

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ GSTM1 ΚΑΙ  
GSTT1 ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ S-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΩΝ ΤΗΣ  
ΓΛΟΥΤΑΘΕΪΟΝΗΣ (GSTs) ΣΕ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ  
ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Γ. ΤΖΗΜΑΓΙΩΡΓΗΣ, Λέκτορας Βιολογικής  
Χημείας Ιατρικής σχολής Α.Π.Θ.**

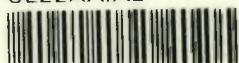
**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ  
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2006**



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

Αριθ. Εισ.: 5014/1  
Ημερ. Εισ.: 10-11-2006  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2006  
ΑΣΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087764

## **Ευχαριστίες**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε εξολοκλήρου στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. Θα ήθελα να εκφράσω τις ολόψυχες ευχαριστίες μου στον κ. Γεώργιο Τζημαγιώργη, Λέκτορα Βιολογικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Α.Π.Θ., για τη συνεχή παρακολούθηση και επίμονη καθοδήγηση που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών και της συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ζήση Μαμούρη, Αναπληρωτή Καθηγητή Γενετικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας τον κ. Κ. Σταθόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας καθώς και το σύλλογο των καθηγητών, που μου έδωσαν την ευκαιρία να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο Εργαστήριο της Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής του Α.Π.Θ.

Ευχαριστίες οφείλω στην κ. Νόρμα Βαβάτση, Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής Α.Π.Θ., που με δέχτηκε στο εργαστήριο. Ευχαριστώ ιδιαίτερος, την Θεοδώρα Κατωπόδη για την πολύτιμη βοήθεια καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων, τον Χρήστο Καραγεωργόπουλο που βοήθησε στην προσαρμογή και εκπαίδευση μου στο χώρο του εργαστηρίου καθώς και στις την Γιώτα Τουπλικιώτη, Ελισάβετ Γεωργίου και Κατερίνα Φράγγου για τις συμβουλές τους και την βοήθεια τους στην συγγραφή της παρούσας εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου για τις πολύτιμες συμβουλές τους στο χώρο του εργαστηρίου.

**Θεσσαλονίκη, Οκτώβριος 2006**

**Κ. Ασημακόπουλος**

## Περιεγόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract.....	5
<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u> .....	6
Επιδημιολογία του καρκίνου.....	6
Βιολογία του καρκίνου.....	6
Πορεία της καρκινογένεσης.....	8
Ογκογονίδια και καρκινογένεση.....	8
Ογκοκατασταλτικά γονίδια και καρκινογένεση.....	10
<u>ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ</u> .....	11
Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα.....	11
Ιστολογική ταξινόμηση .....	12
Αιτιολογία και παθογένεια.....	14
<u>S-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSTs)</u> .....	17
Δομή και λειτουργία των GSTs.....	17
Πολυμορφισμοί των GSTs.....	18
GSTM1.....	20
GSTT1.....	21
GSTP1.....	22
GSTM3.....	23
Πολυμορφισμοί των GSTs και καρκίνος του πνεύμονα.....	24
<u>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</u> .....	26
<u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u> .....	27
Προέλευση δειγμάτων.....	27
Εργαστηριακός εξοπλισμός .....	27
Χημικά διαλύματα.....	28
Μέθοδοι μοριακής βιολογίας.....	29
Απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων.....	29
Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ιστούς .....	29
Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αιμα.....	31
PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	32
Ποσοτικοποίηση δειγμάτων DNA.....	34
<u>ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ</u> .....	35
Αντιδράσεις ενίσχυσης PCR.....	36
Έλεγχος των PCR προϊόντων σε πηκτή αгарόζης .....	37
Στατιστική επεξεργασία.....	37
<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u> .....	38
<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u> .....	44
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u> .....	46

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός:** Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί παγκοσμίως την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Γενετικοί όσο και επιγενετικοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα. Το κάπνισμα φαίνεται να αποτελεί τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα. Επιπλέον, γενετικοί πολυμορφισμοί φαίνεται να ενοχοποιούνται για την παθογένεια της νόσου. Οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης είναι ένζυμα που εμπλέκονται στην αποτοξίνωση του οργανισμού από καρκινογόνες ουσίες περιλαμβανομένων και αυτών του καπνού. Έτσι πολυμορφισμοί των γονιδίων των ενζύμων αυτών έχουν θεωρηθεί ως ικανοί παράγοντες που θα μπορούσαν να μεταβάλλουν την πιθανότητα ενός ατόμου να εμφανίσει καρκίνο. Σκοπός της παρούσας πειραματικής εργασίας ήταν η ανάλυση και η μελέτη της συχνότητας εμφάνισης των GSTM1 and GSTT1 null πολυμορφισμών σε δείγματα από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα στον Ελληνικό πληθυσμό.

**Μέθοδος:** Εξετάστηκαν 45 δείγματα με πρωτοπαθή μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (non-small cell cancer, NSCLC) με τη μέθοδο της PCR. Την ίδια στιγμή εξετάστηκαν και άλλα 29 δείγματα αυτή τη φορά από υγιή άτομα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες .

**Αποτελέσματα:** Τα αποτελέσματα της παρούσας πειραματικής μελέτης έδειξαν μια συσχέτιση μεταξύ του GSTM1 null πολυμορφισμού και της εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα ( $p < 0.05$ ). Ο πολυμορφισμός ανιχνεύθηκε στο 56% των ασθενών, ποσοστό σημαντικά αυξημένο σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρες (31%). Καμία συσχέτιση δεν βρέθηκε για τον πολυμορφισμό GSTT1 null και τον καρκίνο του πνεύμονα.

## ABSTRACT

**Purpose:** Lung cancer is the leading cause of cancer-related death in both sexes worldwide. Genetic, as well as epigenetic factors influence lung cancer development. Tobacco smoke is the major etiological factor. Moreover, genetic polymorphisms seem to be implicated in the pathogenesis of the disease. Glutathione S-transferases are involved in detoxification of carcinogens including those from tobacco smoke. Therefore, polymorphisms in the GST genes have been considered as potential modifiers of individual's cancer risk. The aim of this experimental project was the analysis and determination of the frequencies of the GSTM1 and GSTT1 null polymorphisms in NSCC patients in Greek population.

**Methods:** Forty five specimens from patients with non small cell lung cancer (NSCLC) and twenty nine specimens from healthy individuals (controls) were analysed in this study using a PCR methodology.

**Results:** Our results showed that there is an association between GSTM1-null polymorphism and lung cancer, since it was found present in 56% of the specimens whereas in the control group it was observed in a lower degree (31%). No association was found for the GSTT1 null polymorphism and lung cancer.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Επιδημιολογία του καρκίνου.

Η αλματώδης πρόοδος της κυτταρικής και μοριακής βιολογίας καθώς και της φαρμακολογίας την τελευταία δεκαετία έχουν αλλάξει κατά πολύ την αντιμετώπιση διαφόρων ανίατων ασθενειών μεταξύ αυτών και του καρκίνου. Η κατανόηση των πολύπλοκων εκείνων μηχανισμών που οδηγούν ένα κύτταρο στο να αποκτήσει καρκινικό χαρακτήρα, είχε σαν αποτέλεσμα και την ανακάλυψη νέων μεθόδων πρόγνωσης, διάγνωσης και θεραπείας του καρκίνου. Παρά ταύτα ο καρκίνος συνεχίζει να αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου στις αναπτυγμένες χώρες. Από το συνολικό αριθμό περιστατικών καρκίνου που σημειώνονται ετησίως τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας παρατηρούνται στον καρκίνο του πνεύμονα και έπειτα σε άλλους καρκίνους, όπως του στομάχου, ήπατος, παχέως εντέρου, στήθους, παγκρέατος και προστάτη.

Σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Π.Ο.Υ) το περασμένο έτος (2005) σημειώθηκαν συνολικά 58,000,000 θάνατοι παγκοσμίως με ένα ποσοστό της τάξης του 13% να οφείλονται σε καρκίνο. Στις Η.Π.Α μόνο σημειώθηκαν πάνω από 1,37 εκατομμύρια περιστατικά καρκίνων από τα οποία τα 570,000 είχαν μοιραία κατάληξη<sup>(1)</sup>. Στην Ευρώπη, τα επιδημιολογικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι από τα 2,886,800 νέα περιστατικά που καταγράφηκαν περίπου 1,711,100 είχαν θανατηφόρα έκβαση<sup>(2)</sup>. Στη χώρα μας καταγράφονται ετησίως πάνω από 36,000 νέα κρούσματα, ενώ τουλάχιστον 22,000 άνθρωποι κάθε χρόνο χάνουν την μάχη με τον καρκίνο.

## Βιολογία του καρκίνου

Ο καρκίνος είναι μια σύνθετη και πολυπαραγοντική νόσος γεγονός που καθιστά αρκετά δύσκολη την επιτυχή ίαση του. Ο καρκίνος προσβάλλει περισσότερα από 60 όργανα και ιστούς του ανθρώπινου σώματος<sup>(1)</sup>. Με τον όρο καρκίνο ορίζουμε την μάζα ή αλλιώς τον όγκο νεοπλασματικών κυττάρων που προκύπτει από τον κλωνικό πολλαπλασιασμό ενός προδρόμου καρκινικού κυττάρου.

Το κύτταρο αυτό φέρει ένα σύνολο χαρακτηριστικών που το διαφοροποιεί από τα φυσιολογικά κύτταρα.

Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι :

- η ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση
- η μειωμένη ανάγκη σε αυξητικούς παράγοντες
- η αντίσταση σε μονοπάτια αναστολής της κυτταρικής αύξησης
- η αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση)
- η ικανότητα αγγειογένεσης
- η ικανότητα διήθησης σε γειτονικούς ιστούς και η δημιουργία απομακρυσμένων μεταστάσεων

Ο καρκίνος ως γενετική ασθένεια προκαλείται τόσο από **γενετικές βλάβες** όσο και από **επιγενετικές τροποποιήσεις** του γενετικού υλικού. Διαφέρει από άλλα γενετικά νοσήματα στο ότι οι εμπλεκόμενες μεταλλάξεις είναι σωματικές, δηλαδή συμβαίνουν σε διάσπαρτα κύτταρα του ώριμου σώματος, και διαφέρουν από τις μεταλλάξεις της γαμετικής σειράς που μεταβιβάζονται από τα γαμετικά κύτταρα από τα οποία αναπτύσσεται ολόκληρος ο πολυκύτταρος οργανισμός.

Οι γενετικές βλάβες αφορούν αλλαγές (μεταλλάξεις) στην αλληλουχία του DNA γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Οι κυριότεροι τύποι γενετικών αλλαγών που εντοπίζονται σε επίπεδο χρωμοσώματος είναι αριθμητικές (μη φυσιολογικός αριθμός χρωμοσωμάτων) ή δομικές αλλαγές (προσθήκες, ελλείψεις, μετατοπίσεις τμήματος χρωμοσώματος), ενώ σε επίπεδο DNA παρατηρούμε μεταλλάξεις αντικατάστασης ενός ζευγαριού βάσεων από άλλο και ελλείψεις βάσεων.

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις αφορούν αλλαγές που συμβαίνουν στο DNA χωρίς να μεταβάλλεται η αλληλουχία βάσεων στο γονιδίωμα. Η συμβολή τους στην καρκινογένεση πιστεύεται ότι είναι αποτέλεσμα της μεταβολής της έκφρασης σημαντικών γονιδίων που προκαλούν οι αλλαγές αυτές. Οι κυριότερες επιγενετικές αλλαγές είναι η μεθυλίωση της κυτοσίνης, η τροποποίηση της δομής της χρωματίνης με μεθυλίωση ή απακετυλίωση των ιστονών καθώς και η απώλεια γενωμικής εγγραφής ή αποτυπώματος (genomic imprinting) <sup>(1), (3) (4)</sup>.

Οι βλάβες που αφορούν κυρίως χρωμοσωμικές ανωμαλίες κληρονομούνται αλλά οι περισσότερες είναι επίκτητες και προκαλούνται συνήθως από την δράση περιβαλλοντικών παραγόντων όπως διάφοροι τύποι ακτινοβολίας (UV, κοσμική ακτινοβολία, ακτίνες X), χημικές ουσίες, κάπνισμα και κακή διατροφή. Τέλος αξίζει



να αναφερθεί ότι η επιμόλυνση υγιών κυττάρων από ογκογόνους ιούς είναι ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας επιγενετικής τροποποίησης.

## Πορεία της καρκινογένεσης

Η πορεία της καρκινογένεσης γενικά μπορεί να διακριθεί σε τρία στάδια <sup>(5)</sup>:

**1. Έναρξη (Initiation):** Κατά την έναρξη, η παρουσία μεταλλαξιγόνων παραγόντων οδηγεί σε βλάβες γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με ρόλο κλειδί στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το κύτταρο σε αυτό το πρώιμο στάδιο δεν έχει εκδηλώσει ακόμη νεοπλασματικό χαρακτήρα και ο ρυθμός διαίρεσης του είναι βραδύς.

**2. Προαγωγή (Promotion):** Στην φάση της προαγωγής, το αδρανές διαφοροποιημένο κύτταρο με έναυσμα την παρουσία παραγόντων που προωθούν την αύξηση (π.χ αυξητικοί παράγοντες ) αυξάνει την συχνότητα διαίρεσής του, ενώ παράλληλα φαίνεται να μην υπακούει στους φυσιολογικούς ελεγκτικούς μηχανισμούς του κυτταρικού κύκλου.

**3. Εξέλιξη (Progression):** Στο τελικό στάδιο της εξέλιξης, το κύτταρο διαιρείται ανεξέλεγκτα και αυτόνομα χωρίς την υποχρεωτική παρουσία αυξητικών παραγόντων. Επιπλέον, οι ολοένα αυξανόμενες μεταλλάξεις που συσσωρεύονται εξαιτίας του γρήγορου ρυθμού διαίρεσης προκαλούν απώλεια και άλλων βασικών λειτουργιών του κυττάρου όπως είναι η ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου ή απόπτωσης. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η αθανатоποίηση του κυττάρου και η δημιουργία νεοπλασμάτων.

## Ογκογονίδια και καρκινογένεση

Η ανακάλυψη της κλωνικής φύσης του καρκίνου συμφωνεί απόλυτα με την θεωρεία που υποστηρίζει ότι οι γενετικές αλλαγές (μεταλλάξεις ) ευθύνονται για την καρκινογένεση. Ο εντοπισμός των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για το φαινόμενο αυτό συνιστά ένα πεδίο έντονης επιστημονικής έρευνας. Τα πρώτα αποτελέσματα προέκυψαν από την μελέτη ρετροϊών που παρουσιάζουν ογκογόνο δράση. Σ' αυτούς βρέθηκαν γονίδια (**v-onc**) που μπορούν να μετασχηματίσουν την γονιδιακή έκφραση

ενδογενών κυτταρικών γονιδίων υπεύθυνων για τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (**c-onc**) καθώς και διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών. Ωστόσο, η πλειοψηφία των ανθρώπινων καρκίνων δεν προκαλείται από ιούς, αλλά από άλλους παράγοντες, όπως τα χημικά καρκινογόνα και οι ακτινοβολίες. Τα ογκογονίδια έχουν επικρατή χαρακτήρα, αφού γενετική αλλαγή σε ένα και μόνο αλληλόμορφο του πρωτο-ογκογονιδίου είναι ικανή να οδηγήσει σε σχηματισμό όγκων <sup>(6)</sup>.

Η ενεργοποίηση ογκογονιδίων περιλαμβάνει μηχανισμούς που τροποποιούν την δομή ή την έκφραση των κυτταρικών πρωτο-ογκογονιδίων και οδηγούν το κύτταρο να διαιρεθεί. Για την έκφραση όμως του νεοπλασματικού φαινοτύπου απαιτείται πέραν της ενεργοποίησης πρωτο-ογκογονιδίων και ταυτόχρονη απενεργοποίηση ή απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων <sup>(7)</sup>.

Οι κυριότεροι μηχανισμοί ενεργοποίησης πρωτο-ογκογονιδίων προς ογκογονίδια είναι οι εξής <sup>(8)</sup>:

- **Μεταλλάξεις:** αφορούν κυρίως σημειακές μεταλλάξεις αντικατάστασης βάσεων οι οποίες δύναται να ενεργοποιήσουν πρωτο-ογκογονίδια. Οι αλλαγές αυτές, που συνήθως συμβαίνουν σε ρυθμιστικές περιοχές της πρωτεΐνης, συχνά οδηγούν σε συνεχή δράση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Εκτός από τις μεταλλάξεις αντικατάστασης ικανές να ενεργοποιήσουν πρωτο-ογκογονίδια είναι και οι ελλείψεις και οι προσθήκες, αλλά απαντώνται σε μικρότερο ποσοστό στους ανθρώπινους καρκίνους. Σημειακές μεταλλάξεις σε γονίδια όπως τα H-ras, K-ras και N-ras φάνηκε να σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα και καρκίνου του παχέως εντέρου.
- **Γονιδιακή ενίσχυση:** ένας άλλος μηχανισμός που ευθύνεται για την ενεργοποίηση ενός πρωτο-ογκογονιδίου είναι ή υπερέκφραση του πρωτεϊνικού προϊόντος του μέσω της γονιδιακής ενίσχυσης. Σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνου βρέθηκε ότι ορισμένες αλληλουχίες παρουσιάζονται ενισχυμένες εφ' όσον αντιπροσωπεύονται από αυξημένο αριθμό αντιγράφων μέσα στο γονιδίωμα του κυττάρου. Η ενισχυμένη περιοχή μπορεί να περιλαμβάνει ένα πρωτο-ογκογονίδιο με συνέπεια την αυξημένη έκφραση του και συνεπώς την αύξηση της παραγόμενης πρωτεΐνης. Παραδείγματα πρωτο-ογκογονιδίων που εμφανίζονται ενισχυμένα σε διάφορους όγκους είναι τα: *c-myc*, *c-abl*, *c-myb*, *c-erbB*, *c-K-ras* και *mdm2*.

- **Χρωμοσωμικές αναδιατάξεις:** σε μερικές περιπτώσεις οι χρωμοσωμικές μετατοπίσεις μπορεί να ενεργοποιήσουν ένα πρωτο-ογκογονίδιο ιδιαίτερα όταν συμβαίνουν πολύ κοντά στον γενετικό του τόπο ή επι αυτού. Αυτός ο μηχανισμός είναι ιδιαίτερα κοινός σε αιματολογικές κακοήθειες όπως π.χ το λέμφωμα Burkitt.

## Ογκοκατασταλτικά γονίδια και καρκινογένεση

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια στη φυσιολογική τους μορφή καταστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο. Η ύπαρξη και ο ρόλος τους ανακαλύφθηκε το 1970 από μελέτες δημιουργίας υβριδικών καρκινικών- φυσιολογικών κυττάρων. Μέσα από πειράματα προέκυψαν υβριδικά κύτταρα με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του μη καρκινικού γονέα γεγονός που φανέρωνε την ύπαρξη παραγόντων στο φυσιολογικό κύτταρο που αναστέλλουν την κυτταρική διαίρεση. Πολλά από τα ογκοκατασταλτικά γονίδια του ανθρώπου έχουν χαρακτηριστεί και συσχετισθεί με την ανάπτυξη συγκεκριμένων μορφών καρκίνου <sup>(8)</sup>.

Όταν μεταλλαχθεί μόνο το ένα αλληλόμορφο γονίδιο, τότε το κύτταρο διατηρεί τον έλεγχο της διαίρεσης του λόγω παραγωγής του κανονικού γονιδιακού προϊόντος από το μη μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Όταν όμως απενεργοποιηθούν και τα δύο αλληλόμορφα ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου λόγω μετάλλαξης, τα κύτταρα μετασχηματίζονται και διαιρούνται συνεχώς. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν υπολειπόμενο χαρακτήρα <sup>(6)</sup>.

Σε πολλές μορφές καρκίνου είναι σύνηθες τα ογκοκατασταλτικά γονίδια να είναι ελαττωματικά ή να απουσιάζουν. Έτσι, όταν απωλεσθεί ένα μεγάλο τμήμα κάποιου χρωμοσώματος παρατηρείται το φαινόμενο της απώλειας ετεροζυγωτίας (Loss of heterozygosity) <sup>(9)</sup>.

Η απώλεια ετεροζυγωτίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων προκαλείται από μηχανισμούς όπως:

- απώλεια ολόκληρου του χρωμοσώματος ή του βραχίονα που περιέχει το φυσιολογικό αλληλόμορφο
- διπλασιασμό του χρωμοσώματος που περιέχει το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο και προηγούμενη απώλεια του χρωμοσώματος με το φυσιολογικό αλληλόμορφο

- μιτωτικό ανασυνδυασμό αλληλομόρφων
- με ανεξάρτητη μεταλλαγή
- με έκτοπη μεθυλίωση του υποκινητή του <sup>(10)</sup>.

## ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

### Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο σε παγκόσμια κλίμακα για άνδρες και γυναίκες. Τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας (75% των ασθενών καταλήγει) είναι αποτέλεσμα της μη έγκαιρης διάγνωσης. Δεδομένα από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας αναφέρουν πως η θνησιμότητα ανέρχεται στα 1,3 εκατομμύρια θανάτους / χρόνο, ενώ προβλέπεται πως μέχρι το έτος 2010 οι θάνατοι θα ανέλθουν στα 1,5 εκατομμύρια / χρόνο <sup>(11, 12, 13)</sup>.

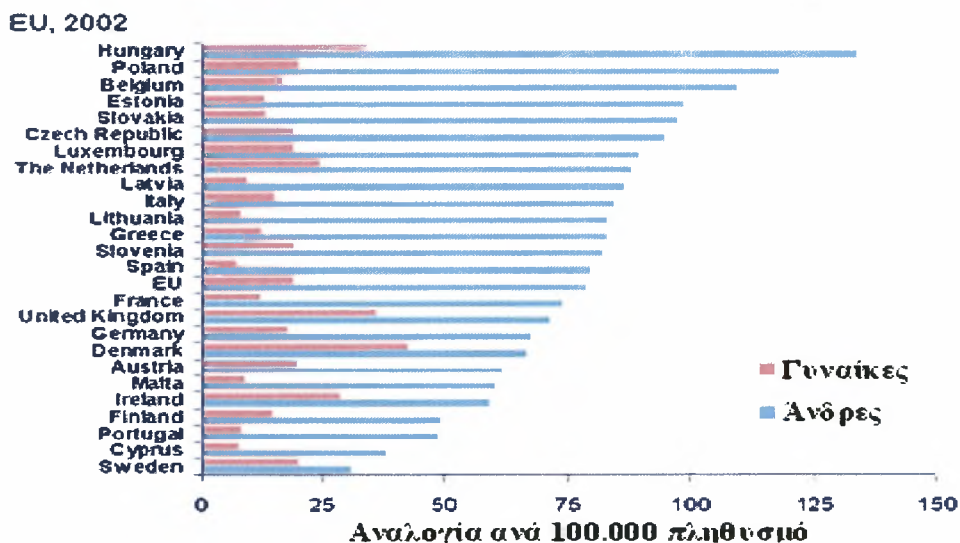
Σύμφωνα με στατιστικές μελέτες εκτιμάται πως στις Η.Π.Α κάθε χρόνο θα διαγιγνώσκονται 178.000 νέες περιστατικά καρκίνου του πνεύμονα, με 160.400 ασθενείς να καταλήγουν. Για το 2005, ο αριθμός τους υπολογίστηκε στα 163.510 άτομα αντιπροσωπεύοντας το 28,7% των θανάτων που προκαλούνται από καρκίνο <sup>(12, 13, 14, 15, 16)</sup>.

Στην Ευρώπη ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί τον πιο συχνό τύπο καρκίνου και την κυριότερη αιτία θανάτου από καρκίνο. Για το 2002 (Εικ.1) ο αριθμός των νέων περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα ήταν 199.844 άτομα ενώ οι θάνατοι έφτασαν τα 191.301 άτομα (>33.000 στην Αγγλία). Επιδημιολογικά δεδομένα, για το 2005, που προέκυψαν από έρευνα της IARC (Internacional Agency for Research on Cancer) έδειξαν πως τα περιστατικά καρκίνου του πνεύμονα στην Ευρώπη για το 2004 ανήλθαν στο 13,2% (381.500 άτομα) του συνόλου των περιπτώσεων καρκίνου ενώ οι θάνατοι έφτασαν τους 341.800. Στην Ελλάδα η επίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα εκτιμήθηκε για το 2004 συνολικά (άνδρες και γυναίκες) σε 6.631 περιπτώσεις <sup>(2, 17, 18)</sup>.

Ο κυριότερος αιτιολογικός παράγοντας για την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα θεωρείται το κάπνισμα. Η νόσος είναι πιο συχνή σε άνδρες λόγω και της τάσης τους να καπνίζουν περισσότερο από τις γυναίκες. Βέβαια από το 1990, παρατηρείται

σταδιακή πτωτική τάση της θνησιμότητας των ανδρών, γεγονός που αντικατοπτρίζει την ταυτόχρονη τάση για μείωση του καπνίσματος (2, 15). Αντιθέτως, για τις γυναίκες τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια απότομη αύξηση τόσο του αριθμού νέων περιστατικών όσο και του ποσοστού θνησιμότητας. Αξίζει να σημειωθεί ότι μεταξύ 1950-1994 η θνησιμότητα των γυναικών στις Η.Π.Α. αυξήθηκε από 3% σε 22% (αύξηση της τάξης του 500%) ως αποτέλεσμα της αύξησης της συνήθειας του καπνίσματος στο γυναικείο πληθυσμό, ιδιαίτερα στις νεαρές γυναίκες (27,7% το 2001) (16, 19).

Η μέση ηλικία διάγνωσης του καρκίνου του πνεύμονα, σε ποσοστό πάνω από 70%, είναι τα 69 έτη. Η εντόπισή του σε ηλικίες κάτω των 50 ετών είναι σχετικά σπάνια. (12).



Εικόνα 1: Η επίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα κατά φύλο σε χώρες της Ευρώπης

## Ιστολογική ταξινόμηση και σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα ταξινομείται ανάλογα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του σε δύο κύριους τύπους: **το μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα** (Small Cell Lung Cancer, SCLC) και **το μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα** ( Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC). Το 90% των περιστατικών

καρκίνου του πνεύμονα ανήκουν στους δυο αυτούς τύπους, ενώ ένα μικρό ποσοστό καρκίνων του πνεύμονα παρουσιάζει χαρακτηριστικά τόσο του SCLC, όσο και του NSCLC. Ο καρκίνος αυτός ονομάζεται «Συνδυασμένος μικροκυτταρικός/μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα»<sup>(17,20)</sup>.

- **Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC):** αντιπροσωπεύει το 20-25% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα. Χαρακτηριστικά αυτού του τύπου καρκίνου είναι ο ταχύς ρυθμός ανάπτυξης και διάδοσης σε όλο το σώμα, αφού συνήθως κατά το στάδιο της διάγνωσης του έχει ήδη προχωρήσει σε μεταστάσεις στους λεμφαδένες και σε άλλα όργανα (π.χ. οστά, εγκέφαλος, ήπαρ, επινεφρίδια). Ο κύριος ιστός εντόπισης του μικροκυτταρικού καρκίνου είναι το βρογχικό επιθήλιο στο κέντρο των πνευμόνων (80%), ενώ πιο σπάνια (20%) η νόσος ξεκινά από την περιφέρεια (βρόγχοι). Τα καρκινικά κύτταρα του SCLC είναι μικρά σε μέγεθος, ομοιόμορφα κύτταρα με πυκνούς στρογγυλούς ή ωοειδείς πυρήνες που περιέχουν διάχυτη χρωματίνη, δυσδιάκριτους πυρηνίσκους και αραιό κυτταρόπλασμα. Ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας εμφάνισης μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα είναι το κάπνισμα, ενώ οι ασθενείς με SCLC έχουν πολύ δυσμενή πρόγνωση.
- **Μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC):** το υπόλοιπο 75-80% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα είναι μη μικροκυτταρικού τύπου. Ο τύπος αυτός καρκίνου αναπτύσσεται και εξαπλώνεται με πιο αργό ρυθμό από ότι ο μικροκυτταρικός και διακρίνεται σε 3 επιμέρους ιστολογικούς τύπους, με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά:
  - **Αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma):** αποτελεί την πιο διαδεδομένη μορφή καρκίνου του πνεύμονα καθώς ευθύνεται για το 40% όλων των περιπτώσεων. Τα αδενοκαρκινικά κύτταρα έχουν σωληνοειδές σχήμα με ικανότητα παραγωγής βλέννας. Οι όγκοι αυτοί συνήθως εμφανίζονται στο επιθήλιο των βρόγχων και εντοπίζονται περιφερικά στους πνεύμονες. Μεταστάσεις συμβαίνουν συχνά στα πρώιμα στάδια της νόσου<sup>(21)</sup>.
  - **Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (squamous cell carcinoma):** είναι μια από τις πιο κοινές μορφές καρκίνου του πνεύμονα, καθώς ευθύνεται για το 30% περίπου όλων των περιστατικών. Ξεκινά από τους μεγάλους βρόγχους και παραμένει στην περιοχή του θώρακα χωρίς να προχωρεί σε μεταστάσεις, τουλάχιστον στα αρχικά στάδια της νόσου. Οι όγκοι αυτού του τύπου χαρακτηρίζονται από κερατινοποίηση των κυττάρων.

- **Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (large cell carcinoma):** ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για όλους τους καρκίνους του πνεύμονα που δεν ταξινομούνται στις κατηγορίες του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος και του αδenoκαρκινώματος. Ευθύνεται για το 15% περίπου όλων των περιπτώσεων και μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε περιοχή του πνεύμονα <sup>(22)</sup>. Ο τύπος αυτός καρκίνου του πνεύμονα σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση για τον ασθενή και με τάση για εμφάνιση μεταστάσεων τόσο στο θώρακα, όσο και σε άλλα απομακρυσμένα όργανα <sup>(23)</sup>.

Αναφορικά με τη σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα αυτοί ταξινομούνται σε τέσσερα στάδια (στάδιο I-IV) με βάση το μέγεθος του όγκου, την ανίχνευση καρκινικών κυττάρων στους λεμφαδένες καθώς και την ανεύρεση μετάστασής τους σε άλλα όργανα <sup>(17)</sup>. Τα στάδια αυτά είναι :

- **Σταδίου I** Το μέγεθος των όγκων δε ξεπερνά τα 3cm και δεν διηθούν τους λεμφαδένες ή τους κύριους βρόγχους
- **Σταδίου II** Οι όγκοι εμφανίζουν ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω χαρακτηριστικά: έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από 3cm, περιλαμβάνουν τους κύριους βρόγχους ή διηθούν τον περιπλάχιο υπεζωκότα.
- **Σταδίου III** Οι όγκοι έχουν οποιοδήποτε μέγεθος, διηθούν το θωρακικό τοίχωμα, το διάφραγμα, το μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα, το περίτονο περικάρδιο και τους λεμφαδένες.
- **Σταδίου IV** Οι όγκοι παρουσιάζουν μεταστάσεις σε άλλα όργανα.

## **Αιτιολογία και παθογένεια του καρκίνου του πνεύμονα**

- **Κάπνισμα**

Ο καρκίνος του πνεύμονα, αν και πολυπαραγοντική νόσος, έχει ως κύριο αιτιολογικό παράγοντα το κάπνισμα που ευθύνεται για το 85-90% των περιπτώσεων <sup>(15, 24)</sup>. Μάλιστα ο σχετικός κίνδυνος για τους καπνιστές είναι πάνω από 20 φορές υψηλότερος και είναι ανάλογος με την ημερήσια κατανάλωση τσιγάρων και τη διάρκεια του καπνίσματος. Το κάπνισμα προκαλεί καρκίνο του πνεύμονα επειδή κατά

την καύση (πυρόλυση) του καπνού παράγονται πάρα πολλές χημικές ουσίες, αρκετές από τις οποίες είναι καρκινογόνες. Οι πιο γνωστές καρκινογόνες ομάδες ουσιών είναι οι *πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες*, οι *νιτροζαμίνες* (οι οποίες ενοχοποιούνται για την πρόκληση καρκίνου σε παθητικούς καπνιστές) και οι *αρωματικές αμίνες*.

Μελέτες έχουν γίνει και για την επίδραση του *παθητικού καπνίσματος* στην εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. Τα αποτελέσματα επιδεικνύουν μια σταθερή εικόνα θετικής, και συνήθως δοσοεξαρτώμενης, συσχέτισης μεταξύ περιβαλλοντικής έκθεσης στον καπνό του τσιγάρου και καρκίνου του πνεύμονα. <sup>(25, 26)</sup>

Εκτός από το κάπνισμα και άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η εισπνοή *ινών αμιάντου, σκόνης μεταλλευμάτων, άσβεστου και ραδονίου* και γενικά η *μόλυνση της ατμόσφαιρας* έχουν αποδεδειγμένη καρκινογόνο δράση και ενοχοποιούνται για την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα.

- **Διατροφή**

Πολλές μελέτες υποστηρίζουν πως η κακή διατροφή (δίαιτα πλούσια σε λιπαρά και υψηλά επίπεδα χοληστερόλης) δρα συνεργικά με το κάπνισμα για την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. Επιπλέον, από μελέτες που έγιναν σε καπνιστές φαίνεται πως η αυξημένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών μειώνει τον κίνδυνο. Η προστατευτική δράση των φρούτων και λαχανικών συνίσταται στην υψηλή περιεκτικότητα τους κυρίως στις *βιταμίνες A, E, C* σε *καροτένια, φλαβονοειδή και πολυφαινόλες*, ουσίες με έντονη αντιοξειδωτική δράση <sup>(27)</sup>.



- **Γενετικοί πολυμορφισμοί**

Η ύπαρξη γενετικών πολυμορφισμών που τροποποιούν την δραστικότητα ενζύμων απαραίτητων για τον μεταβολισμό και απενεργοποίηση των καρκινογόνων ουσιών του τσιγάρου φάνηκε να σχετίζεται με διαφορετικού βαθμού ευπάθεια στην χημική καρκινογένεση. Άλλωστε έχει παρατηρηθεί μια σημαντική απόκλιση μεταξύ του αριθμού των ατόμων που καπνίζουν και αυτών που αναπτύσσουν καρκίνο, η οποία εν μέρει φαίνεται να οφείλεται σε παραλλαγές ορισμένων ενζύμων του μεταβολισμού. Άτομα με συγκεκριμένους γενετικούς πολυμορφισμούς στα ένζυμα αυτά φαίνεται να έχουν αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου. Τέτοια παραδείγματα είναι οι πολυμορφισμοί δύο βασικών αποτοξινωτικών ενζυμικών ομάδων, των *γονιδίων της οικογένειας του κυτοχρώματος P450 ή CYP* (CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6) και των *γονιδίων των S-τρανσφεράσων της γλουταθειόνης* (GSTM1, GSTM3, GSTP1, GSTT1).

Ειδικότερα, τα κυτόχρωμα P450 συνθέτουν μια οικογένεια περίπου 30 πρωτεϊνών, οι οποίες συμμετέχουν στον οξειδωτικό μεταβολισμό διαφόρων χημικών ουσιών, μεταξύ αυτών και των καρκινογόνων ουσιών του τσιγάρου, μετατρέποντας μια αδρανή προ-καρκινογόνο ουσία σε ενεργό καρκινογόνο μεταβολίτη. Κάποιοι πολυμορφισμοί σχετίζονται με πιο γρήγορη ενεργοποίηση των καρκινογόνων ουσιών του τσιγάρου και επομένως με εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα.

Η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης συμμετέχει στην αποτοξίνωση του οργανισμού, απομακρύνοντας ορισμένους ενδιάμεσους μεταβολίτες των καρκινογόνων ουσιών του τσιγάρου. Πολυμορφισμοί που καθιστούν το ένζυμο αυτό αδρανές συσχετίζονται με εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα <sup>(13, 25, 28, 29)</sup>.

Επιπλέον, πολυμορφισμοί στο *γονίδιο της DNA μεθυλοτρανσφεράσης 3B* (283T>C), που επηρεάζουν την έκφραση και την ενεργότητα της DNMT3B, επιτείνουν τη γενετική ευπάθεια για εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα <sup>(30)</sup>.

## S-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSTs)

### Δομή και λειτουργία των s-τρανσφερασών της γλουταθειόνης

Οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) είναι πολυλειτουργικά ένζυμα ευρέως διαδεδομένα στους αερόβιους οργανισμούς. Κατατάσσονται στα μεταβολικά ένζυμα φάσης II και κύριος τους ρόλος είναι η αποτοξίνωση του οργανισμού από ξενοβιοτικές ουσίες όπως διάφορα φάρμακα, καρκινογόνα αλλά και περιβαλλοντικοί ρύποι. Αυτό το επιτυγχάνουν με την ένωση των ξενοβιοτικών ουσιών με το τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης. Η ένωση αυτή με τη γλουταθειόνη καθιστά την ξενοβιοτικές ουσίες λιγότερο τοξικές καθώς και ιδιαίτερα διαλυτές σε υδατικά διαλύματα σε σχέση με την ελεύθερη ουσία. Με αυτό το τρόπο διευκολύνεται η απέκκρισή της από τον οργανισμό μέσω του απεκκριτικού συστήματος του, και άρα καθίσταται δυνατή η αποτοξίνωση και η προστασία των κυττάρων από καρκινογόνες και κυτταροτοξικές ουσίες.

Η υπερικογένεια των γονιδίων που κωδικοποιούν τις GSTs είναι διάσπαρτη σε όλο το γονιδιώμα των οργανισμών που τη φέρουν και ευθύνεται για την παραγωγή εξειδικευμένων ενζύμων όσον αφορά το υπόστρωμα, τον κυτταρικό τύπο αλλά και τον υποκυτταρικό εντοπισμό. Στον άνθρωπο τα ένζυμα αυτά ταξινομούνται σε οκτώ κύριες τάξεις: alpha(GSTA), Mu (GSTM), Pi (GSTP), Kappa (GSTK), Theta (GSTT), Sigma (GSTS), Omega (GSTO) και Zeta (GSTZ)<sup>(31)</sup>. Κάθε κατηγορία περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα ισοένζυμα με διαφορετική ή (σποραδικά) μερικής επικαλυπτόμενη εξειδίκευση για το υπόστρωμα. Η κατηγοριοποίηση σε αυτές τις τάξεις έγινε έπειτα από μελέτη ομοιότητας αλληλουχίας αλλά και έπειτα από μελέτη άλλων ιδιοτήτων όπως φυλογενετικές σχέσεις, ανοσολογικές ιδιότητες, τριτοταγής δομή αλλά και από την ικανότητα τους να σχηματίζουν ετεροδιμερή<sup>(32)</sup>.

Οι GSTs μπορούν επίσης να διαχωριστούν σε δυο περαιτέρω ομάδες, αυτή τη φορά με κριτήριο τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό (κυτταροπλασματικές, μικροσωμικές). Η πλειοψηφία αυτών εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα με την μορφή ετεροδιμερών, ενώ λιγότερες είναι μικροσωμικές. Οι δομικές μονάδες του λειτουργικού ενζύμου είναι δυο πρωτεϊνικές υπομονάδες μεγέθους 24-28 kDa η κάθε μια. Κάθε υπομονάδα χαρακτηρίζεται από δυο περιοχές την G και την H οι οποίες είναι και περιοχές σύνδεσης των υποστρωμάτων. Η περιοχή G παρουσιάζεται ιδιαίτερα συντηρημένη και είναι η περιοχή όπου συνδέεται το τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης. Αποτελείται

κυρίως από αμινοξέα του αμινο-τελικού άκρου της πρωτεΐνης. Η περιοχή H από την άλλη είναι η περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος. Η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ποικιλία στη δομή και αποτελείται από αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης<sup>(2) (33)</sup>.

Για την λειτουργία του ενζύμου απαιτείται η σύνδεση της γλουταθειόνης και η ενεργοποίησή της. Η ενεργοποίηση αυτή γίνεται από το αμινοτελικό άκρο του ενζύμου που αντιδρά με την γλουταθειόνη με σκοπό την δημιουργία ανιόντωνθειόλης. Τα νουκλεόφιλα αυτά ανιόντα στη συνέχεια αντιδρούν με το υπόστρωμα που είναι δεσμευμένο στην περιοχή H. Η ενεργή περιοχή σύνδεσης του υποστρώματος είναι γενικά διατηρημένη στις τάξεις των GSTs (π.χ εντός της τάξης Mu) αλλά διαφέρουν μεταξύ διαφορετικών τάξεων alpha (GSTA), Mu (GSTM), Pi (GSTP), Kappa (GSTK), Theta (GSTT), Sigma (GSTS) και Omega (GSTO).

## **Πολυμορφισμοί των GSTs**

Στα γονίδια των ενζύμων GSTs έχουν παρατηρηθεί διάφοροι πολυμορφισμοί που σχετίζονται με μερική δυσλειτουργία των ενζύμων, αλλά και άλλοι που σχετίζονται με την πλήρη απουσία αυτών. Στην τελευταία περίπτωση μιλάμε για ατελή αποτοξίνωση και μιας και αυτά τα ένζυμα είναι υπεύθυνα για την αδρανοποίηση αρκετών καρκινογόνων, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), πιστεύεται πως η έλλειψη τους σχετίζεται με την καρκινογένεση. Ιδιαίτερα ευπαθή παρουσιάζονται τα όργανα που έρχονται σε άμεση επαφή με την καρκινογόνο ουσία όπως είναι οι πνεύμονες, όργανα του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, η ουροδόχος κύστη, καθώς και όργανα του γαστρεντερικού συστήματος. Υποψίες υπάρχουν και για περιστατικά καρκίνων του μαστού οφειλόμενα στην ατελή ή μη αποτοξίνωση από τα PAHs.

Επιπλέον έχει βρεθεί ότι άτομα που στερούνται ισοένζυμο της οικογένειας ενζύμων GSTs (στην συγκεκριμένη μελέτη το ισοένζυμο GSTM1) παρουσίασαν υψηλότερα ποσοστά καταλοίπων υδρογονανθράκων-dGMP (τα οποία μπορούν να επάγουν την μεταλλαξιγένεση)<sup>(34)</sup>. Επιπροσθέτως έχει βρεθεί ότι οι πολυμορφισμοί των GSTs διαφέρουν όσον αφορά την συχνότητα εμφάνισης τους από πληθυσμό σε πληθυσμό, αλλά παρατηρούνται σταθερές συχνότητες εντός του κάθε πληθυσμού. **(Πίν 1)**

Από όλα τα ισοένζυμα των GSTs εκείνα που έχουν προσελκύσει το ιδιαίτερο ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας είναι τα ένζυμα GSTM1, GSTM3, GSTP1, GSTT1 (και οι πολυμορφισμοί τους) λόγω της ικανότητάς τους να αδρανοποιούν τις επιβλαβείς και καρκινογόνες ουσίες, στις οποίες εκτίθεται καθημερινά ο άνθρωπος εξαιτίας της περιβαλλοντικής ρύπανσης ή λόγω του καπνίσματος. Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν διαφορές όσον αφορά, τη θέση τους στο γονιδίωμα, τα υποστρώματά τους, τον τύπο πολυμορφισμού τους και την συχνότητα εμφάνισής τους εντός διαφορετικών πληθυσμών (Πίν. 1).

**Πίνακας 1:** Περιγραφή των πλέον κοινών πολυμορφισμών των γονιδίων 4 ισοενζύμων GST με ιδιαίτερο ρόλο στην κυτταροπροστασία από καρκινογόνες ουσίες του καπνού του τσιγάρου και της περιβαλλοντικής ρύπανση <sup>(34)</sup>.

Γονίδιο	GSTM1	GSTM3	GSTP1		GSTT1
<b>Θέση στο χρωμόσωμα</b>	1p13.3	1p13.3	11q13.3		12q11.23
<b>Μήκος γονιδίου</b>	5.92kb	4.53kb	2.84kb		8.09kb
<b>Αριθμός εξονίων</b>	8	9	7		5
<b>Θέση πολυμορφισμού</b>	Έλλειψη	Έλλειψη 3 kb στο ιντρόνιο 6	A313G (Ile105Val)	C341T (Ala105Val)	Έλλειψη
<b>Ενζυμική ενεργότητα</b>	Μηδενική	Αδιευκρίνιστη	Μειωμένη κατά 30%		Μηδενική
<b>Κύριοι ιστοί έκφρασης</b>	Ήπαρ, νεφροί	Πνεύμονες, όρχις και εγκέφαλος	Πνεύμονες		Ήπαρ, νεφροί
<b>Κύρια υποστρώματα</b>	Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες αφλατοξίνες	Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και αφλατοξίνες	N-acetylbenzoquinone imine, 4-nitroquinoline-1-oxide, πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες		Υδροξυακρυλ αρένια-βουταδιένιο, μονό και διαλοαλκάνια
<b>Σχετικές συχνότητες εμφάνισης πολυμορφισμών σε Ευρωπαίους, Ασιάτες, Αφροαμερικάνους</b>	50% / 51% / 30%	3% / ? / ?	10% / 2% / 14%	1% / ? / ?	24% / 51% / 25%

## GSTM1

Πρόκειται για μια S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης που ανήκει στην τάξη Mu. Το υπεύθυνο γονίδιο που την κωδικοποιεί ανήκει σε μια μεγαλύτερη ομάδα οργανωμένων γονιδίων (GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4, GSTM5) που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 και συγκεκριμένα στην θέση 1p13.3. (Εικ. 2). Το μήκος του γονιδίου είναι 5,92 kb και περιέχει 8 εξόνια <sup>(35)</sup>. Κατά το μάτισμα του πρόδρομου mRNA του γονιδίου αυτού μπορεί να συμβεί απώλεια ενός εξονίου με αποτέλεσμα την δημιουργία μιας ισομορφής της αρχικής πρωτεΐνης (Εικ. 3). Το λειτουργικό ένζυμο εκφράζεται φυσιολογικά στο ήπαρ και στους νεφρούς όπου και ασκεί αποτοξινωτική δράση από πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs), ουσίες ιδιαίτερα καρκινογόνες που βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στον καπνό του τσιγάρου, αλλά και από αφλατοξίνες .

Το γονίδιο αυτό παρουσιάζεται ιδιαίτερα πολυμορφικό με κυρίαρχο πολυμορφισμό τη μορφή GSTM1-null που προκύπτει από τη διαγραφή του γονιδίου και χαρακτηρίζεται από ολοκληρωτική απουσία της προστατευτικής λειτουργίας του ενζύμου. Η συχνότητα εμφάνισης του null πολυμορφισμού αυτού αγγίζει το 50% για τον ευρωπαϊκό πληθυσμό και έτσι καθιστά καίριο το ερώτημα αν το γενετικό υπόβαθρο σε GSTM1 μπορεί να συσχετισθεί με την συχνότητα της καρκινογένεση λόγω του καπνίσματος <sup>(36)</sup>.

Τέλος έχουν αναφερθεί και οι πολυμορφισμοί GSTM1 A\* και GSTM1 B\* που διαφέρουν μεταξύ τους κατά ένα νουκλεοτίδιο (C → G 534) αλλά δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί δεν επηρεάζουν την δραστηριότητα του ενζύμου <sup>(37)</sup> .

### **Χρωμόσωμα 1 θέση: 1p13.3**



**Εικόνα 2:** Διάταξη γονιδίων Mu τάξης στο χρωμόσωμα 1.



**Εικόνα 3:** Δομή γονιδίου GSTM1. Οι κωδικές περιοχές υποδεικνύονται από τα κόκκινα παραλληλόγραμμα ενώ οι 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές από τα μπλε.

## GSTT1

Πρόκειται για μια S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης που ανήκει στην τάξη theta. Τα γονίδια της τάξης αυτής βρίσκονται όλα οργανωμένα στο χρωμόσωμα 22 και συγκεκριμένα στην θέση 22q11.23 (**Εικ. 4**). Η τάξη theta περιλαμβάνει τα GSTT1 GSTT2 τα οποία έχουν κοινή αλληλουχία κατά 55% και πιστεύεται ότι η λειτουργία τους έχει προστατευτική δράση στον χημικά επαγόμενο καρκίνο εμποδίζοντας ηλεκτρόφιλα μόρια να αντιδράσουν με το DNA αδρανοποιώντας τα με την ένωση τους με γλουταθειόνη<sup>(35)</sup>. Το υπεύθυνο για το ένζυμο GSTT1 γονίδιο έχει μέγεθος 8,09 kb και περιέχει 5 εξόνια τα οποία και δομούν την λειτουργική πρωτεΐνη (**Εικ. 5**)<sup>(35)</sup>. Το ένζυμο εκφράζεται στο ήπαρ και στους νεφρούς όπου και χρησιμοποιεί σαν κύρια υποστρώματα χημικές ενώσεις όπως υδροξυακρυλαρένια, βουταδιένιο, μονό και διαλοαλκάνια<sup>(34)</sup>.

Και σε αυτό το γονίδιο παρατηρούνται πολυμορφισμοί με κυρίαρχη τη μορφή GSTT1-null, αντίστοιχη της μορφής GSTM1-null, που προέκυψε από διαγραφή και των δύο αλληλομόρφων του γονιδίου. Οι συχνότητες του πολυμορφισμού GSTT1-null για τον ευρωπαϊκό πληθυσμό (Καυκάσια φυλή) κυμαίνονται στο 20-30%<sup>(37)</sup>.

### **Χρωμόσωμα 22 θέση: 22q11.23**



**Εικόνα 4:** Διάταξη γονιδίου GSTT1 τάξης στο χρωμόσωμα 22.



**Εικόνα 5:** Δομή γονιδίου GSTT1. Οι κωδικές περιοχές υποδεικνύονται από τα κόκκινα παραλληλόγραμμα ενώ οι 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές από τα μπλε.

## GSTP1

Το κυριότερο ένζυμο της τάξης pi των τρανσφερασών της γλουταθειόνης (GSTP1) κωδικοποιείται από ένα γονίδιο μήκους 2,84kb που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 και συγκεκριμένα στην θέση 11q13.3(**Εικ. 6**). Το γονίδιο αποτελείται από 7 εξόνια και είναι ιδιαίτερα πολυμορφικό (**Εικ. 7**)<sup>(35)</sup>. Ο συχνότερα απαντώμενος πολυμορφισμός του δημιουργείται από μετάλλαξη και αλλαγή μιας αδερίνης στην θέση 313 σε γουανίνη. Ένας άλλος πολυμορφισμός παρατηρείται ύστερα από μετάλλαξη και αλλαγή της κυτοσίνης στην θέση 341 από θυμίνη. Στο επίπεδο της πρωτεΐνης τώρα οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε αλλαγή αμινοξέως από Ile σε Val και από Ala σε Val αντίστοιχα για τους δυο πολυμορφισμούς, γεγονός που επηρεάζει σε μεγάλο ποσοστό (30%) την δραστηριότητα του ενζύμου<sup>(34)</sup>.

Η μερική αυτή δυσλειτουργία συνδυαζόμενη με το γεγονός ότι και αυτό το ένζυμο παρέχει αποτοξινωτική δράση από τα PAHs στον οργανισμό γεννά υποψίες κατά πόσο συνδράμει η ύπαρξη του πολυμορφισμού GSTP1 A331G στην καρκινογένεση.

Από μελέτες που έχουν γίνει ως τώρα δεν φαίνεται κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση του παραπάνω πολυμορφισμού όταν μελετάται μεμονωμένα. Αντιθέτως, όταν ο πολυμορφισμός στο GSTP1 μελετηθεί μαζί με τους πολυμορφισμούς των ισοενζύμων GSTM1 και GSTT1 τότε παρουσιάζεται κάποια συσχέτιση<sup>(31)</sup>.



**Εικόνα 6:** Διάταξη γονιδίου GSTP1 pi τάξης στο χρωμόσωμα 11.



**Εικόνα 7:** Δομή γονιδίου GSTP1. Οι κωδικές περιοχές υποδεικνύονται από τα κόκκινα παραλληλόγραμμα ενώ οι 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές από τα μπλε.

## GSTM3

Το ένζυμο αυτό κωδικοποιείται από ένα γονίδιο μήκους 4,53 kb που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 στην θέση 1p13,3 (**Εικ. 8**) και αποτελείται από 9 εξόνια (**Εικ. 9**)<sup>(35)</sup>. Και αυτό το γονίδιο είναι πολυμορφικό με κυριότερο πολυμορφισμό μια έλλειψη 3bp από το ιντρόνιο 6. Το πολυμορφικό γονίδιο περιέχει μια περιοχή αναγνώρισης για τον μεταγραφικό παράγοντα YY1, ο οποίος πιστεύεται ότι ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου. Υποψίες υπάρχουν ότι η δράση του παράγοντα αυτού οδηγεί σε διαφορετική έκφραση του αγρίου τύπου GSTM3 σε σχέση με το μεταλλαγμένο γονίδιο με υπερισχύουσα την πρωτεΐνη που παράγεται από το γονίδιο που φέρει την μετάλλαξη<sup>(39)</sup>. Η ικανότητα του να έχει επικαλυπτόμενη εξειδίκευση με το ένζυμο GSTM1, όσον αφορά στον μεταβολισμό των PAHs, δημιουργεί ερωτηματικά για την συμμετοχή του ή όχι στην επαγωγή της καρκινογένεσης.



**Εικόνα 8:** Διάταξη γονιδίου GSTM3 μη τάξης στο χρωμόσωμα 1.



**Εικόνα 9:** Δομή γονιδίου GSTM3. Οι κωδικές περιοχές υποδεικνύονται από τα κόκκινα παραλληλόγραμμα ενώ οι 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές από τα μπλε.



## Πολυμορφισμοί GSTs και καρκίνος του πνεύμονα

Η σπουδαιότητα του ρόλου των GSTs στην αποτοξίνωση του οργανισμού είναι ιδιαίτερα μεγάλη μιας και τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για την αδρανοποίηση του μεγαλύτερου μέρους των καρκινογόνων ουσιών του καπνού. Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα αυτά τροποποιούν τη δράση των ενζύμων αυτών σε δραστικό βαθμό. Ένας πολυμορφισμός μιας GST μπορεί να οδηγήσει είτε σε μια πρωτεΐνη που υπολειτουργεί (π.χ πολυμορφισμός της GSTP1) είτε σε μια πρωτεΐνη η οποία δεν παράγεται καθόλου (π.χ πολυμορφισμοί των GSTM1-null και GSTT1-null). Τα παραπάνω δεδομένα ώθησαν πολλές επιστημονικές ομάδες να ερευνήσουν την παρουσία αυτών των πολυμορφισμών με στόχο την εύρεση πιθανών συσχετίσεων με την καρκινογένεση σε διάφορα όργανα με ιδιαίτερη έμφαση στους πνεύμονες.

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα παρουσιάζονται αντικρουόμενα καθώς μελετώντας δείγματα από μικτούς πληθυσμούς (Καυκάσιοι, Αφροαμερικάνοι, Ασιάτες) δημιουργείται σύγχυση ως προς την εύρεση μιας συσχέτισης με τον καρκίνο του πνεύμονα, γεγονός που απορρέει από τις διαφορετικές φυσιολογικές συχνότητες εμφάνισης των πολυμορφισμών των GSTs στους αμιγείς πληθυσμούς.

Για την Καυκάσια φυλή, ύστερα από μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Sorensen et.al.,(2004) φάνηκε ότι ο GSTT1-null πολυμορφισμός ήταν παρών στο 14,5% (37/254) των περιστατικών έναντι του 6% (16/265) για τα φυσιολογικά δείγματα ( $p<0.005$ ). Κατηγοριοποιώντας τα δείγματα σύμφωνα με την ηλικία εμφάνισης της νόσου και συγκεκριμένα για τις ηλικίες 50-55 ο GSTT1-null πολυμορφισμός ανιχνεύεται σε ένα ποσοστό 27% (10/37) γεγονός που δείχνει αυξημένη προδιάθεση για την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα και ιδιαίτερα για την ακανθοκυτταρική μορφή αυτού( $p<0.0001$ ). Στη συγκεκριμένη έρευνα δεν βρέθηκε καμία μεμονωμένη συσχέτιση όσον αφορά στους πολυμορφισμούς των ενζύμων GSTM1- null, GSTM3 with 3bp deletion, GSTP1-105 ή GSTP1-114. Επιπροσθέτως ερευνήθηκαν οι πολυμορφισμοί αυτοί και σε συνδυασμό και βρέθηκαν αυξημένες πιθανότητες εκδήλωσης καρκίνου του πνεύμονα ιδιαίτερα για την πρόωρη εμφάνιση της νόσου (<50 έτη) όταν συνυπάρχει άλλος ένας GST πολυμορφισμός μαζί με τον πολυμορφισμό GSTT1-null<sup>(36)</sup>.

Σε μια άλλη έρευνα που έγινε από τους A.S.Wenzlaff, et.al,(2005) που αφορούσε τόσο Αφροαμερικάμενους όσο και Καυκάσιους υπήρξε κάποια συσχέτιση μεταξύ του GSTT1- null πολυμορφισμού και του καρκίνου του πνεύμονα. Ενώ στον συνολικό πληθυσμό καυκάσιων δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση του πολυμορφισμού GSTT1-null με τον καρκίνο του πνεύμονα οι βαρείς καπνιστές φορείς του πολυμορφισμού GSTT1- null φάνηκε να κινδυνεύουν 3 φορές περισσότερο από τους φέροντες του φυσιολογικού γονιδίου. Για τους Αφροαμερικάνους από την άλλη δεν βρέθηκε κάποιος στατιστικά σημαντικός συσχετισμός για τους GSTM1 και GSTT1-null πολυμορφισμούς όταν αυτοί μελετήθηκαν μεμονωμένα. Απεναντίας, η ταυτόχρονη παρουσία των null πολυμορφισμών των GSTM1 και GSTT1 φάνηκε να αυξάνει κατά 3,8 φορές την πιθανότητα των Αφροαμερικάνων να αναπτύξουν καρκίνο του πνεύμονα <sup>(31)</sup>.

Στον αντίποδα τώρα βρίσκονται τα αποτελέσματα της ερευνητικής ομάδας των Joschim Schneider et.al,(2004) που έδειξαν μια οριακά σημαντική συσχέτιση των πολυμορφισμών GSTM1 –null και GSTT1-null μιας και οι πολυμορφισμοί αυτοί στην συγκεκριμένη έρευνα φάνηκε να μεταβάλλουν ελάχιστα την πιθανότητα κάποιου ατόμου να νοσήσει από καρκίνο του πνεύμονα <sup>(38)</sup>.

Το παραπάνω αποτέλεσμα έρχεται να ενισχύσει και μια μετανάλυση 130 μελετών από τους Zheng Ye et al, (2006) όπου συγκεντρωτικά παρουσιάζει τους πολυμορφισμούς GSTM1 –null και GSTT1-null να επηρεάζουν ελάχιστα την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα του φέροντος του πολυμορφισμού ατόμου<sup>(34)</sup>.

Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί ότι μελέτες έχουν γίνει και για άλλες μορφές καρκίνου σε όργανα όπως (λάρυγγας, οισοφάγος, ενδομήτριο, προστάτης, παχύ έντερο, ουροδόχος κύστη) χωρίς την εύρεση σημαντικών συσχετίσεων, των πολυμορφισμών των GSTs στην επαγωγή της καρκινογένεσης <sup>(39) (40) (41) (42) (43)</sup>.

## Σκοπός της εργασίας

Τα τελευταία δέκα χρόνια έχει γίνει μια σημαντική προσπάθεια για την διερεύνηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεια του καρκίνου αλλά και άλλων ασθενειών σε επίπεδο αλλαγών στο γονιδίωμα μας. Παρά ταύτα, ο καρκίνος παραμένει η δεύτερη πιο απειλητική νόσος για την ανθρωπότητα με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Έτσι λοιπόν η επικρατούσα τάση σήμερα δεν περιορίζεται μόνο στην εύρεση φαρμακευτικών στρατηγικών ίασης του καρκίνου, μα επεκτείνεται ακόμη παρά πέρα, στην εύρεση μοριακών και γενετικών δεικτών που θα βοηθήσουν στην πρόγνωση και έγκαιρη διάγνωση τού.

Από διάφορες μελέτες έχει προκύψει ότι ορισμένοι πολυμορφισμοί, όπως οι πολυμορφισμοί των *γονιδίων της οικογένειας του κυτοχρώματος P450 ή CYP* (CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6) και των *γονιδίων των S-τρανσφερασών της γλουταθειόνης* (GSTM1, GSTM3, GSTP1, GSTT1) συνδέονται με αυξημένη προδιάθεση του ατόμου για εμφάνιση καρκίνου.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση των πολυμορφισμών GSTM1-null και GSTT1-null των γονιδίων GSTM1 και GSTT1 αντίστοιχα σε δείγματα από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα καθώς και σε φυσιολογικά δείγματα. Η ανίχνευση των πολυμορφισμών αυτών έγινε με την μέθοδο της PCR. Επιπρόσθετα η εργασία αυτή αποτελεί μια προσπάθεια συσχέτισης των παραπάνω πολυμορφισμών και της εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα στον ελληνικό πληθυσμό.

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## Προέλευση δειγμάτων

Το βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα πειραματική εργασία συλλέχθηκε από την Πνευμονολογική Χειρουργική Κλινική του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης “Θεαγένειο” και την Θωρακική Καρδιοχειρουργική Κλινική του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου “ΑΧΕΠΑ”. Το βιολογικό υλικό προέρχεται από ασθενείς οι οποίοι έπασχαν από καρκίνο του πνεύμονα. Σε κάθε περίπτωση ασθενούς, κατά την προγραμματισμένη χειρουργική αφαίρεση του όγκου, λαμβάνονταν μικρή ποσότητα παθολογικού ιστού για επεξεργασία, ενώ το υπόλοιπο τμήμα του όγκου αποστέλλονταν στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου για τη συνήθη συμβατική ιστοπαθολογική εξέταση. Τα δείγματα προς επεξεργασία, αμέσως μετά την παραλαβή τους, τοποθετούνταν σε υγρό άζωτο και μεταφέρονταν στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του ΑΠΘ, όπου διατηρούνταν στους  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι την ανάλυσή τους.

Στην παρούσα πειραματική εργασία μελετήθηκαν 45 δείγματα ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και 29 δείγματα από φυσιολογικά άτομα, το γενετικό υλικό των οποίων χρησιμοποιήθηκε ως υλικό ελέγχου (μάρτυρας). Τα φυσιολογικά αυτά δείγματα προήλθαν από εθελοντές του εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας του τμήματος ΑΠΘ με αιμοληψία αλλά και από περιφερικό αίμα υγιών ατόμων που προήλθε από το τμήμα αιμοδοσίας του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου “ΑΧΕΠΑ”.

## Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών περιλαμβάνει:

- Ανακινούμενο υδατόλουτρο.
- Μηχανήματα φυγοκέντρωσης.
- Φασματοφωτόμετρο.
- Συσκευή PCR (θερμοκυκλοποιητής) .

- Αναδευτήρα Vortex.
- pH-μετρο.
- Φούρνο μικροκυμάτων.
- Συσκευή αποστείρωσης.
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης.
- Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

## Χημικά διαλύματα

Τα χημικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πειραματική εργασία καθώς και η ακριβής σύστασή τους δίνονται παρακάτω:

- Διάλυμα λύσης (Lysis buffer): 10mM Tris.Cl (pH 8.0)  
0.1M EDTA (pH 8.0)  
0.5% SDS  
(Φύλαξη στους 4 °C).
- Πρωτεΐνάση K Τελική επιθυμητή συγκέντρωση 100μg/ml
- Διάλυμα οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa) 2M, pH 4,0 (Φύλαξη στους 4°C)
- Διάλυμα χλωροφορμίου (Φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου (ΘΔ)).
- Αιθανόλη 100% και 70% (Φύλαξη στους -20°C).
- Διάλυμα 10 X TBE: 108 gr Tris base  
55 gr Βορικό οξύ  
40 ml 0,5M EDTA (pH 8.0)  
ddH<sub>2</sub>O  
(Φύλαξη σε ΘΔ).
- Διάλυμα φόρτωσης ηλεκτροφόρησης 0.25% Βρωμοφαινόλη  
(Loading Buffer): 0.25% Κυανό της ξυλόλης  
40% Γλυκερόλη  
dd H<sub>2</sub>O  
(Φύλαξη σε ΘΔ).

## Μέθοδοι μοριακής βιολογίας

Στις παραγράφους που ακολουθούν γίνεται μία σύντομη περιγραφή των βασικών μεθόδων μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πειραματική εργασία.

### Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

Απαραίτητη προϋπόθεση για την πραγματοποίηση οποιασδήποτε γενετικής ανάλυσης είναι η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA.

Η διάσπαση των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών αποτελεί το πρώτο στάδιο ενός πρωτοκόλλου απομόνωσης γενετικού υλικού και γίνεται για την απελευθέρωση και απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων. Η διάσπαση αυτή πραγματοποιείται συνήθως με χρήση ειδικών ρυθμιστικών διαλυμάτων (ρυθμιστικό διάλυμα λύσης για DNA), που περιέχουν ισχυρά απορρυπαντικά που καταστρέφουν την λιπιδιακή διπλοστιβάδα των μεμβρανών<sup>(44)</sup>.

### Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ιστούς

Η όλη διαδικασία απομόνωσης του γονιδιωματικού DNA περιλαμβάνει συνολικά 8 στάδια:

- 1) **Ομογενοποίηση του ιστού:** Στο στάδιο, αυτό ο ιστός κονιορτοποιείται σε αποστειρωμένα γουδιά παρουσία υγρού αζώτου. Μετά την κονιορτοποίησή του ιστού, το δείγμα (20 mg ιστού) κάθε ασθενή τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf και διατηρούνταν στους  $-70^{\circ}\text{C}$  μέχρι να χρησιμοποιηθεί για απομόνωση γονιδιωματικού DNA.
- 2) **Λύση κυτταρικών μεμβρανών:** Η λύση των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών πραγματοποιείται με προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης κυττάρων (lysis buffer) για κάθε 20 mg κονιορτοποιημένου ιστού. Στη συνέχεια προστίθενται 15 μl πρωτεΐνάσης K (20mg/ml) για την πρωτεόλυση των ιστονών του DNA. Ακολουθούσε επώαση των δειγμάτων στους  $55^{\circ}\text{C}$  για 3 ώρες.

- 3) **Απομάκρυνση πρωτεϊνών:** Οι πρωτεΐνες του κυττάρου απομακρύνονται με εκχύλιση με προσθήκη σε κάθε δείγμα ίσου όγκου (500 μl) ουδέτερης φαινόλης (pH 8.0) εξισορροπημένης με 0.1 M Tris.HCl. Τα δείγματα στη συνέχεια αναδεύονται ήπια στο ρότορα για 5 λεπτά, και ακολούθως φυγοκεντρώνονται σε 12500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4 °C.
- 4) **Ολοκληρωτική απομάκρυνση πρωτεϊνών:** Από τις δύο διακριτές φάσεις που σχηματίζονται μετά τη φυγοκέντρωση λαμβάνεται η υπερκείμενη (υδατική) φάση και τοποθετείται σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf (100-1000 μl). Για την ολοκληρωτική απομάκρυνση των πρωτεϊνών προστίθεται 250 μl ουδέτερης φαινόλης (pH 8.0) εξισορροπημένης με 1M Tris.HCl (pH 8), και 250 μl διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) σε κάθε δείγμα το οποίο ακολούθως αναδεύουμε ήπια. Το δείγμα φυγοκέντρηται στις 12500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4 °C.
- 5) **Απομάκρυνση φαινόλης:** Μετά την φυγοκέντρωση λαμβάνουμε την υπερκείμενη (υδατική) φάση και τη μεταφέρουμε σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf (100-1000 μl). Για την απομάκρυνση της φαινόλης από τα δείγματα προσθέτουμε 500 μl διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) σε κάθε δείγμα. Τα δείγματα στη συνέχεια αφού αναδευτούν ήπια στο ρότορα για 5 λεπτά φυγοκεντρώνονται στις 12500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4 °C.
- 6) **Απομάκρυνση υπολειμμάτων φαινόλης:** Επανάληψη του 5<sup>ου</sup> σταδίου ώστε να απομακρυνθεί εντελώς η φαινόλη.
- 7) **Κατακρήμνιση DNA:** Μετά τη φυγοκέντρωση λαμβάνουμε την υπερκείμενη φάση και την μεταφέρουμε σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf (100-1000 μl). Ακολούθως προσθέτουμε ποσότητα διπλάσιου όγκου (1000μl) παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (100%) σε κάθε δείγμα με σκοπό την αφυδάτωση και κατακρήμνιση του DNA. Τα δείγματα στη συνέχεια αφού αναδευτούν ήπια στο ρότορα για 5 λεπτά φυγοκεντρώνονται στις 6000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4 °C. Στο τέλος της φυγοκέντρωσης το DNA έχει κατακρημνιστεί και πλέον σχηματίζει ένα λευκό ίζημα στον πάτο των σωληνάρων. Μετά την προσεκτική απόχυση της αιθανόλης ξεπλένουμε το DNA με 500 μl αιθανόλης 70%, με ήπια ανάδευση στο ρότορα για 5 λεπτά. Τελικά αποχύνουμε και την τελευταία ποσότητα αιθανόλης που προσθέσαμε και στεγνώνουμε το ίζημα του DNA στον αέρα.

δ) **Διαλυτοποίηση και διατήρηση δειγμάτων DNA:** μετά την ολοκληρωτική εξάτμιση της αιθανόλης, τα προκύπτοντα δείγματα DNA διαλύονταν σε 50-150 μl διαλύματος συντήρησης (TE), ανάλογα με την ποσότητα DNA του κάθε δείγματος. Τα δείγματα στη συνέχεια διατηρούνταν στους 4 °C για 24 ώρες, έτσι ώστε να επιτευχθεί η πλήρης διαλυτοποίηση τους στο TE, και στη συνέχεια φυλάσσονταν στους -20 °C μέχρι τη χρήση τους.

## **Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αίμα**

Στην παρούσα πειραματική εργασία το πρωτόκολλο απομόνωσης γενετικού υλικού (DNA) από αίμα χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των δειγμάτων-μαρτύρων. Τα δείγματα που επιλέχθηκαν για το σκοπό αυτό προέρχονταν από υγιή άτομα με εθελοντική αιμοδοσία. Το γονιδιωματικό DNA από το αίμα των ατόμων αυτών απομονώθηκε σύμφωνα με τα ακόλουθα στάδια :

- **Λήψη δειγμάτων:** Συνολικά από τον κάθε εθελοντή λήφθηκαν 6 ml αίματος, το οποίο αμέσως διοχετεύθηκε σε σωληνάρια ‘Γενικής Εξέτασης Αίματος’ των 6 ml. Τα σωληνάρια αυτά ήταν ήδη εφοδιασμένα με αντιπηκτικό διάλυμα αίματος EDTA. Αμέσως μετά την αιμοληψία, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 4500 rpm για 30 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4 °C.
- **Απομόνωση στοιβάδας λευκών αιμοσφαιρίων:** Μετά την παραπάνω φυγοκέντρηση, το κάθε δείγμα αίματος παρουσίασε τρεις διακριτές φάσεις: την υπερκείμενη φάση (πλάσμα αίματος), την ενδιάμεση φάση (λευκά αιμοσφαίρια) και την ιζηματική φάση (ερυθρά αιμοσφαίρια). Για τη λήψη των λευκών αιμοσφαιρίων, αρχικά απομακρύνθηκε το πλάσμα από όλα τα δείγματα με πλαστική πιπέτα Pasteur. Ακολούθως, με τη χρήση πλαστικής πιπέτας Pasteur, απομονώθηκε προσεκτικά η στοιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων και διοχετεύθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf.
- **Απομάκρυνση ερυθρών αιμοσφαιρίων:** Για την απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων που λήφθηκαν αναπόφευκτα κατά την αναρρόφηση της στιβάδας των λευκών από τα δείγματα, προστέθηκαν 6 ml αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O σε κάθε δείγμα. Ακολούθησε μαλακή ανακίνηση με πλαστική πιπέτα Pasteur για 5 λεπτά



μέχρι την πλήρη διάλυση του ιζήματος, και φυγοκέντρηση σε 2500 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4 °C.

- **Καθαρισμός λευκών αιμοσφαιρίων:** Μετά την παραπάνω φυγοκέντρηση, σε κάθε δείγμα εντοπίστηκαν δύο διακριτές φάσεις, εκ των οποίων η υδατική φάση (υπερκείμενη) απομακρύνθηκε με πλαστική πιπέτα Pasteur. Τα λευκά αιμοσφαίρια υπό μορφή ιζήματος στον πάτο των σωληναρίων καθαρίστηκαν στη συνέχεια με την προσθήκη 6 ml Nonidet P40 % σε κάθε δείγμα. Ακολούθησε μαλακή ανακίνηση με πλαστική πιπέτα Pasteur για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 2500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4 °C.
- **Λύση κυτταρικών μεμβρανών και πρωτεόλυση ιστονών:** Έπειτα από την παραπάνω φυγοκέντρηση η υδατική φάση (υπερκείμενη) απομακρύνθηκε με πλαστική πιπέτα Pasteur. Τα καθαρά πλέον λευκά αιμοσφαίρια υπό μορφή ιζήματος στις βάσεις των σωληναρίων υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε λύση των κυτταρικών μεμβρανών και πρωτεόλυση των ιστονών. Η διάσπαση των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών των λευκών αιμοσφαιρίων επιτεύχθηκε με προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης κυττάρων (lysis buffer). Ακολούθησε μαλακή ανακίνηση με πλαστική πιπέτα Pasteur μέχρι την πλήρη διάσπαση του ιζήματος. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 20 μl πρωτεΐνάσης K (10 mg/ml) με στόχο την πρωτεόλυση των ιστονών που συμμετέχουν δομικά στην οργάνωση του DNA στα χρωμοσώματα. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους 55 °C για 3 ώρες ή στους 37 °C για τουλάχιστον 18 ώρες σε ανακινούμενο υδατόλουτρο.

Τα επόμενα στάδια της πειραματικής εργασίας που περιλαμβάνουν απομάκρυνση των πρωτεϊνών και της φαινόλης, καθώς και κατακρήμνιση και διαλυτοποίηση των δειγμάτων DNA (Βλ. πρωτόκολλο απομόνωσης DNA από ιστούς).

## **PCR: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης**

Πρόκειται για μία μέθοδο που δίνει τη δυνατότητα μεγέθυνσης ενός επιλεγμένου τμήματος DNA (πχ. γονίδιο), με τη βοήθεια μιας DNA πολυμεράσης. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται συνήθως σε αντιδράσεις PCR είναι αυτό της DNA πολυμεράσης I από το βακτήριο *Thermus Aquaticus*. Το βακτήριο αυτό ζει σε θερμό περιβάλλον και επομένως πολλά από τα ένζυμα του (συμπεριλαμβανομένης και της Taq

πολυμεράσης) είναι θερμο-ανθεκτικά, στοιχείο απαραίτητο για τις θερμικές επώσεις των PCR αντιδράσεων <sup>(45)</sup>.

Κάθε αντίδραση PCR (κύκλος PCR) περιλαμβάνει 3 στάδια <sup>(46)</sup>:

- **Μετουσίωση DNA:** Στόχος του σταδίου αυτού είναι η πλήρης αποδιάταξη του δίκλωνου DNA και μετατροπή του σε μονόκλωνη μορφή. Οι απαιτούμενες θερμοκρασίες είναι (94-95 °C).
- **Υβριδισμός εκκινητών:** Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες που καθορίζονται από το T<sub>m</sub> (melting temperature) των εκκινητών που χρησιμοποιούνται σε κάθε πείραμα. Ανάλογα με τη νουκλεοτιδική τους σύσταση, οι εκκινητές αναγνωρίζουν και συνδέονται σε συγκεκριμένες θέσεις των αποδιαταγμένων DNA κλώνων.
- **Επιμήκυνση:** Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει την επιμήκυνση των νεο-συντιθέμενων αλυσίδων DNA. Με τη δράση της DNA πολυμεράσης, προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3'-άκρο κάθε αφετηρίας, και αυτή επιμηκώνεται, με αποτέλεσμα τη σύνθεση νέων κλώνων DNA, συμπληρωματικών προς αυτούς του αρχικού DNA μορίου. Η θερμοκρασία του σταδίου αυτού ρυθμίζεται ανάλογα με την βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας της πολυμεράσης που συνήθως είναι 70-75°C.

Ο κύκλος Μετουσίωση-Υβριδισμός-Επιμήκυνση μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές (συνήθως 30-40), με αποτέλεσμα τη σύνθεση πολλών εκατομμυρίων αντιγράφων του τμήματος DNA που επιλέχθηκε για μεγέθυνση.

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιούνται μέσα σε ειδικά αυτοματοποιημένες εργαστηριακές συσκευές που ονομάζονται «θερμικοί κυκλοποιητές» (Thermocyclers), ενώ τα τελικά τους προϊόντα ανιχνεύονται στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

## Ποσοτικοποίηση δειγμάτων DNA

Μετά τη διαλυτοποίηση του γονιδιωματικού DNA σε διάλυμα συντήρησης TE (pH 7.5) (TrisHCl, EDTA), ακολούθησε φασματοφωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός των δειγμάτων. Αρχικά πραγματοποιούνταν μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου με ddH<sub>2</sub>O και στη συνέχεια ακολουθούσε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των δειγμάτων DNA. Το DNA ήταν αραιωμένο σε ddH<sub>2</sub>O. Συνήθως χρειαζόταν 3 μl DNA σε 997 μl ddH<sub>2</sub>O, αλλά πολλές φορές αυτή η αναλογία άλλαζε ανάλογα με το διαθέσιμο γενετικό υλικό.

Η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μετρούνταν σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm, ενώ ο λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> καταγράφονταν για το προσδιορισμό της καθαρότητας των δειγμάτων. Από την οπτική πυκνότητα στα 260 nm υπολογίζονταν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων DNA σύμφωνα με το τύπο: 1 OD= 50 μg/ml. Στη συνέχεια, με βάση τις καταγεγραμμένες τιμές του λόγου OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> του φασματοφωτομέτρου, προσδιορίζονταν η καθαρότητα του κάθε δείγματος. Σε περιπτώσεις δειγμάτων όπου ο λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ήταν μεγαλύτερος ή ίσος με 1,8, τα δείγματα θεωρούνταν ικανοποιητικής καθαρότητας<sup>(44)</sup>.

## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στο σημείο αυτό θα γίνει περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας που εφαρμόστηκε για τη μελέτη των πολυμορφισμών των γονιδίων GSTM1 και GSTT1 σε δείγματα από καρκίνο του πνεύμονα καθώς και σε φυσιολογικά δείγματα .

Τα στάδια που ακολουθήθηκαν αναφορικά είναι τα εξής:

- Απομόνωση DNA από ιστούς και αίμα
- Ποσοτικός προσδιορισμός δειγμάτων με χρήση φασματοφωτομέτρου ορατού-υπεριώδους φωτός .
- Αντιδράσεις ενίσχυσης PCR των γονιδίων GSTM1 , GSTT1 και β-σφαιρίνης (γονίδιο αναφοράς).
- Έλεγχος των προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη.
- Ανάλυση των προϊόντων PCR με το πρόγραμμα One-D scan (1-D gel analysis software for windows) της εταιρείας ScanAnalytics.

### Αντιδράσεις ενίσχυσης PCR

Το DNA των γονιδίων GSTM1, GSTT1 και β-σφαιρίνης (γονίδιο αναφοράς) ενισχύθηκαν με αντιδράσεις PCR. Τα ζεύγη των εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε μία αντίδραση PCR φαίνονται στον Πίν. 2 <sup>(47)</sup> <sup>(48)</sup>.

Πίνακας 2 Αλληλουχίες νουκλεοτιδίων των εκκινητών και μεγέθη των PCR προϊόντων

Γονίδιο στόχος	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων των εκκινητών	Μέγεθος PCR προϊόντος (bp)
GSTM1	Forward:5'-CTG CCC TAC TTG ATT GAT GGG -3' Reverse:5'-CTG GAT TGT AGC AGA TCA TGC GC-3'	271
GSTT1	Forward::5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3' Reverse:5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA -3'	470
β-σφαιρίνη	Forward::5'-GGT TGG CCA ATC TACT CC CAG G -3' Reverse: 5'-GCT CAC TCA GTG TGG CAA AG -3'	536

Για την ενίσχυση των γονιδίων **GSTM1**, **GSTT1** και **β-σφαιρίνης** χρησιμοποιήθηκαν 200-400 ng γονιδιωματικού DNA. Το μίγμα της κάθε PCR αντίδρασης, σε τελικό όγκο 50 μl, είχε την παρακάτω σύσταση:

- 10X ρυθμιστικό διάλυμα PCR: 5 μl
- 100 mM MgCl<sub>2</sub>: 1 μl (2mM στα 50μl)
- 25 mM dNTPs: 0,4 μl
- F primer (100 pmol/μl): 0.25 μl
- R primer (100 pmol/μl): 0.25 μl
- Ταq πολυμεράση (5U/μl): 0,3 μl
- dd H<sub>2</sub>O: 38,05 μl για τελικό όγκο 45μl χωρίς το DNA.
- DNA: Ανάλογα με την περιεκτικότητα του κάθε δείγματος και προσαρμοσμένο έτσι ώστε σε κάθε αντίδραση να υπάρχει 200-400ng DNA.

Οι συνθήκες αντίδρασης PCR που εφαρμόστηκαν για τη μεγέθυνση του κάθε γονιδίου ήταν οι εξής:

Για τα γονίδια **GSTM1** και **β-σφαιρίνης**

1. Αρχική αποδιάταξη (Denaturation): 95 °C για 5 min
2. Αποδιάταξη (Denaturation): 95 °C για 1 min
3. Σύνδεση εκκινητών (Annealing): 57 °C για 1 min
4. Σύνθεση νέου DNA (Extension): 72 °C για 1 min
5. Επανάληψη των σταδίων 2, 3 και 4 για 35 φορές (κύκλους)
6. Τελική σύνθεση (final extension): 72 °C για 10 min

Για το γονίδιο **GSTT1**

1. Αρχική αποδιάταξη (Denaturation): 95°C για 5 min
2. Αποδιάταξη (Denaturation): 95 °C για 1 min
3. Σύνδεση εκκινητών (Annealing): 57 °C για 45sec
4. Σύνθεση νέου DNA (Extension): 72 °C για 1min
5. Επανάληψη των σταδίων 2, 3 και 4 για 38 κύκλους
6. Τελική σύνθεση (final extension): 72 °C για 10 min

Ο έλεγχος των PCR προϊόντων των παραπάνω αντιδράσεων έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης.

## Έλεγχος των προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ανίχνευση των PCR προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρηση, σε πηκτή αγαρόζης (2% με 1X TBE) σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (με ~75 V τάση, ~90 mA ένταση ρεύματος). Από κάθε δείγμα «φορτωνόταν» 10-12 μl προϊόντος + 4 μl διάλυμα φόρτωσης, ενώ μαζί με τα δείγματα γινόταν ηλεκτροφόρηση και 5 μl ενός δείκτη μοριακών βαρών (100 bp DNA Ladder), για τον προσδιορισμό του μεγέθους των PCR προϊόντων. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης ήταν περίπου 30 min.

Στη συνέχεια, η ανάγνωση και φωτογράφιση της πηκτής αγαρόζης πραγματοποιήθηκε σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (2UVTM Transilluminator), με τη βοήθεια της χρωστικής, βρωμιούχο αιθίδιο, που είχε προστεθεί στην πηκτή αγαρόζης.

### Στατιστική επεξεργασία

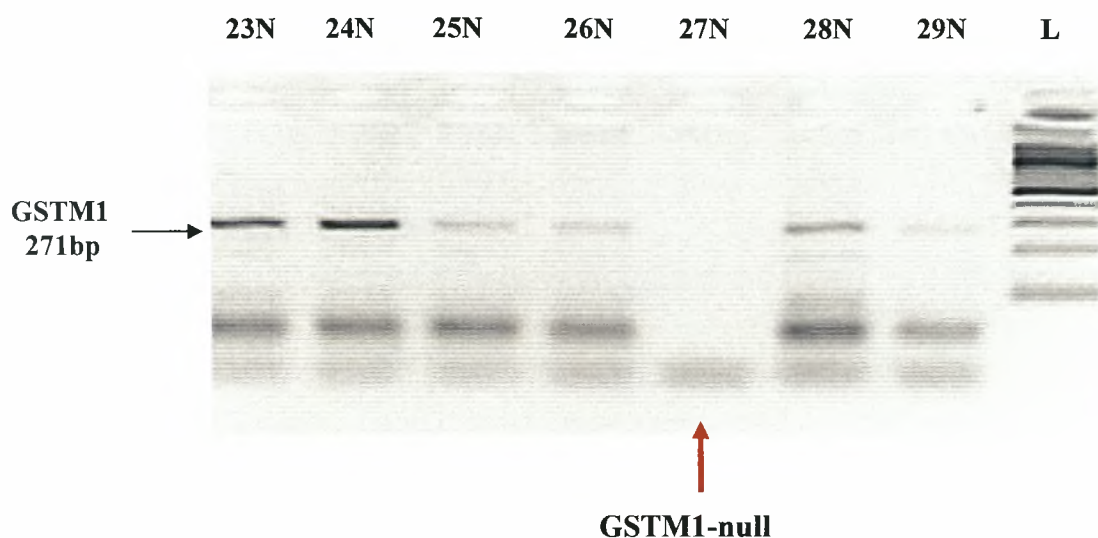
Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτής της έρευνας χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία  $\chi^2$ .

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μελέτη της ύπαρξης των πολυμορφισμών GSTM1-null και GSTT1-null σε επίπεδο DNA πραγματοποιήθηκε σε 45 δείγματα με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (NSCLC) και σε 29 φυσιολογικά δείγματα (μάρτυρες), με την μέθοδο της PCR. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρατίθενται συγκεντρωτικά στον Πίν. 3 και Πίν. 4 αντίστοιχα.

Με τη βοήθεια της παραπάνω τεχνικής ενισχύθηκαν τα γονίδια GSTM1 και GSTT1 και προσδιορίστηκαν οι πολυμορφισμοί GSTM1-null και GSTT1-null έμμεσα. Η ύπαρξη εμφανών τμημάτων DNA στο πήκτωμα αγαρόζης, μεγέθους 271kb και 470kb αντίστοιχα για τα δυο γονίδια υποδήλωνε την παρουσία τους στο γενετικό υλικό των δειγμάτων, ενώ αντίθετα η απουσία ζώνης σε κάποιο από τα δυο ή και στα δύο μαζί μαρτυρούσε την απουσία των πολυμορφισμών τους GSTM1-null και GSTT1-null. Επιπρόσθετα και για να αποκλειστεί η πιθανότητα πειραματικού σφάλματος (π.χ έλλειψη ή κακής ποιότητας DNA) πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά PCR για τα δείγματα που δεν παρουσίασαν τις αναμενόμενες ζώνες αυτή τη φορά με σκοπό την ενίσχυση ενός γονιδίου εσωτερικού μάρτυρα (β-σφαιρίνη).

Αντιπροσωπευτικά δείγματα της ανάλυσης των πολυμορφισμών GSTM1-null και GSTT1-null με την μεθοδολογία της PCR παρουσιάζονται παρακάτω (Εικ. 10) (Εικ. 11). Αναλύοντας τις εικόνες 10 και 11 παρατηρούμε ότι η ένταση των ζωνών διαφέρει αισθητά. Η διαφορά αυτή στην φωτεινότητα αντικατοπτρίζει τον αριθμό αντιγράφων των γονιδίων GSTM1 και GSTT1 στα δείγματα και άρα φανερώνει τον ομόζυγο η ετερόζυγο χαρακτήρα των ατόμων των οποίων το DNA εξετάστηκε. Στην παρούσα εργασία δείγματα με γονότυπο GSTM1/GSTM1, GSTM1/GSTM1-null και GSTT1/GSTT, GSTT/GSTT1-null χαρακτηρίστηκαν αρνητικά για την ύπαρξη των πολυμορφισμών GSTM1-null και GSTT1-null, ενώ θετικά χαρακτηρίστηκαν μόνο όσα είχαν τους παραπάνω πολυμορφισμούς σε ομοζυγωτία GSTM1-null/ GSTM1-null και GSTT1-null/ GSTT1-null

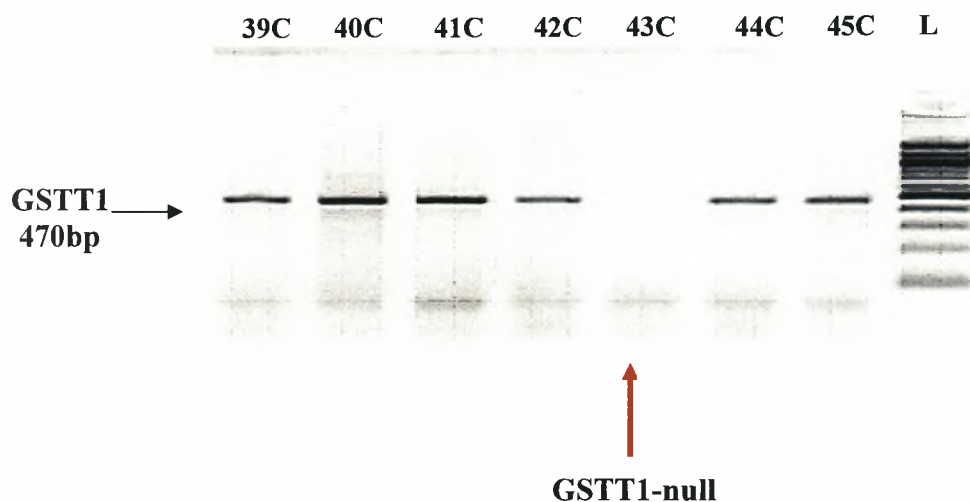


**Εικόνα 10:** Αντιπροσωπευτική εικόνα ηλεκτροφόρησης PCR προϊόντων από δείγματα υγιών ατόμων έπειτα από ενίσχυση του γονιδίου GSTM1. N (normal), L(ladder 100bp).

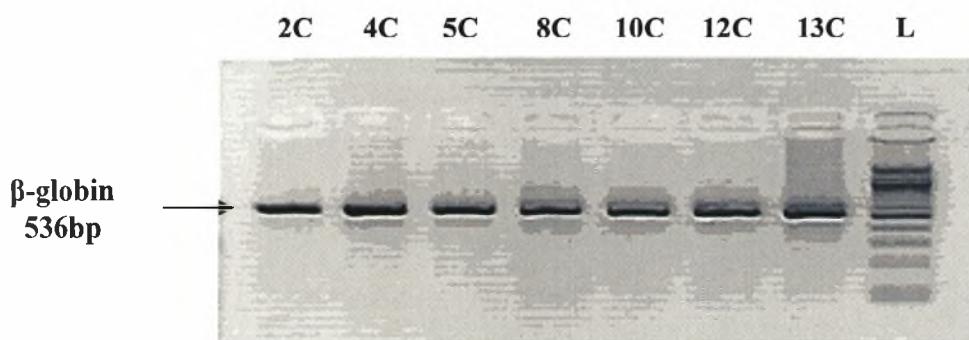
Η ανίχνευση του πολυμορφισμού GSTM1-null γίνεται έμμεσα μιας και ο πολυμορφισμός αυτός έχει προκύψει από διαγραφή του γονιδίου. Έτσι η ύπαρξη του πολυμορφισμού GSTM1-null ταυτόχρονα σημαίνει και απουσία του γονιδίου GSTM1 , μηδενική ενίσχυση (PCR) και άρα απουσία ζώνωσης στο πήκτωμα αγαρόζης. Με την ίδια στρατηγική ανιχνεύεται και ο πολυμορφισμός GSTT1-null .

Τέλος για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη των null πολυμορφισμών και να εξαλειφθεί η παράμετρος του πειραματικού σφάλματος πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά PCR για τα δείγματα που δεν παρουσίασαν τις αναμενόμενες ζωνώσεις αυτή τη φορά με σκοπό την ενίσχυση ενός γονιδίου μάρτυρα (β-σφαιρίνη).Αντιπροσωπευτικά δείγματα παρατίθενται παρακάτω (**Εικ. 12**)





**Εικόνα 11:** Χαρακτηριστική εικόνα ηλεκτροφόρησης PCR προϊόντων δειγμάτων ατόμων με καρκίνο του πνεύμονα έπειτα από ενίσχυση του γονιδίου GSTT1 με την μέθοδο της PCR .C (cancer), L (ladder 100bp).



**Εικόνα 12:** Χαρακτηριστική εικόνα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων που φέρουν τους πολυμορφισμούς GSTM1-null, GSTT1-null έπειτα από ενίσχυση του γονιδίου της β-σφαιρίνης με την μέθοδο PCR. C (cancer), L (ladder 100bp).

**Πίνακας 3:** Συγκεντρωτική παρουσίαση αποτελεσμάτων ανάλυσης 45 καρκινικών δειγμάτων για τους πολυμορφισμούς GSTM1-null και GSTT1-null

Δείγματα ασθενών από καρκίνο πνεύμονα					Πολυμορφισμοί GSTM1		Πολυμορφισμοί GSTT1	
Αρ. δείγματος	Κάπνισμα (packs per year)	Φύλο	Ηλικία	Τυπος καρκίνου	GSTM1 normal	GSTM1 null	GSTT1 normal	GSTT1 null
1C	-	M	58	Squamous GII	+		+	
2C	-	F	58	Adeno		+	+	
3C	>100	M	71	Adeno	+		+	
4C	40	M	66	Adeno		+	+	
5C	55	M	75	Squamous GIII		+		+
6C	100	M	70	Adeno		+	+	
7C	80	M	59	NSCLC	+		+	
8C	-	M	63	Adeno		+		+
9C	80	M	57	Squamous GII	+		+	
10C	-	M	68	Adeno		+		+
11C	80	M	70	Adeno GII	+		+	
12C	-	M	56	Adeno		+	+	
13C	25	M	45	NSCLC GII	+			+
14C	50	M	65	Adeno		+		+
15C	-	M	67	Adeno GIII		+		+
16C	-	F	63	Adeno GII		+	+	
17C	40	F	60	Squamous GII	+			+
18C	-	M	54	Adeno GII	+			+
19C	100	M	54	Adeno		+		+
20C	-	M	67	Adeno		+		+
21C	-	M	52	SCLC	+			+
22C	-	M	26	Lymphoblastic Lymph.		+		+
23C	120	M	69	Adeno GII	+		+	
24C	40	M	64	Squamous GII	+		+	
25C	35	M	69	Squamous GIII	+		+	
26C	-	M		Squamous GII	+		+	
27C	60	M	73	Adeno GIII		+	+	
28C	-	M	50	Squamous GIII	+		+	
29C	-	F		Sarcoma		+	+	
30C	-	M	61	Adeno GIII	+		+	
31C	-					+	+	
32C	60	M	69	Squamous GIII.anthrakosis		+		+
33C	-	F	41	Ca thyroid+mediastrium		+	+	
34C	-	M	-	-		+	+	
35C	-	M	-	-		+	+	
36C	-	F	-	-		+	+	
37C	-	M	-	-	+		+	
38C	-		-	-		+	+	
39C	-	M	50	Squamous II		+	+	
40C	-	M	-	Adeno III		+	+	
41C	-	M	70	Adeno III	+		+	
42C	-	M	61	Squamous III		+	+	
43C	-	M	66	Squamous II	+			+
44C	-	M	64	Adeno II	+		+	
45C	-	M		Adeno II-III	+		+	

Αναλύοντας τα δείγματα του πίνακα 3 παρατηρούμε ότι από τα 45 άτομα με καρκίνο του πνεύμονα 25 παρουσιάζουν το πολυμορφισμό GSTM1- null (56%) , ενώ 13 άτομα φέρουν τον πολυμορφισμό GSTT1- null (29%).

**Πίνακας 4:** Συγκεντρωτική παρουσίαση αποτελεσμάτων ανάλυσης 29 φυσιολογικών δειγμάτων για τους πολυμορφισμούς GSTM1-null και GSTT1-null

Δείγματα υγιών ατόμων	Πολυμορφισμοί GSTM1		Πολυμορφισμοί GSTT1	
	GSTM1 normal	GSTM1 null	GSTT1 normal	GSTT1 null
1N		+	+	
2N		+	+	
3N	+			+
4N	+			+
5N		+	+	
6N	+			+
7N	+		+	
8N	+			+
9N	+		+	
10N	+		+	
11N		+		+
12N	+			+
13N		+	+	
14N	+		+	
15N		+	+	
16N		+	+	
17N	+		+	
18N	+			+
19N	+			+
20N		+	+	
21N	+		+	
22N	+		+	
23N	+		+	
24N	+		+	
25N	+		+	
26N	+		+	
27N		+		+
28N	+		+	
29N	+			+

Αναλύοντας τα δείγματα του Πίν. 4 παρατηρούμε ότι από τα 29 φυσιολογικά άτομα 9 παρουσιάζουν το πολυμορφισμό GSTM1- null (31%) , ενώ 10 άτομα φέρουν τον πολυμορφισμό GSTT1- null (34%).

Μελετώντας συγκριτικά τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τους Πίν. 3 και 4 παρατηρούμε ότι ο GSTM1-null πολυμορφισμός εμφανίζεται στα 25/45 (56%) δείγματα των πασχόντων από καρκίνο του πνεύμονα, σε αντίθεση με τα 9/29 (31%) δείγματα των φυσιολογικών ατόμων. Ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτών για τον πολυμορφισμό αυτό με χρήση του κριτηρίου  $\chi^2$  κατέδειξε ότι η διαφορά αυτή που παρατηρείται μεταξύ καρκινοπαθών και φυσιολογικών ατόμων είναι στατιστικά σημαντική ( $0,02 < p < 0,05$ ).

Όσον αφορά στον πολυμορφισμό GSTT1-null βρέθηκε σε 13/45 δείγματα ατόμων με καρκίνο του πνεύμονα (29%) και σε 10/29 των φυσιολογικών ατόμων (34 %). Ανάλυση των αποτελεσμάτων για αυτόν τον πολυμορφισμό με χρήση του κριτηρίου  $\chi^2$  έδειξε ότι η διαφορά αυτή που παρατηρείται μεταξύ καρκινοπαθών και φυσιολογικών ατόμων δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Ομαδοποιώντας τα δείγματα ανάλογα με την ηλικία εμφάνισης του καρκίνου σε δύο ομάδες (**ομάδα 1** : ασθενείς με ηλικία <60 ετών και **ομάδα 2**: ασθενείς με ηλικία ≥60 ετών) βρέθηκε ότι οι πολυμορφισμοί GSTM1-null και GSTT1-null είναι παρόντες σε ποσοστά 41% και 41% αντίστοιχα για την ομάδα 1, και για την ομάδα 2 σε ποσοστά 50% και 41% αντίστοιχα. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτής της κατηγοριοποίησης με την μέθοδο του  $\chi^2$  δεν δίνει στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ούτε για τον GSTM1-null πολυμορφισμό, αλλά ούτε και για τον GSTT1-null.

Αλλάζοντας τα κριτήρια ομαδοποίησης και επιλέγοντας ως κριτήριο διαχωρισμού τον ιστολογικό τύπο καρκίνου τα δείγματα ταξινομήθηκαν εκ νέου σε δύο ομάδες (**ομάδα 3**: ασθενείς με **αδενοκαρκίνωμα** και **ομάδα 4**: ασθενείς με **ακανθοκυτταρικό ή πλακώδες καρκίνωμα**). Οι πολυμορφισμοί GSTM1-null και GSTT1-null βρέθηκε να είναι παρόντες σε ποσοστά 39% και 21% αντίστοιχα για την ομάδα 3, και για την ομάδα 4 σε ποσοστά 33% και 33% αντίστοιχα. Και σε αυτήν την περίπτωση, η επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν δίνει στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ούτε για τον GSTM1-null πολυμορφισμό, αλλά ούτε και για τον GSTT1-null. Ωστόσο θα πρέπει να τονισθεί μια τάση απουσίας του πολυμορφισμού GSTM1-null στα αδενοκαρκινώματα. ( $p=0,1\%$ ).

Τέλος η μελέτη της συχνότητας εμφάνισης των πολυμορφισμών GSTM1-null και GSTT1-null σε καρκίνους του πνεύμονα συγκριτικά με τις συνήθειες καπνίσματος των ασθενών δεν ήταν εφικτή λόγω της έλλειψης στοιχείων για ένα σημαντικό μέρος των δειγμάτων.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολλές επιστημονικές ομάδες έχουν ασχοληθεί με τη μελέτη των πολυμορφισμών των γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα, τα οποία συμμετέχουν στην αποτοξίνωση του οργανισμού, στα πλαίσια της εύρεσης του βαθμού κατά τον οποίο το γενετικό υπόβαθρο ενός ατόμου μπορεί να συνδράμει στην καρκινογένεση. Τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών υποστηρίζουν ότι πολυμορφισμοί στα γονίδια ενζύμων, όπως οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης, μπορούν να αυξήσουν τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα και δη όταν συνυπάρχουν με άλλους παράγοντες, όπως το κάπνισμα.<sup>(31)</sup>

Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκαν 45 δείγματα ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και 29 δείγματα φυσιολογικών ατόμων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η εργασία αυτή αποτελεί μια από τις πρώτες προσπάθειες χαρτογράφησης των συχνοτήτων των πολυμορφισμών GSTM1-null και GSTT1-null και των πιθανών επιπτώσεών τους στον ελληνικό πληθυσμό.

Τα αποτελέσματα της υποδεικνύουν την εμφάνιση του πολυμορφισμού GSTM1-null σε ένα μεγάλο ποσοστό των περιστατικών καρκίνου που εξετάστηκαν (56%) σε σχέση με την συχνότητα εμφάνισης του στα φυσιολογικά άτομα (31%).

Πρέπει να αναφερθεί ότι από τα στοιχεία της έρευνας μας φαίνεται ότι, η συχνότητα της εμφάνισης του πολυμορφισμού GSTM1-null υποαντιπροσωπείται στον ελληνικό πληθυσμό (εμφανίζεται στο 31% του πληθυσμού). Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε μικρή διαφωνία με τα ποσοστά που έχουν βρεθεί από παρόμοιες μελέτες για την καυκάσια φυλή (40-50% του πληθυσμού)<sup>(34)</sup>. Η μικρότερη αυτή συχνότητα εμφάνισης του null πολυμορφισμού του γονιδίου GSTM1 στον ελληνικό πληθυσμό θα μπορούσε να αποτελεί ένα πλεονέκτημα και σε συνδυασμό με την μεσογειακή διατροφή ίσως να σχετίζεται με τα μειωμένα περιστατικά καρκίνου του πνεύμονα στην χώρα μας σε σχέση με άλλες Ευρωπαϊκές χώρες(Εικ. 1).

Όσον αφορά τον GSTT1-null πολυμορφισμό βρέθηκε να είναι παρών στο 29% των περιστατικών καρκίνου που εξετάστηκαν ενώ παρόμοια συχνότητα εμφάνισης παρουσίασε και στον φυσιολογικό πληθυσμό (34%). Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε πως η παρουσία του GSTT1-null ως μεμονωμένου πολυμορφισμού δεν αυξάνει τις πιθανότητες του φέροντος του πολυμορφισμού ατόμου να νοσήσει από καρκίνο του πνεύμονα, αποτέλεσμα που βρίσκεται σε συμφωνία με τη μελέτη των Joaschim Shneider et al,(2004)<sup>(38)</sup>.

Στην παρούσα εργασία δεν καταφέραμε να μελετήσουμε τη συσχέτιση της συνύπαρξης και των δυο πολυμορφισμών με την καρκινογένεση λόγω του περιορισμένου αριθμού δειγμάτων που μελετήθηκαν και κατά συνέπεια εξαιτίας του μικρού αριθμού ατόμων που βρέθηκαν να παρουσιάζουν ταυτόχρονα τους GSTM1-null και GSTT1-null πολυμορφισμούς. Παρ'όλα αυτά η μελέτη όμως της συνύπαρξης του GSTT1-null πολυμορφισμού με ένα πολυμορφισμό στο GSTM1 ή στο GSTP1 γονίδιο φαίνεται να αυξάνει το ρίσκο εμφάνισης της νόσου σύμφωνα με τους Sorensen et al,(2004)<sup>(36)</sup>. Η μελέτη περισσότερων δειγμάτων θα συνέβαλε ουσιαστικά στην διευκρίνιση αυτού του γεγονότος.

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι αρκετές έρευνες κάνουν λόγο για αυξημένη συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών GSTM1-null και GSTT1-null σε μορφές καρκίνου του πνεύμονα όπως είναι το ακανθοκυτταρικό ή πλακώδες καρκίνωμα <sup>(37)</sup> <sup>(31)</sup>. Παρά ταύτα από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτής της εργασίας δεν προκύπτει κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί μια τάση συσχέτισης του GSTM1-null πολυμορφισμού στα αδενοκαρκινώματα στον ελληνικό πληθυσμό (P=0,1%).

Οι όποιες συσχετίσεις μεταξύ GST πολυμορφισμών και καρκίνου του πνεύμονα θα πρέπει να είναι εντονότερες σε περιστατικά πρόωρης εμφάνισης της νόσου. Μελετώντας τέτοια δείγματα μπορούμε να περιορίσουμε την επίδραση του χρόνου στην φυσική συσσώρευση μεταλλάξεων, απόρροια των κυτταρικών διαιρέσεων, και να εστιάσουμε την προσοχή μας στην συνδρομή των πολυμορφισμών των ενζύμων αυτών ως αιτιολογικοί παράγοντες στην χημική καρκινογένεση. Αν και από την παρούσα εργασία λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων δεν προκύπτουν στοιχεία που να υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση, η έρευνα των Sorensen et al, (2004) την επαληθεύει <sup>(36)</sup>.

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την μέχρι τώρα έρευνα συμπεριλαμβανομένης και της παρούσας, δείχνουν ότι οι πολυμορφισμοί των γονιδίων GSTM1 και GSTT σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα ιδιαίτερα δε όταν συνδυάζονται με συνήθειες όπως το κάπνισμα. Ωστόσο για να χρησιμοποιηθούν αυτοί οι πολυμορφισμοί ως μοριακοί δείκτες ευπάθειας απαιτείται περαιτέρω μελέτη σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων του ελληνικού πληθυσμού.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. A. Rasooly, J. Jacobson. Development of biosensors for cancer clinical testing. *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2006) 1851–1858.
2. P. Boyle and J. Ferlay. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Annals of Oncology* 16: 481–488, (2005).
3. C. E. Jefford, I. Irringer-Finger. Mechanisms of chromosome instability in cancers. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (2006).
4. M. Verma, P. Maruvada and S. Srivastava. Epigenetics and Cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 41, 5-6 (2004) 585-607.
5. Lewin B.: “Oncogenes and cancer”. *Genes VI*; Oxford University Press: 1131-1170, (1996).
6. Cooper G. M.: *The Cell- A molecular approach*, 2nd Edition, Sinauer Associates Inc., Sunderland, (2000).
7. Kufe et al: *Cancer Medicine*, 6th Edition, Frei III, Emil, editors, BC Decker Inc., Canada, (2003).
8. Teich N.: *Cellular and Molecular Biology of Cancer*, 3rd Edition, 169-201, (1998).
9. Griffiths J.F.A. et al: *An introduction to genetic analysis*, 7th Edition, W.H. Freeman and Company, N. York, (1999).
10. Jones P. A. et al: The fundamental role of epigenetic events in cancer, *Nat. Rev. Genet.* Vol:3, 415-428, (2002).
11. C. J. Etzel, M. Lu, K. Merriman, M. Liu, A. Vaporciyan and M. R. Spitz. An epidemiologic study of early onset lung cancer *Lung Cancer*, 52 (2006), 129-134.

- 
12. E. N. Imyanitov, E. Sh. Kuligina, E.V. Belogubova, A. V. Togo, K. P. Hanson. Mechanisms of lung cancer. *Drug Discovery Today: Diseases Mechanisms*, 2 (2005) 213-223.
13. J. Tang, Q.He,R.Guo, X.Chang. Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. *Lung Cancer*, 51(2006,181-191).
14. J.S. Neuberger, J. D. Mahnken, M. S. Mayo and R. W. Field. Risk factors for lung cancer in Iowa women: Implications for prevention *Cancer Detection and Prevention* (2006).
15. R. Dammann et al.CpG island methylation and expression of tumour-associated genes in lung carcinoma. *European Journal of Cancer*, 41 (2005), 1223-1236.
- 16.S. A. Belinsky. Gene-Promoter Hypermethylation as Biomarker in Lung Cancer. *Nature Reviews/Cancer*, 4(2004) 1-11.
17. R. Ribeiro et al.A functional polymorphism in the promoter region of leptin gene increases susceptibility for non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*, 42, 8, (2006), 1188-1193.
18. S.K. Chan, W.J. Gullick and M.E. Hill. Mutations of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer – Search and destroy. *European Journal of Cancer*, 42, 1, (2006), 17-23.
19. J. Olak, Y. Colson. Gender differences in lung cancer: Have we really come a long way, baby? *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* (2004); 128: 346-351.
20. Y. Sekido, KM. Fong, JD Minna. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim. Biophys. Acta* (1998); 1378:21-59.



- 
21. Yi-Wen Chu et al. Selection of invasive and metastatic subpopulations from a human lung adenocarcinoma cell line. *Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, (1997) Vol. 17, No 3
22. J. H. Schiller, D. Harrington, CP. Belani. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer. *New Engl. J. Med* (2002); 346: 92-98.
23. N. Jafri, R. Salgia. Biology and novel therapeutics for neuroendocrine tumors of the lung. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* (2004)
24. X. Wu, H. Zhao, R. Suk and D. Christiani. Genetic susceptibility to tobacco-related cancer. *Oncogene* (2004) 23, 6500-6523.
25. Trichopoulos D. Risk of lung cancer and passive smoking. *Important Advances in Oncology* 1995:77-85.
26. Tridaniel J., Boeffetta P., Saracci R., Hirsch A.. Environmental tobacco smoke and the risk of cancer in adults. *European Journal of Cancer* 1993, 29A: 2058-68.
27. <http://www.oncologychannel.com/lungcancer/enironmental.shtml>
28. KM. Fong, Y. Sekido, JD Minna. Molecular Pathogenesis of Lung Cancer. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* (1999); 118:1136- 1152.
29. E. Forgacs, S. Zochbauer-Muller, E. Olah, J.D Minna. Molecular Genetic Abnormalities in the Pathogenesis of Human Lung Cancer *Pathology Oncology Research* (2001) Vol. 7, No1.
30. S. J. Lee et al. DNMT3B polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Carcinogenesis* vol. 26 no. 2 pp. 403-409, (2005).

- 
31. M.L.Cote , A.S.Wenzlaff ,S.L.R Kardia , S.J.Land and A.G.Schwartz. Combinations of glutathione S-transferase genotypes and risk of early-onset lung cancer in Caucasians and African Americans: a population-based study .Carcinogenesis vol.26 no.4 pp811-819,2005
32. [www.srv2.lycoming.edu](http://www.srv2.lycoming.edu)
33. Πτυχιακή εργασία Κοσμίδου Σ. Απομόνωση και κλωνοποίηση των GSTs του δάκου της ελιάς .Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας 2006
34. Zheng Ye, Honglin Song, Julian P.T.Higgings .Five glutathione S-transferase gene variants in 23.452 cases of lung cancer and 30.397 controls: Meta-analysis of 130 studies. Plos medicine (april 2006) vol.3
35. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
36. Mette Sorensen, Herman Autrup, Anne Tjonneland, Kim Overvad and Ole Raaschou-Nielsen . Glutathione S-transferase T1 null-genotype is associated with an increased risk of lung cancer. Int. J. Cancer: 110, 219–224 (2004)
37. Ugur Gonlugur , Hatice Pinarbasi , Tanseli Efeeoglu Gonlugur Yavuz Silig. The association between polymorfisms in glutathione s-transferase (GSTM1 and GSTT1) and lung cancer outcome. Cancer investigation 24 : 497-501, 2006
38. Joschim Schneider , Ulrike Berges , Monika Philipp , Hans-Joachim Weitowitz .GSTM1 , GSTT1, GSTP1 polymorfisms and lung cancer risk in relation to tobacco smoking. Cancer letters 208(2004)65-74
39. Nadejda Jourenkova-Mironova, Anu Voho, Christine Bouchardy, Harriet Wikman, Pierre Dayer, Simone Benhamou and Ari Hirvonen. Glutathione S-transferase GSTM3 and GSTP1 genotypes and larynx Cancer risk. Cancer epidemiology vol..8, 185-188.February 1999
40. Ahmed Abbas, Karine delvinquiere , Mathilde Lechevrel , Pierre Lebailly ,Pascal Gauduchon ,Guy Launoy Francois Sichel.GSTM1 , GSTT1 , GSTP1 and CYP1A1

---

genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: Different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterology* 2004 10(23):3389-3393

41. H. Baranova, M. Canis, T. Ivanescu et al. Possible involvement of N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 genes in the development of endometriosis. *Molecular Human Reproduction* Vol.5, No 7, 636-641, July 1999

42. Dilek Aktas, Merin Hascicek, Sinan Sozen et al. CYP1A1 and GSTM1 polymorphic genotypes in patients with prostate cancer in Turkish population. *Cancer Genetics And Cytogenetics* 154 (2004) 81-85

43. Nurcan Aras Ates, Lulufer Tamer, Cengiz Ates, et al. Glutathione S-transferase M1, T1, P1 genotypes and risk for development of colorectal Cancer. *Biochemical genetics* Vol.43 april 2005

44. Maniatis T., Fritsch EF., Sambrook J: "Molecular Cloning". *A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, (1982).

45. Saiki RK., Gelfand DH., Stoffel S., Scharf SJ., Higuchi R., Horn GT., Mullis KB., Erlich HA: "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". *Science*; Vol: 239, 487-491, (1988).

46. Brown TA: "The polymerase chain reaction". *Gene Cloning – An Introduction*. 3rd edition. Chapman & Hall: 228-249, (1995).

47. H. Baranova, R. Bothorishvilli, M. Canis et al, Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis in a French population *Molecular human reproduction* Vol.3 no.9 pp.775-780, 1997

48. H. Baranova, M. Canis, T. Ivaschenko et al, Possible involvement of arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione transferases M1 and T1 in the development of endometriosis. *Molecular human reproduction* Vol 5, No 7, 636-641, 1999