmoller J, Maurer A, Sperling K, Roots I. Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: Correlation with phenotypic activity. *Am J Hum Genet* 57: 581-592, 1995.
 38. Cascorbi I, Brockmoller J, Mrozikiewicz PM, Bauer S, Loddenkemper R, Roots I. Homozygous rapid arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotype as a susceptibility factor for lung cancer. *Cancer Res* 56(17): 3961-6, 1996.
 39. Castorena-Torres F, Mendoza-Cantu A, de Leon MB, Cisneros B, Zapata-Perez O, Lopez-Carrillo L, Salinas JE, Albores A. CYP1A2 phenotype and genotype in a population from the Carboniferous Region of Coahuila, Mexico. *Toxicol Lett* 156(3): 331-9; 2005.
 40. Catteau A, Bechtel YC, Poisson N, Bechtel PR. A population and family study of CYP1A2 using caffeine urinary metabolites. *Eur J Clin Pharmacol* 47:423-430, 1995.
 41. Caubet MS, Laplante A, Caille J, and Brazier JL. [¹³C]aminopyrine and [¹³C]caffeine breath test: influence of gender, cigarette smoking and oral contraceptives intake. *Isotopes Envir Health Stud* 38(2): 71-77, 2002.
 42. Chang SY, Chen C, Yang Z, Rodrigues AD. Further assessment of 17alpha-ethinyl estradiol as an inhibitor of different human cytochrome P450 forms in vitro. *Drug Metab Dispos* 37(8): 1667-75, 2009.
 43. Chen J, Stampfer MJ, Hough HL, Garcia-Closas M, Willett WC, Hennekens CH, Kelsey KT, Hunter DJ. A prospective study of N-acetyltransferase genotype, red meat intake, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 58(15): 3307-11, 1998.
 44. Chen SC, Wang X, Xu G, Zhou L, Vennerstrom JL, Gonzalez F, Gelboin HV, Mirvish S.S. Depentylation of [³H-pentyl]methyl-n-amyl nitrosamine by rat esophageal and liver

- microsomes and by rat and human cytochrome P450 isoforms. *Cancer Res* 59: 91–98, 1999.
45. Cheymol G. Effects of Obesity on Pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 39(3): 215-231, 2000.
 46. Choi SY, Koh KH, Jeong H. Isoform-specific regulation of cytochromes P450 expression by estradiol and progesterone. *Drug Metabolism and Disposition* 41(2): 263-9, 2013.
 47. Chung WG, Kang JH, Park CS, Cho MH, Cha YN. Effect of age and smoking on in vivo CYP1A2, flavin-containing monooxygenase, and xanthine oxidase in Koreans: Determination by caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 67(3): 258-266, 2000.
 48. Dempsey D, Jacob P, Benowitz NL. Accelerated metabolism of nicotine and conitine in pregnant smokers. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 594-598, 2002.
 49. Denaro CP, Wilson M, Jacob P, Benowitz NL. The effect of liver disease on urine caffeine metabolite ratios. *Clin Pharmacol Therap* 59(6):624-635, 1996.
 50. Diaz D, Fabre I, Daujat M, Saint Aubert B, Bories P, Michel H, Maurel P. Omeprazole is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450. *Gastroenterology* 99(3): 737-747, 1990.
 51. Dobrinas M, Cornuz J, Oneda B, Kohler Serra M, Puhl M, Eap CB. Impact of smoking, smoking cessation, and genetic polymorphisms on CYP1A2 activity and inducibility. *Clin Pharmacol Ther* 90(1): 117-25, 2011.
 52. Draper AJ, Madan, A, Parkinson A. Inhibition of coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 341:47–61, 1997.
 53. Drayer DE, Reidenberg MM. Clinical consequences of polymorphic acetylation of basic drugs. *Clin Pharmacol Ther* 22(3): 251-8, 1977.
 54. Eaton DL, Gallagher EP, Bammler TK, Kunze KL. Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics* 5(5): 259-74, 1995.
 55. Ecochard R, Gougeon A. "Side of ovulation and cycle characteristics in normally fertile women". *Human reproduction (Oxford, England)* 15 (4): 752–5, 2000.
 56. Eugster HP, Probst M, Würgler FE, Sengstag C. Caffeine, estradiol, and progesterone interact with human CYP1A1 and CYP1A2. Evidence from cDNA-directed expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Drug Metab Dispos* 21(1): 43-9, 1993.

57. Evans DA, Manley KA, McK Usick VA. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br Med J* 2(5197): 485-91, 1960.
58. Evans DA. N-acetyltransferase. *Pharmac Ther* 42: 157-234, 1989.
59. Facciola G, Hidestrand M, Von Bahr C, Tybring G. Cytochrome P450 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes. *Eur J Clin Pharmacol* 56(12): 881-888, 2001.
60. Fuhr U, Woodcock BG, Siewert M. Verapamil and drug metabolism by the cytochrome P450 isoform CYP1A2. *Eur J Clin Pharmacol* 42: 463-464, 1992a.
61. Fuhr U, Anders EM, Mahr G, Sorgel F, Staib AH. Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P450IA2 activity in vivo and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 36(5): 942-948, 1992b.
62. Fuhr U, Rost KL. Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva. *Pharmacogenetics* 4(3): 109-16, 1994.
63. Fuhr U, Kober S, Zaigler M, Mutschler E, Spahn-Langguth H. Rate-limiting biotransformation of triamterene is mediated by CYP1A2. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 43(7): 327-334, 2005.
64. Gallagher EP, Wienkers LC, Stapleton PL, Kunze KL, Eaton DL. Role of human microsomal and human complementary DNA- expressed cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the bioactivation of aflatoxin B1. *Cancer Res* 54: 101-108: 1994.
65. Gertig DM, Hankinson SE, Hough H, Spiegelman D, Colditz GA, Willett WC, Kelsey KT, Hunter DJ. N-acetyl transferase 2 genotypes, meat intake and breast cancer risk. *Int J Cancer.* 80(1): 13-7, 1999.
66. Ghotbi R, Christensen M, Roh HK, Ingelman-Sundberg M, Aklillu E, Bertilsson L. Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans. *Eur J Clin Pharmacol* 63(6): 537-46, 2007.
67. Glass CK. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15: 391-407, 1994.
68. Granfors MT, Backman JT, Laitila J, Neuvonen PJ. Oral contraceptives containing ethinyl estradiol and gestodene markedly increase plasma concentrations and effects of tizanidine by inhibiting cytochrome P450 1A2. *Clin Pharmacol Ther* 78: 400-11, 2005.

69. Grant DM, Tang BK, Kalow W. Variability in caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 33(5): 591-602, 1983.
70. Grant DM, Tang BK, Kalow W. A simple test for acetylator phenotype using caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 17(4): 459-464, 1984.
71. Grant DM, Campell ME, Tang BK, Kalow W. Biotransformation of caffeine by microsomes from human liver. *Biochem Pharmacol* 36(8): 1251-1260, 1987.
72. Grant DM, Hughes NC, Janezic SA, Goodfellow GH, Chen HJ, Gaedigk A, Yu VL, Grewal R. Human acetyltransferase polymorphisms. *Mutation Research* 376: 61-70, 1997.
73. Gross M, Kruisselbrink T, Anderson K, Lang N, McGovern P, Delongchamp R et al. Distribution and concordance of N-acetyltransferase genotype and phenotype in an American population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 8:683-692, 1999.
74. Gu L, Gonzales FJ, Kalow W, Tang BK. Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine, and theophylline by c-DNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. *Pharmacogenetics* 2: 73-77, 1992.
75. Gu J, Liang D, Wang Y, Lu C, Wu X. Effects of N-acetyl transferase 1 and 2 polymorphisms on bladder cancer risk in Caucasians. *Mutat Res* 581: 97-104, 2005.
76. Guengerich FP, Shimada T, Iwasaki M, Butler MA, Kadlubar FF. Activation of carcinogens by human liver cytochromes P-450. *Basic Life Sci* 53: 381-396, 1990.
77. Guercioli R, Szumlanski C, Weinshilboum RM. Human liver xanthine oxidase: nature and extent of individual variation. *Clin Pharmacol Ther* 50(6): 663-672, 1991.
78. Gunes A, Ozbey G, Vural EH, Uluoglu C, Scordo MG, Zengil H, Dahl ML. Influence of genetic polymorphisms, smoking, gender and age on CYP1A2 activity in a Turkish population. *Pharmacogenomics* 10(5): 769-78, 2009.
79. Gustavson LE, Legler UF, Benet LZ. Impairment of prednisolone disposition in women taking oral contraceptives or conjugated estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 62: 234-237, 1986.
80. Guyton AC. *Textbook of Medical Physiology*. 8th ed Philadelphia WB Saunders, 1991.
81. Han XM, Ou-Yang DS, Chen XP, Shu Y, Jiang CH, Tan ZR, Zhou HH. Inducibility of CYP1A2 by omeprazole in vivo related to the genetic polymorphism of CYP1A2. *Br J Clin Pharmacol* 54(5): 540-543, 2002.
82. Hankinson O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 307-40, 1995.

83. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now?. *Free Radical Biology and Medicine* 33(6): 774-797, 2002.
84. Hein DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutation Research* 506: 65-77, 2002.
85. Higashi E, Fukami T, Itoh M, Kyo S, Inoue M, Yokoi T, Nakajima M. Human CYP2A6 is induced by estrogen via estrogen receptor. *Drug Metabolism and Disposition* 35(10): 1935-41, 2007.
86. Hoffman SMG, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ, Mohrenweiser HW. Organization and evolution of the cytochrome P450 CYP2A-2B-2F subfamily gene cluster on human chromosome 19. *J Mol Evol* 41: 894-900, 1995.
87. Hong C-C, Tang B-K, Hammond GL, Trichtler D, Yaffe M, Boyd NF. Cytochrome P4501A2 (CYP1A2) activity and risk factors: a cross-sectional study. *Breast Cancer Research* 6(4): 352-365, 2004.
88. Horn EP, Tucker MA, Lambert G, Silverman D, Zametkin D, Sinha R, Hartge T, Landi MT, Caporaso NE. A study of gender-based cytochrome P4501A2 variability: a possible mechanism for the male excess of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4(5): 529-533, 1995.
89. Hukkanen J, Gourlay SG, Kenkare S, Benowitz NL. Influence of menstrual cycle on cytochrome P450 2A6 activity and cardiovascular effects of nicotine. *Clin Pharmacol Ther* 77(3): 159-69, 2005.
90. Iscan M, Rostami H, Guray T, Pelkonen O, Rautio A. Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in a Turkish population. *Eur J Clin Pharmacol* 47: 315-318, 1994.
91. Jiang Z, Dragin N, Jorge-Nebert LF, Martin MV, Guengerich FP, Aklillu E, Ingelman-Sundberg M, Hammons GJ, Lyn-Cook BD, Kadlubar FF, Saldana SN, Sorter M, Vinks AA, Nassr N, VonRichter O, Jin L, Nebert DW. Search for an association between the human CYP1A2 genotype and CYP1A2 metabolic phenotype. *Pharmacogenet Genomics* 16: 359-367, 2006.
92. Joers R, Richter E. Mexiletene and caffeine elimination. *N Engl J Med* 317: 117, 1987.
93. Jost G, Wahlander A, Von Mandach U, Preisig R. Overnight salivary caffeine clearance: a liver function test suitable for routine use. *Hepatology* 7(2): 338-344. 1987.

94. Juan D, Worwag EM, Shoeller DA, Kotake AN, Hughes RL, Frederiksen MC. Effects of dietary-protein on theophylline pharmacokinetics and caffeine and aminopyrine breath tests. *Clin Pharmacol Ther* 40: 187-194, 1986.
95. Kadlubar FF, Talaska G, Butler MA, Teitel CH, Massengill JP, Lang NP. Determination of carcinogenic arylamine N-oxidation phenotype in humans by analysis of caffeine urinary metabolites. In: M.I. Mendelsohn and R.J. Albertini (eds), *Mutation and the environment. Part B*: 107-114, 1990.
96. Καλογερόπουλος Α. Μαιευτική. University Studio Press, Θεσσαλονίκη, σελ. 24-25, 1992.
97. Καλογερόπουλος Α. Γυναικολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη, σελ. 109-112, 1996α.
98. Καλογερόπουλος Α. Γυναικολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη,, σελ. 64, 1996β.
99. Kalow W. Variability of Caffeine Metabolism in Humans. *Arzneimittel Forschung* 35(I):319-324, 1985.
100. Kalow W, Tang B-K. Caffeine as a metabolic probe: Exploration of the enzyme-inducing effect of cigarette smoking. *Clin. Pharmacol. Ther* 49(1): 44-48, 1991a.
101. Kalow W, Tang B-K. Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities. *Clin Pharmacol Ther* 50(5): 508-519, 1991b.
102. Kalow W, Tang B-K. The use of caffeine for enzyme assays: a critical appraisal. *Clin Pharmacol Ther* 53(5): 503-514, 1993.
103. Kamimori GH, Joubert A, Otterstetter R, Santaromana M, Eddington ND. The effect of the menstrual cycle on the pharmacokinetics of caffeine in normal, healthy eumenorrheic females. *Eur J Clin Pharmacol* 55(6): 445-9, 1999.
104. Karjalainen MJ, Neuvonen PJ, Backman JT. In vitro inhibition of CYP1A2 by model inhibitors, anti-inflammatory analgesics and female sex steroids: predictability of in vivo interactions. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 103(2): 157-65, 2008.
105. Kashuba AD, Bertino JS Jr, Kearns GL, Leeder JS, James AW, Gotschall R, Nafziger AN. Quantitation of three-month intraindividual variability and influence of sex and menstrual cycle phase on CYP1A2, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activity determined with caffeine phenotyping. *Clin Pharmacol Ther* 63(5): 540-51, 1998.

- 106.Kharash ED, Hankins DC, Thummel KE. Human kidney methoxyflurane and sevoflurane metabolism. Intrarenal fluoride production as a possible mechanism of methoxyflurane nephrotoxicity. *Anesthesiology* 82: 689–699, 1995.
- 107.Kilbane AJ, Silbart LK, Manis M, Beitins IZ, Weber WW. Human N-acetylation genotype determination with urinary caffeine metabolites. *Clin Pharmacol Ther* 47: 470-477, 1990.
- 108.Kilbane AJ, Petroff T, Weber WW. Kinetics of acetyl CoA: arylamine N-acetyltransferase from rapid and slow acetylator human liver. *Drug Metab Dispos* 19(2): 503-7, 1991.
- 109.Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK, Jo I. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor α localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 257–262, 1999.
- 110.Kirby GM, Batist G, Alpert L, Lamoureux E, Cameron RG, Alaoui-Jamali MA. Overexpression of cytochrome P-450 isoforms involved in aflatoxin B1 bioactivation in human liver with cirrhosis and hepatitis. *Toxicol Pathol* 24: 458–467, 1996.
- 111.Kohlrausch FB, Severino-Gama C, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Carracedo A, Hutz MH. The CYP1A2 -163C>A polymorphism is associated with clozapine-induced generalized tonic-clonic seizures in Brazilian schizophrenia patients. *Psychiatry Res* 209(2): 242-5, 2013.
- 112.Konstandi M, Cheng J, Gonzalez FJ. Sex steroid hormones regulate constitutive expression of Cyp2e1 in female mouse liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304: 1118–E1128, 2013.
- 113.Kotake AN, Schoeller DA, Lambert GH, Baker AL, Schaffer DD, Josephs H. The caffeine CO₂ breath test: Dose response and route of N-demethylation in smokers and nonsmokers. *Clin Pharmacol Ther* 32(2): 261-269, 1982.
- 114.Koyama E, Chiba K, Tani M, Ishizaki T. Identification of human cytochrome P450 isoforms involved in the stereoselective metabolism of mianserin enantiomers. *J Pharmacol Exp Ther* 278(1): 21-30, 1996.
- 115.Krenitisky T, Tuttle JV, Catteau EL, Wang P. A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Comp Biochem Physiol* 49B: 687-703, 1974.

116. Krul C, Hageman G. Analysis of caffeine metabolites to assess biotransformation enzyme activities by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 709B:27-34, 1998.
117. Λαϊνάς Τ. Ανθρώπινη Αναπαραγωγή & Εξωσωματική Γονιμοποίηση. Ιατρικές εκδόσεις Μανιατέα, τομος α', σελ. 144-149, 2006.
118. Lambert GH, Schoeller DA, Kotake AN, Flores C, Hay D. The effect of age, gender, and sexual maturation on the caffeine breath test. *Dev Pharmacol Ther* 9: 375-388, 1986.
119. Lambert GH, Schoeller DA, Humphrey HEB, Kotake AN, Lietz H, Campbell M, Kalow W, Spielberg SP, Budd M. The Caffeine Breath Test and Caffeine Urinary Metabolite Ratios in the Michigan Cohort Exposed to Polybrominated Biphenyls: A Preliminary Study. *Envir Health Persp* 89: 175-181, 1990.
120. Landi MT, Sinha R, Lang NP, Kadlubar FF. Human cytochrome P4501A2. In Ryder W (ed) *Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer*. IARC Sci. Publ. no. 148. International Agency for Research in Cancer, Lyon: 173-195, 1999.
121. Lane JD, Steege JF, Rupp SL, Kuhn CM. Menstrual cycle effects on caffeine elimination in the human female. *Eur J Clin Pharmacol* 43(5): 543-6, 1992.
122. Lang NP, Butler MA., Massengill J, Lawson M, Stotts RC, Hauer-Jansen M, Kadlubar FF. Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer of polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3: 675-682, 1994.
123. Lelouet H., Bechtel YC, Paitaud G, Brientini MP, Miguet JP, Bechtel P.R. Caffeine metabolism in a group of 67 patients with primary biliary cirrhosis. *Int J Clin Pharmacol. Ther* 39(1): 25-32, 2001.
124. Le Marchand L, Sivaraman L, Franke AA, Custer LJ, Wilkens LR, Lau AF, et al. Predictors of N-acetyltransferase activity: should caffeine phenotyping and NAT2 genotyping be used interchangeably in epidemiological studies? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:449-455, 1996.
125. Le Marchand L, Franke AA, Custer L, Wilkens LR, Cooney R.V. Lifestyle and nutritional correlates of cytochrome CYP1A2 activity: inverse associations with plasma lutein and alpha-tocopherol. *Pharmacogenetics* 7:11-19, 1997.
126. Le Marchand L, Hankin JH, Pierce LM, Sinha R, Nerurkar PV, Franke AA, Wilkens LR, Kolonel LN, Donlon T, Seifried A, Custer LJ, Lum-Jones A, Chang W. Well-done red meat,

- metabolic phenotypes and colorectal cancer in Hawaii. *Mutat Res* 506-507: 205-14, 2002.
127. Lemoine A, Gautier JC, Azoulay D, Kiffel L, Belloc C, Guengerich FP, Maurel P, Beaune P, and Leroux JP. Major pathway of imipramine metabolism is catalyzed by cytochromes P-450 1A2 and P-450 3A4 in human liver. *Mol Pharmacol* 43: 827-832, 1993.
128. Lew KH, Ludwig EA, Milad MA et al., Gender-based effects of methylprednisolone pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 54: 402-14, 1993.
129. Li H, Cui H, Liu X, Zweier JL. Xanthine oxidase catalyzes anaerobic transformation of organic nitrates to nitric oxide and nitrosothiols: characterization of this mechanism and the link between organic nitrate and guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem* 280: 16594-16600, 2005.
130. Limke KK, Shelton AR, Elliott ES. Fluvoxamine interaction with warfarin. *Ann Pharmacother* 36(12): 1890-1892, 2002.
131. Lin JH, Lu AYH. Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications. *Clin. Pharmacokinet* 35(5): 361-390, 1998.
132. Loi C-M, Parker BM, Cusack BJ, Vestal RE. Individual and combined effects of cimetidine and ciprofloxacin on the theophylline metabolism in male nonsmokers. *Br J Clin Pharmacol* 36: 195-200, 1993.
133. Lo R, Burgoon L, Macpherson L, Ahmed S, Matthews J. Estrogen receptor-dependent regulation of CYP2B6 in human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1799(5-6): 469-79, 2010.
134. Lurie G, Maskarinec G, Kaaks R, Stanczyk FZ, Le Marchand L. Association of genetic polymorphisms with serum estrogens measured multiple times during a 2-year period in premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(6): 1521-7, 2005.
135. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839, 1995.
136. Matthews J, Wihlén B, Thomsen J, Gustafsson JA. Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor alpha to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters. *Mol Cell Biol* 25(13): 5317-28, 2005.

137. Manyike PT, Kharasch ED, Kalhorn TF, Slattery JT. Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation. *Clin Pharmacol Ther* 67(3): 275-282, 2000.
138. May FE. Novel drugs that target the estrogen-related receptor alpha: their therapeutic potential in breast cancer. *Cancer Manag Res* 6: 225–252, 2014.
139. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20:321–344, 1999.
140. Millikan RC, Pittman GS, Newman B, Tse CK, Selmin O, Rockhill B, Savitz D, Moorman PG, Bell DA. Cigarette smoking, N-acetyltransferases 1 and 2, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7(5): 371-8, 1998.
141. Moonen H, Engels L, Kleinjans J, Kok T. The CYP1A2-164A-->C polymorphism (CYP1A2*1F) is associated with the risk for colorectal adenomas in humans. *Cancer Lett* 229: 25-31, 2005.
142. Mwinyi J, Cavaco I, Pedersen RS, Persson A, Burkhardt S, Mkrtchian S, Ingelman-Sundberg M. Regulation of CYP2C19 expression by estrogen receptor α : implications for estrogen-dependent inhibition of drug metabolism. *Mol Pharmacol* 78(5):886-94, 2010.
143. Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Shin S, Kadlubar FF, Kamataki T. 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, 1994.
144. Nakajima M, Yamamoto T, Nunoya K-I, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, Funae Y, Shimada N, Kamatak T, Kuroiwa Y. Characterization of CYP2A6 involved in 3'-hydroxylation of cotinine in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 1010–1015, 1996.
145. Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Kinoshita M, Funayama M, Kamataki T. Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. *J Biochem (Tokyo)* 125(4): 803-8, 1999.
146. Nazir S, Iqbal Z, Ahmad L, Shah Y, Nasir F. Pharmacokinetics of omeprazole and its metabolites in three phases of menstrual cycle. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 40:13–22, 2015.
147. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360: 1155-62, 2002.

148. Nielsen KK, Flinois JP, Beaune P, Brosen K. The biotransformation of clomipramine in vitro, identification of the cytochrome P450s responsible for the separate metabolic pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 277(3): 1659-1664, 1996.
149. Nilsson S, M. kel. S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81:1535-65, 2001.
150. Nordmark A, Lundgren S, Cnattingius S, Rane A. Dietary caffeine as a probe agent for assessment of cytochrome P4501A2 activity in random urine samples. *J Clin Pharmacol* 47: 397-402, 1999.
151. Notarianni LJ, Oliver SE, Dodrocky P, Bennett PN, Silverman BW. Caffeine as a metabolic probe: a comparison of the metabolic ratios used to assess CYP1A2 activity. *Br J Clin Pharmacol* 39: 65-69, 1995.
152. Nowell S, Sweeney C, Hammons G, Kadlubar FF, Lang NP. CYP2A6 activity by caffeine phenotyping: association with colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 377-383, 2002.
153. Nunoya K-I, Yoko iT, Kimura K, Inoue K, Kodama T, Funayama M, Nagashima K, Funae Y, Green C, Kinoshita M, Kamataki T. A new deleted allele in the human cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene found in individuals showing poor metabolic capacity to coumarin and (+)-cis-3,5-dimethyl-2-(3-pyridyl)thiazolidin-4-one hydrochloride (SM-12502). *Pharmacogenetics* 8: 239-249, 1998.
154. Oda T, Akaike T, Hamamoto T, Suzuki F, Maeda H. Oxygen radicals in influenza-induced pathogenesis and treatment with pyran polymer-conjugated SOD. *Science* 244 (4907): 974-976, 1989.
155. Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423(6939): 545-50, 2003.
156. Okumura K, Tomoko K, Chikazawa S, Komada F, Iwakawa S, Tanigawara Y. Genotyping of N-acetylation polymorphism and correlation with procainamide metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 61: 509-517, 1997.
157. Olson J. Κλινική Φαρμακολογία, σελ. 7-8. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997.

- 158.Orlando R, Piccoli P, De Martin S, Padrini R, Floreani M, Palatini P. Cytochrome P450 1A2 is a major determinant of lidocaine metabolism in vivo: effects of liver function. *Clin. Pharmacol Ther* 75(1): 80-88, 2004.
- 159.Oscarson M, Gullstén H, Rautio A, Bernal ML, Sinues B, Dahl, M-L, Stengard JH, Pelkonen O, Raunio H, Ingelman-Sundberg, M. Genotyping of human cytochrome P450 2A6 (CYP2A6), a nicotine C-oxidase. *FEBSLett* 438: 201–205, 1998.
- 160.Oscarson M. Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug Metab Dispos* 29: 91-95, 2001.
- 161.Παπαδημητρίου Μ. Εσωτερική Παθολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 1360-1361, 1998.
- 162.Park GJ-H, Katelaris PH, Jones DB, Seow F, Le Couteur DG, Ngu MC. Validity of the ¹³C-caffeine breath test as a non-invasive, quantitative test of liver function. *Hepatology* 38(5): 1227-1236, 2003.
- 163.Parkin DP, Vandenplas S, Botha FJ, Vandenplas ML, Seifart HI, VanHelden PD, VanderWalt BJ, Donald PR, VanJaarsveld PP. Trimodality of isoniazid elimination: phenotype and genotype in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 155(5): 1717-22, 1997.
- 164.Pasanen M, Rannala Z, Tooming A, Sotaniemi EA, Pelkonen O, Rautio A. Hepatitis A impairs the function of human hepatic CYP2A6 in vivo. *Toxicology* 123: 177–184, 1997.
- 165.Patwardhan RV, Desmond PV, Wilkinson GR, Schenker S. Impaired elimination of caffeine by oral contraceptive steroids. *J Lab Clin Med* 95: 604-608, 1980.
- 166.Pelkonen O, Raunio H, Pasanen M, Rautio A, Lang MA. The metabolism of coumarin. *Coumarins Biology, Applications and Mode of Action Wiley, Chichester* 67–92, 1997.
- 167.Pelkonen O, Rautio A, Raunio H, Pasanen M. CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology* 144(1-3): 139-47, 2000.
- 168.Pelkonen O. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol* 82: 667–715, 2008.
- 169.Perou C. M, Sorlie T, Eisen M. B, van de Rijn M, Jeffrey S. S, Rees C. A, Pollack J. R, Ross D. T, Johnsen H, Akslen L. A, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu S. X, Lonning P. E, Borresen-Dale A. L, Brown P. O, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747–752, 2000.

170. Peters JH, Gordon GR, Ghoul DC, Tolentino JG, Walsh GP, Levy L. The disposition of the antileprotic drug dapsone (DDS) in Philippine subjects. *Am J Trop Med Hyg* 21(4): 450-7, 1972.
171. Pollock BG, Wylie M, Stack JA, Sorisio DA, Thompson DS, Kirshner MA, Follan MM, Condifer KA. Inhibition of Caffeine Metabolism by Estrogen Replacement Therapy in Postmenopausal Women. *J Clin Pharmacol* 39: 936-940, 1999.
172. Pontes ZB, Vincent-Viry M, Gueguen R, Galteau MM, Siest G. Acetylation phenotypes and biological variation in a French Caucasian population *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 31: 59– 68, 1993.
173. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annual Review of Physiology* 70: 165–190, 2008.
174. Ramadoss P, Marcus C, Perdew GH. Role of the aryl hydrocarbon receptor in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1(1): 9-21, 2005.
175. Rasmussen BB, Brosen K. Determination of Urinary Metabolites of Caffeine for the Assessment of Cytochrome P4501A2, Xanthine Oxidase, and N-Acetyltransferase Activity in Humans. *Therap Drug Monit* 18: 254-262, 1996.
176. Rasmussen BB, Brix TH, Kyvik KO, Brosen K. The interindividual differences in the 3-demethylation of caffeine alias CYP1A2 is determined by both genetic and environmental factors. *Pharmacogenetics* 12(6): 473-478, 2002.
177. Reitvelt EG, Broekman MMM, Houben JJG, Eskes TKAB, Van Rossum JM. Rapid onset of an increase in caffeine residence time in young women due to oral contraceptive steroids. *Eur J Clin Pharmacol* 26: 371-373, 1984.
178. Relling MV, Lin J-S, Ayers GD, Evans WE. Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A2 activities. *Clin Pharmacol Ther* 52(6): 643-658, 1992.
179. Renner E, Wietholtz H, Huguenin P, Arnaud MJ, Preisig R. Caffeine: A Model Compound for Measuring Liver Function. *Hepatology* 4(1): 38-46, 1984.
180. Roberts RK, Grice J, McGuffie C, Heilbronn L. Oral contraceptive steroids impair the elimination of theophylline. *J Lab Clin Med* 101: 821–5, 1983.
181. Rodopoulos N, Wisén O, Norman A. Caffeine metabolism in patients with chronic liver disease. *Scand J Clin Lab Invest* 55(3): 229-42, 1995.

182. Rostami-Hodjegan A, Nurminen S, Jackson PR, Tucker GT. Caffeine urinary metabolite ratios as markers of enzyme activity: a theoretical assessment. *Pharmacogenetics* 6: 121-149, 1996.
183. Rost KL, Brosicke H, Brockmoller J, Scheffler M, Helge H, Roots I. Increase of cytochrome P4501A2 activity by omeprazole: evidence by the ¹³C-[N-3-methyl]-caffeine breath test in poor and extensive metabolizers of S-mephenytoin. *Clin Pharmacol. Ther* 52: 170-180, 1992.
184. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Functional significance of C—A polymorphism in intron-1 of the cytochrome CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 47(4): 445-449, 1999.
185. Sachse C, Bhambra U, Smith G, Lightfoot TJ, Barrett JH, Scollay J, Garner RC, Boobis AR, Wolf CR, Gooderham NJ. Colorectal Cancer Study Group. Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 55(1): 68-76, 2003.
186. Sadeque AJM, Fisher MB, Korzekwa KR, Gonzalez FJ, Rettie A.E. Human CYP2C9 and CYP2A6 mediate formation of the hepatotoxin 4-ene-valproic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 698–703, 1997.
187. Safe S and Kim K. Nonclassical genomic ER/Sp and ER/AP-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol* 41(5): 263-275, 2008.
188. Safe S and Wormke M. Inhibitory aryl hydrocarbon receptor- estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 807–816, 2003.
189. Saruwatari J, Nakagawa K, Shindo J, Tajiri T, Fujieda M, Yamazaki H, Kamataki T, Ishizaki T. A population phenotyping study of three drug-metabolizing enzymes in Kyushu, Japan, with use of the caffeine test. *Clin Pharmacol Ther* 72: 200-208, 2002.
190. Sesardic D, Boobis AR, Edwards RJ, Davies DS. A form of cytochrome P450 in man, orthologous to form in the rat, catalyses the O-deethylation of phenacetin and is inducible by cigarette smoking. *Br J Clin Pharmacol* 26(4): 363-372, 1988.
191. Sharer JE, Wrighton SA. Identification of the human hepatic cytochromes P450 involved in the in vitro oxidation of antipyrine. *Drug Metab Dispos* 24: 487-494, 1996.
192. Shavit G, Lerman P, Koresyn A. Phenytoin pharmacokinetics in catmenial epilepsy. *Neurology* 34:959-61, 1984.

193. Shet MS, McPhaul M, Fisher CW, Stallings NR, Estabrook RW. Metabolism of the antiandrogenic drug (Flutamide) by human CYP1A2. *Drug Metab Dispos* 25(11): 1298-1303, 1997.
194. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 270(1): 414-423, 1994.
195. Simon T, Becquemont L, Hamon B, Nouyrigat E, Chodjama Y, Poirier JM, Funck-Brentano C, Jaillon P. Variability of cytochrome P4501A2 activity over time in young and elderly healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 52: 601-604, 2001.
196. Simpson PJ, Lucchesi BR. Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 110(1): 13-30, 1987.
197. Sinha R, Rothman N, Brown ED, Mark SD, Hoover RN, Caporaso NE, Levander OA, Knize MG, Lang NP, Kadlubar FF. Pan-Fried Meat Containing High Levels of Heterocyclic Aromatic Amines but Low Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Induces Cytochrome P4501A2 Activity in Humans. *Cancer Res* 54: 6154-6159, 1994.
198. Sinha R, Caporaso N. Heterocyclic amines, cytochrome P4501A2, and N-acetyltransferase: issues involved in incorporating putative genetic susceptibility markers into epidemiological studies. *Ann Epidemiol* 7(5): 350-6, 1997.
199. Sinha R, Rothman N. Role of well-done, grilled meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer. *Cancer Letters* 143: 189-194, 1999.
200. Sinués B, Sáenz MA, Lanuza J, Bernal ML, Fanlo A, Juste JL, Mayayo E. Five caffeine metabolite ratios to measure tobacco-induced CYP1A2 activity and their relationships with urinary mutagenicity and urine flow. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8(2): 159-66, 1999.
201. Sinues B, Fanlo A, Mayayo E, Carcas E, Vicente J, Arenaz I, Cebollada A. CYP2A6 activity in a healthy Spanish population: effect of age, sex, smoking and oral contraceptives. *Human and Experimental Toxicology* 27:367-372, 2008
202. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Bigler J, Caan B, Leppert M. NAT2, GSTM-1, cigarette smoking, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7(12): 1079-84, 1998.

203. Smith, C.L. and O'Malley, B.W. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 25: 45-71, 2004.
204. Sotaniemi EA, Rautio A, Backstrom M, Arvela P, Pelkonen O. CYP3A4 and CYP2A6 activities marked by the metabolism of lignocaine and coumarin in patients with liver and kidney diseases and epileptic patients. *Br J Clin Pharmacol* 39: 71-76, 1995.
205. Spaldin V, Madden S, Adams DA, Edwards RJ, Davies DS, Park BK. Determination of human hepatic cytochrome P4501A2 activity in vitro use of tacrine as an isoenzyme-specific probe. *Drug Metab. Dispos.* 23: 929-934, 1995.
206. Speroff L, Glass RH, Kase NG. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. The Williams & Wilkins Co, 1994.
207. Spracklin DK, Thummel KE, Kharasch, E.D. Human reductive halothane metabolism in vitro is catalyzed by cytochrome P4502A6 and 3A4. *Drug Metab Dispos* 24: 976-983, 1996.
208. Stirpe F, Ravaioli M, Battelli M-G, Musiani S, Grazi G.L. Xanthine oxidoreductase activity in human liver disease. *The American Journal of Gastroenterology* 97(8): 2079-2085, 2002.
209. Stryer L. Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2η Έκδοση, σελ. 617, 1997.
210. Swinney DC. Progesterone metabolism in hepatic microsomes. Effect of the cytochrome P-450 inhibitor ketokonazole and the NADPH 5 α -reductase inhibitor 4-MA upon the metabolic profile in human, monkey, dog and rat. *Drug Metab Dispos BR J Clin Pharmacol* 18:859-865, 1990.
211. Tanaka E, Ishikawa A, Yamamoto Y, Osada A, Tsuji K, Fukao K, Misawa S, Iwasaki Y. A simple useful method for the determination of hepatic function in patients with liver cirrhosis using caffeine and its three major dimethylmetabolites. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 30(9): 336-341, 1992.
212. Tang BK, Grant DM, Kalow W. Isolation and identification of 5-acetylamino-6-formylamino-3-methylouracil as a major metabolite of caffeine in man. *Drug Metab Dispos* 11: 218-220, 1983.
213. Tang B-K, Kadar D, Qian L, Iriah J, Yip J, Kalow W. Caffeine as a metabolic probe: validation of its use for acetylator phenotyping. *Clin Pharmacol Ther* 49(6): 648-657, 1991.

214. Tang BK, Zhou Y, Kadar D, Kalow W. Caffeine as a probe for CYP1A2 activity: potential influence of renal factors on urinary phenotypic trait measurements. *Pharmacogenetics* 4(3): 117-124, 1994.
215. Tang W, Stearns RA. Heterotropic cooperativity of cytochrome P4503A4 and potential drug-drug interactions. *Curr Drug Metab* 2: 185-98, 2001.
216. Tantcheva-Poór I., Zaigler M., Rietbrock S., and Fuhr U. Estimation of cytochrome P-450 CYP1A2 activity in 863 healthy Caucasians using a saliva-based caffeine test. *Pharmacogenetics* 9: 131-144, 1999.
217. Tarantino G, Conca P, Capone D, Gentile A, Polichetti G, Basile Reliability of total overnight salivary caffeine assessment (TOSCA) for liver function evaluation in compensated cirrhotic patients. *VEur J Clin Pharmacol* 62(8): 605-12, 2006.
218. Taylor JA, Umbach DM, Stephens E, Castranio T, Paulson D, Robertson C, Mohler JL, Bell DA. The role of N-acetylation polymorphisms in smoking-associated bladder cancer: evidence of a gene-gene-exposure three-way interaction. *Cancer Res* 58(16):3603-10, 1998.
219. Thornton-Manning J, Appleton ML, Gonzalez FJ, Jost GS. Metabolism of 3-methylindole by vaccinia-expressed P450 enzymes: correlation of 3-methyleneindolenine formation and protein-binding. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 21-29, 1996.
220. Tiano HF, Hosokawa M, Clulada PC, Smith PB, Wang R, Gonzalez FJ, Crespi CL, Langenbach R. Retroviral mediated expression of human cytochrome P4502A6 in C3H/10T1/2 cells confers transformability by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)1-butanone (NNK). *Carcinogenesis* 14: 1421-1427, 1993.
221. Tracy TS, Venkataramanan R, Glover DD, Caritis SN. Temporal changes in drug metabolism (CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A Activity) during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 92(2): 633-9, 2005.
222. Tsuchiya Y, Nakajima M, Kyo S, Kanaya T, Inoue M, Yokoi T. Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor. *Cancer Res* 64 (9):3119-25, 2004.
223. Tsutsumi K, Kotegawa T, Matsuki S, Tanaka Y, Ishii Y, Kodama Y, Kuranari M, Miyakawa, Nakano S. The effect of pregnancy on cytochrome P4501A2, xanthine oxidase and N-acetyltransferase activities in humans. *Clin Pharmacol* 70(2): 121-5, 2001.
224. Ujjin P, Satarug S, Vanavanitkun Y, Daigo S, Ariyoshi N, Yamazaki H, Reilly PE, Moore MR, Kamataki T. Variation in coumarin 7-hydroxylase activity associated with genetic

- polymorphism of cytochrome P450 2A6 and the body status of iron stores in adult Thai males and females. *Pharmacogenetics* 12: 241-249, 2002.
- 225.Vatsis KP, Martell KJ, Weber WW. Diverse point mutations in the human gene for polymorphic N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA*88(14): 6333-7, 1991.
- 226.Venkatakrishnan K, Greenblatt DJ, vonMoltke LL, Schmider J, Harmatz JS, Shader R.I. Five distinct human cytochromes mediate amitriptyline N-demethylation in vitro: dominance of CYP2C19 and 3A4. *J Clin Pharmacol* 38(2): 112-121, 1998.
- 227.Vistisen K, Loft S, Poulsen HE. Cytochrome P4501A2 activity in man measured by caffeine metabolism: effect of smoking, broccoli and exercise. *Adv Exp Med Biol* 283:407-411, 1991.
- 228.Vistisen K, Poulsen HE, Loft S. Foreign compound metabolism capacity in man measured from metabolites of dietary caffeine. *Carcinogenesis* 13(9): 1561-1568, 1992.
- 229.Vrtačnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Marc J. The many faces of estrogen signaling. *Biochem Med* 24(3): 329-42, 2014.
- 230.Wahlander A, Paumgartner G. Effect of ketoconazole and terbinafine on the pharmacokinetics of caffeine in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 37(3): 279-83, 1989.
- 231.Wang JS, Backman JT, Taavitsainen P, Neuvonen PJ, Kivisto KT. Involvement of CYP1A2 and CYP3A4 in lidocaine N-deethylation and 3-hydroxylation on humans. *Drug Metab Dispos* 28(8): 959-965, 2000.
- 232.Wietholz H, Voegelin M, Arnaud MJ, Bircher J, Preisig R. Assessment of the cytochrome P-448 dependent liver enzyme system by a caffeine breath test. *Eur J Clin Pharmacol* 21(1): 53-59, 1981.
- 233.Wietholtz H, Zysset T, Kreiten K, Kohl D, Buchsel R, Matern S. Effect of phenytoin, carbamazepine, and valproic acid on caffeine metabolism. *Eur J Clin Pharmacol* 36(4): 401-406, 1989.
- 234.Wietholtz H, Zysset T, Marschall HU, Generet K, Matern S. The influence of rifampin treatment on caffeine clearance in healthy man. *J Hepatol* 22(1): 78-81, 1995.
- 235.Wilson K, Oram M, Horth C.E, Burnett D. The influence of the menstrual cycle on the metabolism and clearance of methaqualone. *Br J Clin Pharmacol* 14, 333-339, 1982.

236. Wojciki J, Gawronska-Sklarz B, Kazimierczyk J et al. Comparative pharmacokinetics of paracetamol in men and women considering follicular and luteal phases. *Arzneimittel Forschung* 29: 350-2, 1979.
237. Yager JD, Liehr JG. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 203-232, 1996.
238. Yamazaki H, Shaw PM, Guengerich FP, Shimada T. Roles of cytochromes P450 1A2 and 3A4 in the oxidation of estradiol and estrone in human liver microsomes. *Chem Res Toxicol* 11(6): 659-665, 1998.
239. Yoshimoto K, Echizen H, Chiba K, Tani M, Ishizaki T. Identification of human CYP isoforms involved in the metabolism of propranolol enantiomers--N-desisopropylation is mediated mainly by CYP1A2. *Br J Clin Pharmacol* 39(4): 421-431, 1995.
240. Yun C.-H., Shimada T, Guengerich, FP. Purification and characterization of human liver microsomal cytochrome P4502A6. *Mol Pharmacol* 40: 679-685, 1991.
241. Zaigler M., Rietbrock S., Szymanski J., Dericks-Tan J.S., Staib A.H., and Fuhr U. Variation of CYP1A2-dependent caffeine metabolism during menstrual cycle in healthy women. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 38(5): 235-244, 2000.
242. Zhang JW, Liu Y, Li W, Hao DC, Yang L. Inhibitory effect of medroxyprogesterone acetate on human liver cytochrome P450 enzymes. *Eur J Clin Pharmacol* 62(7): 497-502, 2006.
243. Zhu. B. T, Conney. A. H. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis (Lond.)* 19: 1-27, 1998.