



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

**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ  
ΓΟΝΙΔΙΟΥ *Cyp1A1* ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΗ  
ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΤΖΙΩΓΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Γ. ΤΖΗΜΑΓΙΩΡΓΗΣ  
ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ, ΑΠΘ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2007



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

Αριθ. Εισ.: 5801/1  
Ημερ. Εισ.: 18-03-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2007  
ΤΖΙ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087339

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

***ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ  
ΓΟΝΙΔΙΟΥ Cyp1A1 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΗ  
ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ***

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΤΖΙΩΓΑΣ**

**Υπεύθυνος καθηγητής:**

- Τζημαγιώργης Γεώργιος, Μοριακός Βιολόγος, Λέκτορας Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Α.Π.Θ.

**Μέλη τριμελούς επιτροπής:**

- Τζημαγιώργης Γεώργιος, Μοριακός Βιολόγος, Λέκτορας Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Α.Π.Θ.
- Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Κουρέτας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας ζώων Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## 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 της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ., που δέχθηκε να εκπονηθεί η παρούσα εργασία στο εργαστήριο του. Η συνεχής καθοδήγηση και παρακολούθηση καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας καθώς και της συγγραφής της παρούσας εργασίας ήταν πολύτιμες για την επιτυχή ολοκλήρωσή της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Κουρέτα Δημήτριο Αναπληρωτή 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 και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής Α.Π.Θ. Ευχαριστώ ιδιαίτερος, την Θεοδώρα Κατωπόδη για την πολύτιμη βοήθεια καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων, τον Χρήστο Καραγεωργόπουλο και Κώστα Ασημακόπουλο για την άψογη συνεργασία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου για τις πολύτιμες συμβουλές τους στο χώρο του εργαστηρίου.

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u> .....	7
Καρκίνος του πνεύμονα.....	7
Τύποι καρκίνου.....	9
Αιτιολογία καρκίνου του πνεύμονα.....	11
Γενετικοί Πολυμορφισμοί.....	13
<u>ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΠΟΤΟΞΙΝΩΣΗΣ ΦΑΣΗ 1/ΦΑΣΗ 2</u> .....	14
Το Σύστημα Αποτοξίνωσης Φάση 1.....	14
Το Σύστημα Αποτοξίνωσης Φάση 2.....	16
<u>ΓΟΝΙΔΙΑ Cyp</u> .....	17
Τα γονίδια Cyp.....	17
Πολυμορφισμοί του γονιδίου Cyp1A1.....	20
Συσχέτιση πολυμορφισμών του Cyp1A1 με τον καρκίνο του πνεύμονα.....	21
<u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u> .....	25
Προέλευση δειγμάτων.....	25
Εργαστηριακός εξοπλισμός .....	25
Χημικά διαλύματα.....	26
Μέθοδοι μοριακής βιολογίας.....	27
Απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων.....	27
Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ιστούς .....	27
Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αίμα.....	29
PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	31
Ποσοτικοποίηση δειγμάτων DNA.....	32
<u>ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ</u> .....	32
Ενίσχυση των δειγμάτων DNA με τη μέθοδο της PCR.....	33
Έλεγχος των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης .....	34
Πέψη των PCR προϊόντων με το ένζυμο περιορισμού MspI.....	34
<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u> .....	35
<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u> .....	40
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u> .....	43

## **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 της νόσου. Ενώ το κάπνισμα φαίνεται να αποτελεί τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα, η παρουσία γενετικών πολυμορφισμών φαίνεται να ενοχοποιείται για την παθογένεια της νόσου. Τα ένζυμα της οικογένειας του κυτοχρώματος P450 (Cyp) παίζουν ένα καίριο ρόλο στην αποτοξίνωση του οργανισμού από ξενοβιοτικές ουσίες, παθογόνα και καρκινογενετικά περιλαμβανομένων και αυτών του καπνού. 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 ανίχνευση και μελέτη γενετικών πολυμορφισμών του γονιδίου *Cyp1A1* σε δείγματα από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα στον Ελληνικό πληθυσμό.

**Μέθοδος:** Εξετάστηκαν 44 δείγματα με πρωτοπαθή μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (non-small cell cancer, NSCLC) με τη μέθοδο της PCR. Την ίδια στιγμή εξετάστηκαν και άλλα 46 δείγματα από υγιή άτομα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες .

**Αποτελέσματα:** Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού *MspI* του γονιδίου *Cyp1A1* με την παρουσία καρκίνου του πνεύμονα. Το ποσοστό της παρουσίας των ετερόζυγων για το αλληλόμορφο *m1* γενότυπων ήταν 25% για τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και 26% για τα φυσιολογικά άτομα. Καμία συσχέτιση επίσης δεν βρέθηκε ανάμεσα στην παρουσία του ετερόζυγου *wt/m1* γενότυπου και την ηλικία, την βαρύτητα του καπνίσματος και τον τύπο καρκίνου του πνεύμονα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι από τις επτά γυναίκες με καρκίνο του πνεύμονα μόνο η μία παρουσιάζει τον ετερόζυγο *wt/m1* γενότυπο (ποσοστό 14%).

## 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. Enzymes of P450 family (Cyp) have a significant role in detoxification of carcinogens including those from tobacco smoke. Thus, polymorphisms in the Cyp genes have been considered as potential modifiers of individual's cancer risk. The aim of this project was the determination and study of genetic polymorphisms of the Cyp1A1 gene in Greek patients.

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

**Results:** The results have shown that there is no association between m1 polymorphism and lung cancer. The percentage for the heterozygous m1 genotypes was estimated 25% in lung cancer samples and 26% in normal ones. Also, there was no association between the heterozygous wt/m1 genotype and age, smoking heaviness and cancer type. A finding of great interest is the fact that from the seven women with lung cancer only one appears to be heterozygous for the m1 allele (percentage 14%).

# Καρκίνος του πνεύμονα

## Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα

Ο καρκίνος είναι σήμερα μια απ' τις πιο σοβαρές ασθένειες σε παγκόσμια κλίμακα και ευθύνεται για εκατομμύρια θανάτους ετησίως (Alberg et al., 2003). Οι έρευνες σε προγνωστικό, διαγνωστικό και θεραπευτικό επίπεδο προχωρούν με γοργούς ρυθμούς, εν τούτοις όμως η συχνότητα εμφάνισης της νόσου και τα ποσοστά θνησιμότητας κυμαίνονται σε υψηλά επίπεδα.

Ο καρκίνος του πνεύμονα ευθύνεται για τους περισσότερους θανάτους παγκοσμίως εν συγκρίσει με τους άλλους καρκίνους. 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. Μόνο ένας στους δέκα ασθενείς στον οποίο έχει διαγνωστεί η ύπαρξη της νόσου επιβιώνει στα επόμενα πέντε χρόνια (Alberg et al., 2003).

Ο καρκίνος του πνεύμονα αρχικά είχε χαρακτηριστεί σαν νόσος που προσβάλλει κυρίως τους άνδρες, παρ' όλα αυτά το ποσοστό των προσβεβλημένων γυναικών έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες κάτι που έχει αποδοθεί στην αυξημένη αναλογία γυναικών προς τους άνδρες σε ότι αφορά το κάπνισμα. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι είναι ο καρκίνος του πνεύμονα είναι πρώτος σε θνησιμότητα στο γυναικείο πληθυσμό ξεπερνώντας ακόμα και τον καρκίνο του μαστού, του τραχήλου της μήτρας κ.ά. Επίσης έρχεται δεύτερος σε συχνότητα εμφάνισης τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες (Πίν. 1).

Το τμήμα εκείνο του πληθυσμού όπου παρατηρείται και μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης αλλά και αυξημένη προδιάθεση για ανάπτυξη καρκίνου των πνευμόνων είναι τα άτομα ηλικίας άνω των 50 τα οποία έχουν επίσης ιστορικό καπνίσματος. Στις Η.Π.Α. αναμένονται 213.380 νέες περιπτώσεις για το τρέχον έτος 2007 και 160.330 θάνατοι (πηγή National Cancer Institute).



**Πίνακας 1:** Αριθμοί νέων περιστατικών και θανάτων στα διάφορα είδη καρκίνου σε άνδρες και γυναίκες  
(American Cancer Society, 2005)

Αριθμός νέων περιπτώσεων			
ΑΝΔΡΕΣ		ΓΥΝΑΙΚΕΣ	
Προστάτης	232.090 33%	Στήθος	211.240 32%
Πνεύμονες και βρόγχοι	93.010 13%	Πνεύμονες και βρόγχοι	79.560 12%
Κόλον και παχύ έντερο	71.820 10%	Κόλον και παχύ έντερο	73.470 11%
Ουροδόχος κύστη	47.010 7%	Τράχηλος της μήτρας	40.880 6%
Μελάνωμα	33.580 5%	Λέμφωμα Non-Hodgkin	27.320 4%
Λέμφωμα Non-Hodgkin	29.070 4%	Μελάνωμα	26.000 4%
Νεφρά	22.490 3%	Ωοθήκες	22.220 3%
Λευχαιμία	19.640 3%	Θυρεοειδής	19.190 3%
Κακοήθη νεοπλ. στοματικής κοιλότητας	19.100 3%	Ουροδόχος κύστη	16.200 2%
Πάγκρεας	16.100 2%	Πάγκρεας	16.080 2%
<b>Σύνολο</b>	<b>710.040 100%</b>	<b>Σύνολο</b>	<b>662.870 100%</b>
Αριθμός θανάτων			
ΑΝΔΡΕΣ		ΓΥΝΑΙΚΕΣ	
Πνεύμονες και βρόγχοι	90.490 31%	Πνεύμονες και βρόγχοι	73.020 27%
Προστάτης	30.350 10%	Στήθος	40.410 15%
Κόλον και παχύ έντερο	28.540 10%	Κόλον και παχύ έντερο	25.750 10%
Πάγκρεας	15.820 5%	Ωοθήκες	16.210 6%
Λευχαιμία	12.540 4%	Πάγκρεας	15.980 6%
Οισοφάγος	10.530 4%	Λευχαιμία	10.030 4%
Συκώτι-Ηπατικός χολικός πόρος	10.330 3%	Λέμφωμα Non-Hodgkin	9.050 3%
Λέμφωμα Non-Hodgkin	10.150 3%	Τράχηλος της μήτρας	7.310 3%
Ουροδόχος κύστη	8.970 3%	Πολλαπλό μυέλωμα	5.640 2%
Νεφρά	8.020 3%	Εγκέφαλος και λοιπό νευρικό σύστημα	5.480 2%
<b>Σύνολο</b>	<b>295.280 100%</b>	<b>Σύνολο</b>	<b>275.000 100%</b>

## Τύποι Καρκίνου του Πνεύμονα

Μπορούμε να διακρίνουμε τον καρκίνο του πνεύμονα κυρίως σε δύο τύπους με βάση το μέγεθος και την εμφάνιση των προσβεβλημένων κυττάρων οι οποίοι είναι οι εξής: ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Small Cell Lung Cancer, SCLC) ο οποίος απαντάται στο 20% των περιπτώσεων και ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) ο οποίος αντιστοιχεί στο υπόλοιπο 80% των συνολικών περιπτώσεων (Sekido et al., 1998).

Κύρια Χαρακτηριστικά τύπων Καρκίνου του Πνεύμονα:

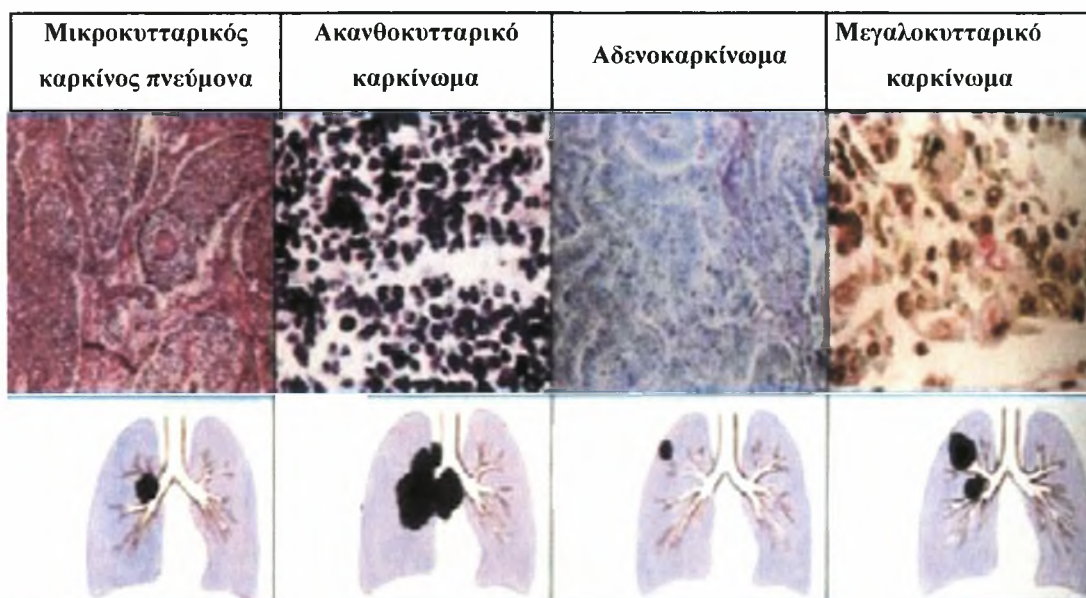
❖ **Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC):** Είναι η λιγότερο συχνή μορφή καρκίνου του πνεύμονα. Χαρακτηρίζεται από υψηλό ρυθμό διάδοσης. Ξεκινάει είτε από τους μεγάλους αναπνευστικούς αεραγωγούς περιφερειακά είτε κάτω από το επιθήλιο στο κέντρο των πνευμόνων στο επίπεδο της βρογχικής βλεννώδους μεμβράνης (Εικ. 1). Συχνά μεταστατικός κατά την εμφάνιση του, ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα αποτελείται από κύτταρα μικρά σε μέγεθος ενώ το σχήμα τους μπορεί να είναι είτε πολυπλευρικό είτε ατρακτοειδές. Ο τύπος αυτός επίσης είναι αρκετά ευαίσθητος στη χημειοθεραπεία αν και χαρακτηρίζεται συχνά από φτωχή πρόγνωση. Συνδέεται σε πολύ μεγάλο βαθμό με το κάπνισμα. (Vaporciyan et al., Cancer Medicine 2003).

❖ **Μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC):** Αποτελείται από 3 υπότυπους καρκίνου του πνεύμονα οι οποίοι τοποθετούνται στην ίδια ομάδα καθ' ότι η πρόγνωση και ο χειρισμός τους έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά ενώ ο καθένας εμφανίζει κάποια ξεχωριστά διακριτά στοιχεία:

I. **Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (squamous cell carcinoma):** αντιστοιχεί στο 20 με 25% των περιπτώσεων NSCLC. Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα ξεκινάει από τους μεγάλους βρόγχους για να επεκταθεί αργότερα με χαμηλό όμως ρυθμό διάδοσης, κατά συνέπεια το μέγεθος των όγκων ποικίλλει κατά την διάγνωση (Εικ.1).

II. **Αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma)**: είναι η πιο διαδεδομένη μορφή καρκίνου του πνεύμονα καθώς ευθύνεται για το 40% όλων των περιπτώσεων. Τα αδενοκαρκινικά κύτταρα έχουν σωληνοειδές σχήμα και συνήθως εμφανίζονται πρώτα στις εξωτερικές άκρες των πνευμόνων (Εικ.1) (Chu Yi-Wen et al., 1997).

III. **Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (large cell carcinoma)**: ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για όλους τους καρκίνους του πνεύμονα που δεν ανήκουν στις κατηγορίες του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος και αδενοκαρκινώματος. Η μορφή αυτή καρκίνου του πνεύμονα ευθύνεται για το 15% περίπου όλων των περιπτώσεων και μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε περιοχή του πνεύμονα (Εικ.1) (Schiller et al., 2002).



**Εικόνα 1:** Οι 4 τύποι καρκίνου του πνεύμονος καθώς και οι περιοχές του πνεύμονα που εμφανίζονται (A. Riccardi).

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 (Ribeiro et al., 2006). 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 περισπλάχνιο 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 καρκίνου του πνεύμονα

**Γενετικά αίτια:** Όπως όλα τα είδη καρκίνου έτσι και ο καρκίνος του πνεύμονα έχει σαφές γενετικό υπόβαθρο. Πολλές γενετικές αλλοιώσεις συσσωρεύονται με αποτέλεσμα διαταραχές στον κύκλο ζωής των κυττάρων και ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό που οδηγούν σε καρκίνο. Οι γενετικές αυτές αλλοιώσεις αφορούν συνηθέστερα την υπερέκφραση ογκογονιδίων ή την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, ενώ συχνό φαινόμενο είναι η απώλεια ετεροζυγωτίας σε κάποιες χρωμοσωμικές θέσεις (π.χ. στο γονίδιο *Rb1* στο χρωμόσωμα 13 και στο γονίδιο *p53* στο χρωμόσωμα 17) (Cooper, 2000).

**Επιγενετικά αίτια:** Ως επιγενετικές αλλαγές ορίζονται αλλαγές κληρονομήσιμες μεν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα που δεν αφορούν όμως στην αλληλουχία του DNA. Τέτοιες αλλαγές είναι αυτές που τροποποιούν το DNA και τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης όπως η μεθυλίωση, η ακετυλίωση και η φωσφορυλίωση (Lewin, 2004).

**Διατροφικά αίτια:** Η κακή διατροφή, κυρίως η έλλειψη βιταμινών που περιέχονται σε φρούτα και λαχανικά σε συνδυασμό με χρήση τσιγάρου αυξάνουν τις πιθανότητες για εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα.

**Δράση τελομεράσης:** Η αντιγραφή του DNA δεν είναι πλήρης στα άκρα των χρωμοσωμάτων λόγω της παρουσίας των τελομερών. Έτσι παρουσιάζεται μόνιμη αναστολή του πολλαπλασιασμού μετά από ένα πεπερασμένο όριο κυτταρικών διαιρέσεων. Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο που προσθέτει TTAGGG νουκλεοτίδια στο άκρο του χρωμοσωμικού DNA, ώστε να αντισταθμιστούν οι οποιεσδήποτε

απώλειες που προκύπτουν μετά από κάθε κύκλο διπλασιασμού του DNA. Σε φυσιολογικά κύτταρα δεν υπάρχει δράση της τελομεράσης ενώ αντίθετα τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη δράση της τελομεράσης. Μελέτες σε όγκους πνεύμονα έδειξαν ότι η τελομεράση εκφράζεται στο 80% των NSCLC περιπτώσεων και στο 100% των SCLC περιπτώσεων (Meyerson, 2000)

**Χρήση καπνού:** κύρια θέση στην κατηγορία των εξωγενών παραγόντων που αυξάνουν τις πιθανότητες για εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα κατέχει η κατανάλωση καπνού. Υπολογίζεται ότι τουλάχιστον 87% των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα συσχετίζονται με το κάπνισμα. Ο κίνδυνος συσχετίζεται με το συσσωρευτικό ποσό που καπνίζεται ή με τα “pack-years”, τα οποία καθορίζονται με τη διαίρεση του μέσου αριθμού τσιγάρων που καπνίζονται ανά ημέρα δια του 20, από 20<sup>ο</sup> έτος και έπειτα, πολλαπλασιάζοντας με τον αριθμό ετών καπνίσματος. Η ηλικία της έναρξης του καπνίσματος είναι επίσης σημαντική, πιθανώς επειδή το ιστορικό καπνίσματος είναι μεγαλύτερο. Τα τσιγάρα με υψηλά ποσοστά σε πίσσα και νικοτίνη, ειδικά εκείνα χωρίς φίλτρο, αλλά και το βάθος της εισπνοής θέτουν έναν μεγαλύτερο κίνδυνο. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα μειώνεται αναλογικά προς τον αριθμό των ετών μετά από τη διακοπή καπνίσματος. Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει πολλές χημικές ουσίες, εκ των οποίων πολλές έχουν βρεθεί ότι είναι καρκινογόνες. Μερικές από τις ουσίες αυτές γίνονται καρκινογόνες μόνο μετά την ενεργοποίησή τους από συγκεκριμένα ένζυμα που υπάρχουν σε διάφορους ιστούς του σώματος, ενώ έχει αποδειχτεί ότι το είδος των μεταλλάξεων που επάγονται από τις ουσίες αυτές είναι μεταβάσεις τύπου G>T. Οι διάφορες μεταλλάξεις επηρεάζουν πολλά γονίδια με συνέπεια την εμφάνιση καρκίνου (Wu et al., 2004) (Trichopoulos D., 1995).

## Γενετικοί πολυμορφισμοί

Ως γενετικός πολυμορφισμός ορίζεται η εμφάνιση δύο ή περισσότερων γενετικά καθορισμένων εναλλακτικών φαινοτύπων σε έναν πληθυσμό, σε τέτοια συχνότητα, ώστε ο σπανιότερος δεν θα μπορούσε να διατηρηθεί μόνο με αλληπάλληλες μεταλλάξεις (E. B. Ford, 1940). Οι γενετικοί πολυμορφισμοί μπορούν να τροποποιήσουν την δομή του πρωτεϊνικού προϊόντος λειτουργώντας με μια απλή αντικατάσταση βάσης σε μια κωδική περιοχή ενός γονιδίου. Επίσης, μπορούν να αυξήσουν ή να μειώσουν τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης είτε επηρεάζοντας τη σταθερότητα του mRNA όταν υφίστανται στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου ή τροποποιώντας την πρόσδεση ενός μεταγραφικού παράγοντα όταν εντοπίζονται στην περιοχή του προαγωγέα. Εναλλακτικά, ένας πολυμορφισμός μπορεί να μην έχει επίδραση στην παραγωγή της πρωτεΐνης εφόσον μπορεί κάλλιστα να εντοπιστεί σε περιοχές DNA που δεν εμπλέκονται στην διαδικασία της γονιδιακής έκφρασης.

Περισσότερο από το 1/3 των γενετικών τόπων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες στον άνθρωπο, έχει βρεθεί ότι είναι πολυμορφικοί (Iannuzzi et al., 2002). Ως κλασικά παραδείγματα πολυμορφισμού μπορούν να αναφερθούν οι γενετικοί τόποι που κωδικοποιούν κοινές ομάδες αίματος, όπως είναι τα συστήματα ABO, MN και RH ή οι γενετικοί τόποι του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC), η ομάδα δηλαδή των εξαιρετικά πολυμορφικών γονιδίων τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης.

Μερικοί τρόποι με τους οποίους μπορεί ένας γενετικός πολυμορφισμός να επηρεάσει την έκφραση του γονιδιακού προϊόντος ή την καταλυτική δραστηριότητα του αντίστοιχου ενζύμου είναι οι ακόλουθοι:

- α) Νουκλεοτιδικές αλλαγές στην κωδικεύουσα περιοχή του γονιδίου καταλήγουν σε αντικατάσταση αμινοξέων και μεταβάλλουν την ενζυμική δραστηριότητα ή την δυνατότητα για πρόσδεση του υποστρώματος.
- β) Ελλείψεις στην κωδικεύουσα περιοχή οδηγούν σε ανενεργό ένζυμο ή μη πρωτεϊνική σύνθεση
- γ) Πολυμορφισμοί στην μη κωδικεύουσα περιοχή επηρεάζουν στοιχεία μεταγραφικού ελέγχου που παρεμβαίνουν στην ενζυμική έκφραση και επαγωγή.
- δ) Αλλαγές στην πόλυ-A ουρά ενός γονιδίου επηρεάζουν τον χρόνο ημιζωής του μετάγραφου και έτσι την ποσότητα του παραγόμενου ενζύμου.



ε) Γονιδιακή ενίσχυση (gene amplification) αυξάνει την ποσότητα του ενζύμου  
στ) Αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολυμορφικών γονιδίων και/ή των ενζυμικών προϊόντων τους

Η ύπαρξη γενετικών πολυμορφισμών που τροποποιούν την δραστηριότητα 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. 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.

## Το Σύστημα Αποτοξίνωσης «Φάση 1»

Συνίσταται κυρίως από την υπεροικογένεια των CypP450 ενζύμων και αποτελεί το πρώτο βήμα για τον ενζυματικό καταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών. Οι περισσότερες ουσίες καταβολίζονται σε αυτή την Φάση. Σε μια τυπική σειρά αντιδράσεων τύπου «Φάσης 1» ένα ένζυμο CypP450 χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο και σαν συμπαράγοντα το NADH για να προσθέσει μια δραστική ομάδα, όπως το υδροξύλιο. Σαν συνέπεια αυτού του βήματος στην αποτοξίνωση, παράγονται δραστικά μόρια, τα οποία μπορεί να είναι περισσότερα τοξικά από τα αρχικά μόρια. Εάν αυτοί οι δραστικοί μεταβολίτες δεν μεταβολιστούν περαιτέρω από τα ένζυμα της Φάσης 2, δύνανται να προκαλέσουν βλάβες σε DNA, RNA, και πρωτεΐνες. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει θετική συσχέτιση ανάμεσα σε διέγερση της Φάσης 1 και/ή μειωμένη λειτουργικότητα της Φάσης 2 και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου.

Τουλάχιστον 10 οικογένειες CypP450 ενζύμων συμμετέχουν στις μεταβολικές δραστηριότητες της Φάσης 1 (Πίν. 2). Τα ένζυμα με κυρίαρχο ρόλο είναι τα Cyp3A4,

Cyp1A1, Cyp1A2, Cyp2D6, και τα Cyp2C. Η ποσότητα καθενός από αυτά τα ένζυμα στο ήπαρ αντανάκλα την σημασία τους στον μεταβολισμό ουσιών. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα ένζυμα της Φάσης 1 εμπλέκονται και στον καταβολισμό ενδογενών μορίων, όπως π.χ. στεροειδών.

**Πίνακας 2 :** Ένζυμα p450 που έχουν απομονωθεί από ανθρώπινο ήπαρ

<u>P450</u> <u>Ισοένζυμο</u>	<u>% Ποσοστό</u> <u>επί του</u> <u>συνόλου P450</u>	<u>Υποστρώματα</u>	<u>Εκλεκτικοί</u> <u>Αναστολείς</u>
<u>Cyp3A4,4</u>	<u>28.8±10.4</u>	<u>Κυκλοσπορίνη</u> <u>Νιφεδιπίνη</u> <u>Τεστοστερόνη</u>	<u>Τρολεανδομυκίνη</u> <u>Κετοκοναζόλη</u> <u>Γεστοδένη</u>
<u>Cyp2C8,9,18</u>	<u>18.2±6.7</u>	<u>R-Μεφινιτοΐνη</u> <u>Τολβουταμίδη</u>	<u>Σουλφαγαφεναζόλη</u>
<u>Cyp1A2</u>	<u>12.7±6.2</u>	<u>Φενασετίνη</u> <u>Καφεΐνη</u> <u>Αφλατοξίνη B1</u>	<u>Ελλιπτικήνη</u> <u>Φουραφυλλίνη</u> <u>α-Ναφθοβλαβόνη</u>
<u>Cyp2E1</u>	<u>6.6±2.9</u>	<u>Αιθανόλη</u> <u>Διμεθυλ-νιτροζαμίνη</u>	<u>Διαλλυλ-σουλφίδιο</u>
<u>Cyp2A6</u>	<u>4.0±3.2</u>	<u>Κουμαρίνη</u> <u>Διμεθυλ-νιτροζαμίνη</u>	<u>Μεθοξαλένη</u>
<u>Cyp2D6</u>	<u>1.5±1.3</u>	<u>Δεβρισκοκίνη</u>	<u>Κουινιδίνη</u>
<u>Cyp2B6</u>	<u>0.2±1.3</u>	<u>Κυκλοφωσφαμίδη</u>	<u>Σουλφαγαφεναζόλη</u>



## Το Σύστημα Αποτοξίνωσης «Φάση 2»

Οι αντιδράσεις της Φάσης 2 ακολουθούν μετά την ενεργοποίηση της Φάσης 1 και μετατρέπουν τους μεταβολίτες που προέκυψαν σε υδατοδιαλυτές ενώσεις που στη συνέχεια μπορούν να εκκριθούν μέσω των ούρων ή της χολής. Διάφοροι τύποι αντιδράσεων λαμβάνουν χώρα στα κύτταρα του σώματος περιλαμβάνοντας συζεύξεις με γλουταθειόνη, αμινοξέα, γλυκουρονικό οξύ, μεταφορά μεθυλομάδων κ.ά. (Πίν. 4). Οι αντιδράσεις αυτές απαιτούν συμπαραγόντες που πρέπει να ανανεώνονται μέσω διαιτητικών πηγών.

<b>Πίνακας 3 :</b> Κύριες δραστηριότητες συστήματος αποτοξίνωσης Φάση 2 στον άνθρωπο...			
<b>Τύπος Αντίδρασης</b>	<b>Ένζυμο</b>	<b>Τόπος Αντίδρασης</b>	<b>Υποστρώματα</b>
H <sub>2</sub> O	Υδρολάση εποξειδίων	Μεμβράνη Κυτταρόπλασμα	Εποξειδία
Γλουταθειόνη	Τρανσφεράση Γλουταθειόνης	Μεμβράνες	Ηλεκτρονιόφιλα
Γλυκουρονικό Οξύ	Γλυκουρονυλ τρανσφεράση	Μεμβράνες	Φαινόλες, θειόλες, αμίνες, καρβοξυλικά οξέα
Ακετοξύ	N-ακετυλοτρανσφεράση	Κυτταρόπλασμα	Αμίνες
Μεθυλομάδα	N- και O-μεθυλοτρανσφεράσες	Μεμβράνες Κυτταρόπλασμα	Φαινόλες, Αμίνες
Αμινοξέα	Τρανσφεράσες αμινοξέων	Μεμβράνες	Καρβοξυλικά οξέα

## Τα γονίδια Cyp

Τα γονίδια Cyp χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα πολυμορφικά. Υπάρχουν 46 τέτοια γονίδια τα οποία ταξινομούνται σε 15 οικογένειες και 29 υπο-οικογένειες (πιν. 4)

<b>Πίνακας 4:</b> Απεικονίζεται η ταξινόμηση των cyp γονιδίων σε 15 οικογένειες και 29 υπο-οικογένειες	
<b>Οικογένειες</b>	<b>Υπο-οικογένειες</b>
CYP 1	1A και 1B
CYP 2	2A,2B,2C,2D,2E,2F,2G, 2H
CYP 3	3A
CYP 4	4A,4B,4F
CYP 5	5A
CYP 7	7A και 7B
CYP 8	8A και 8B
CYP11	11A και 11B
CYP17	17A
CYP19	19A
CYP21	21A
CYP24	24A
CYP26	26A
CYP27	27A και 27B
CYP51	51A

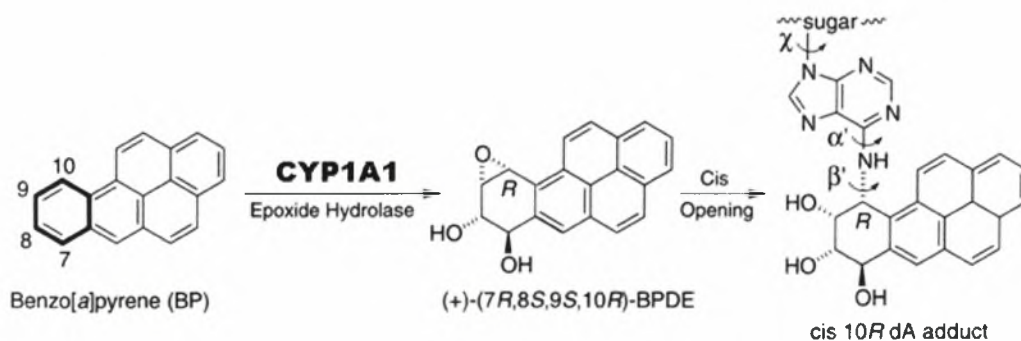
## Λειτουργία των Cyp γονιδίων

Τα γονίδια Cyp είναι μια υπερ-οικογένεια που αριθμεί 57 γονίδια τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα που μεταβολίζουν ξενοβιοτικές ουσίες όπως και ένζυμα που μεταβολίζουν ενδοβιοτικές ουσίες (στεροειδή, εικοσανοειδή, βιταμίνες). Συνιστούν το κύριο μεταβολικό ενζυμικό σύστημα για ξενοβιοτικά συστατικά και έχουν πολύ

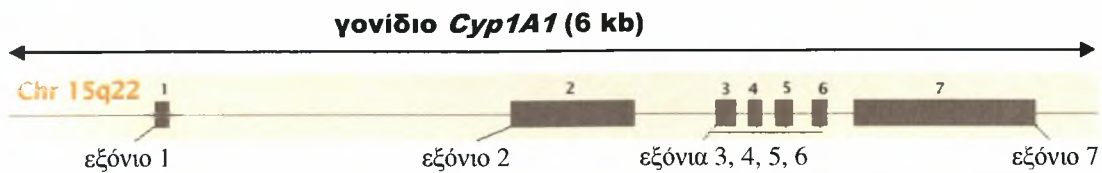
σημαντικό ρόλο στην προστασία έναντι επιβλαβών περιβαλλοντικών παραγόντων (ρουπαντές, εντομοκτόνα, γεωργικά φάρμακα).

Τα γονίδια Cyp κωδικοποιούν ένζυμα που ανήκουν στην ομάδα των μονοξυγενασών τα οποία καταβολίζουν ποικίλες ουσίες. Μεταξύ αυτών και ουσίες της χημικής οικογένειας των (Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων) PAHs οι οποίες υπάρχουν σε πολύ μεγάλο βαθμό στον καπνό του τσιγάρου. Τα ένζυμα Cyp πολλές φορές μετατρέπουν ουσίες όπως το α-βενζοπυρένιο σε επικίνδυνους μεταβολίτες μεταλλαξιγόνους και καρκινογόνους (Wenzlaff et al., 2005).

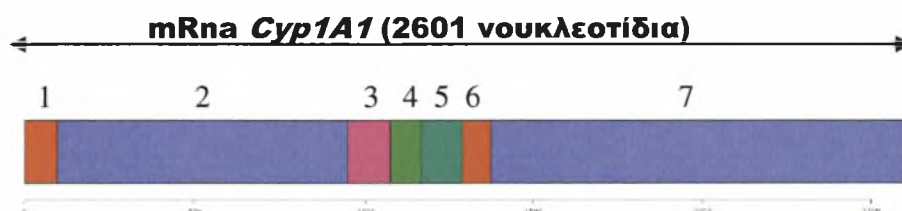
Το CYP1A1 ένζυμο, μέλος αυτής της οικογένειας ενζύμων, κωδικοποιείται από το αντίστοιχο γονίδιο μήκους 6 kb το οποίο περιλαμβάνει 7 εξόνια (Εικ. 3). Η χρωμοσωμική του θέση εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 15 στην τοποθεσία 15q22-24 (Εικ. 5). Το mRNA μετάγραφο που κωδικοποιεί το ένζυμο έχει μήκος 2601 bp. Το πρωτεϊνικό προϊόν που προκύπτει από ένα πλαίσιο ανάγνωσης, είναι μοριακού βάρους 58.2 kDa και αποτελείται από 512 αμινοξέα (Εικ. 4). Η τρισδιάστατη απεικόνιση του ενζύμου φαίνεται στην Εικ. 6. Το ένζυμο, μετά από μελέτες υβριδισμού, βρέθηκε να εντοπίζεται στο πεπτικό (ήπαρ), αναπαραγωγικό και αναπνευστικό (πνεύμονες) σύστημα. Η γενική αντίδραση η οποία καταλύεται από το CYP1A1 έχει ως εξής. Το α-βενζοπυρένιο καταλύεται από το CYP1A1 για να σχηματίσει ΒΠ-7,8-εποξειδίο, το οποίο οξειδώνεται από μια εποξειδική υδρολάση και σχηματίζει ΒΠ-7,8-διυδροδιόλη. Το CYP1A1 καταλύει εκ νέου τη μετατροπή αυτού του ενδιάμεσου προς σχηματισμό του ΒΠ-7,8 – διυδροδιόλη -9,10-εποξειδίου που είναι το τελικό καρκινογόνο. Το δραστικό ΒΠ -7,8 – διυδροδιόλη -9,10-εποξειδίο σχηματίζει σύμπλοκα με το DNA. Η διαδικασία αποτυπώνεται στην Εικ. 2.



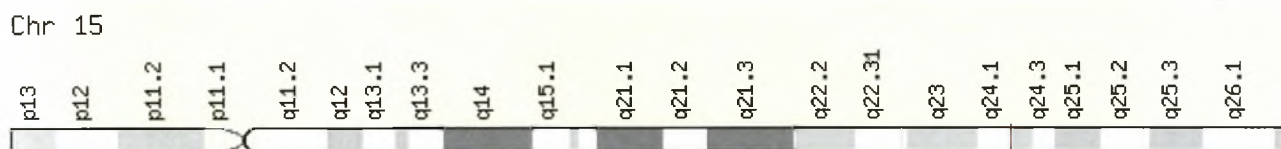
Εικόνα 2 : Μεταβολικό μονοπάτι του α-βενζοπυρενίου και ο ρόλος του Cyp1A1



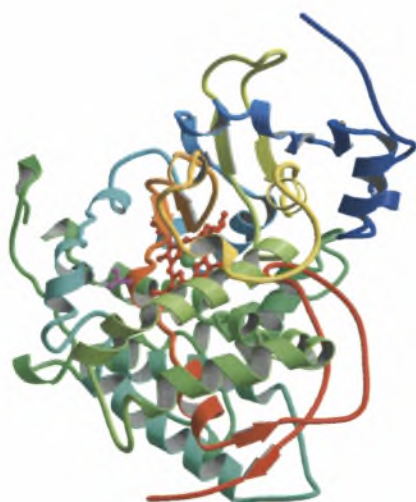
**Εικόνα 3 :** Σχηματική απεικόνιση της δομής εξονίων του γονιδίου *Cyp1A1*



**Εικόνα 4 :** Σχηματική απεικόνιση του mRNA *Cyp1A1*



**Εικόνα 5 :** Το γονίδιο *Cyp1A1* εντοπίζεται στην περιοχή q22-q24 του χρωμοσώματος 15.



**Εικόνα 6 :** Απεικονίζεται η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου *Cyp1A1*

## Πολυμορφισμοί του γονιδίου *Cyp1A1*

Οι σημαντικότεροι πολυμορφισμοί του γονιδίου αναφέρονται στον Πίν. 5 με όλες τις ονοματολογίες που έχουν επικρατήσει (Bartch et al., 2000) Ο πολυμορφισμός *MspI*, ένα RFLP) εντοπίζεται στην 3' μη κωδικεύουσα αλληλουχία του γονιδίου. Προκύπτει από σημειακή μετάλλαξη κατά την αντικατάσταση T από C στη θέση 6235.

Ο πολυμορφισμός *Ile/Val* εντοπίζεται στο 7ο εξόνιο στο κωδικόνιο 462. Προκύπτει από αντικατάσταση A από G ενώ η ιστορική του ονοματολογία προήλθε για την υπόδειξη της αντίστοιχης αμινοξικής αντικατάστασης (*Ile* από *Val*).

**Πίνακας 5 :** Πολυμορφισμοί του *Cyp1A1*

Ιστορική ονοματολογία των πολυμορφισμών του <i>Cyp1a1</i>	Σημειακές μεταλλάξεις	Συστηματική ονοματολογία μεταλλάξεων Cascorbi <i>et al.</i> (26), 1996	Συστηματική ονοματολογία αλληλομόρφων Cascorbi <i>et al.</i> (26), 1996	Ονοματολογία κατά IARC (84), 1999	Ονοματολογία κατά Nebert <i>et al.</i> (86), 1999
Αλληλόμορφο άγριου τύπου, <i>m1</i>	-	<i>w1<sup>a</sup></i>	*1	*1	*1
<i>MspI</i> , 3' αμετάφραστη περιοχή, <i>m2</i>	6235 T →C	<i>m1</i>	*2A	*2	*2A
<i>Ile</i> → <i>Val.</i> , εξόνιο 7, κωδικόνιο 462	4889 A →G	<i>m2</i>	*2B ( <i>m1</i> + <i>m2<sup>b</sup></i> )	*3 ( <i>m2</i> )	*2B ( <i>m1</i> + <i>m2</i> )*2C ( <i>m2</i> )
Αφρο-Αμερικανικό ειδικό αλληλόμορφο, ιντρόνιο 7	5639 T →C	<i>m3</i>	*3	*4	*3
<i>Thr</i> → <i>Asn</i> , εξόνιο 7, κωδικόνιο 461	4887 C →A	<i>m4</i>	*4	*5	*4

Εντοπίστηκε επίσης ένα τρίτο αλληλόμορφο μοναδικό για τον Αφρο-Αμερικάνικο πληθυσμό στο 7ο ιντρόνιο. Προκύπτει από αντικατάσταση T από C στη θέση 5639. Το 4ο αλληλόμορφο (πολυμορφισμός Thr/Asn) προκύπτει με αντικατάσταση C από A στη θέση 4887.

## Συσχέτιση πολυμορφισμών του *Cyp1A1* με προδιάθεση εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα

Η συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων του *Cyp1A1* και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα έχει εξεταστεί ήδη σε περισσότερες από 20 μελέτες σε αρκετούς διαφορετικούς πληθυσμούς (Πίν. 6). Σημειώνεται ότι αυτή είναι η πρώτη μελέτη της σχέσης του πολυμορφισμού MspI με τον καρκίνο του πνεύμονα σε δείγμα ελληνικού πληθυσμού.

Μελέτες σε Γιαπωνέζικους πληθυσμούς κατέδειξαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα τόσο για την m1 όσο και για την m2 μετάλλαξη (m1/m1: Καρκινικά **23,5%**/Φυσιολογικά **10,6%**, Kawajiri *et al.* (87), 1990).

Αυτά τα ευρήματα ωστόσο δεν επιβεβαιώθηκαν σε μελέτες που διεξήχθησαν σε βόρειες Ευρωπαϊκές χώρες όπως στη Νορβηγία (m1/m1: Καρκινικά **<1%**, Φυσιολογικά **<1%**, Tefre *et al.* (88), 1991), στη Σουηδία (m1/m1: Καρκινικά **1,3%**/Φυσιολογικά **0,3%**, Alexandrie *et al.* (96), 1994), καθώς και στις ΗΠΑ (m1/m1: Καρκινικά **1%**/Φυσιολογικά **1%**, Garcia Closas *et al.* (106), 1997), πιθανότατα λόγω της πολύ μικρότερης παρουσίας του m1 αλληλομόρφου στους Καυκάσιους.

Μεγαλύτερες μελέτες σε μεικτούς Αμερικάνικους πληθυσμούς πράγματι δείχνουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα σε φορείς των m1 αλληλομόρφων, ενώ σε Καυκάσιους καπνιστές στη Γαλλία, καμία σημαντική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε τόσο για το m1 όσο και για το m2 (m1/m1: Καρκινικά **0.7%**/Φυσιολογικά **0%**, Bouchardy *et al.* (108), 1997). Σε δύο Βραζιλιάνικους πληθυσμούς, η παρουσία του m2 αλληλομόρφου σχετιζόταν με προδιάθεση για καρκίνο σε ότι αφορά τον ετερόζυγο γενότυπο (m2/wt : Καρκινικά **27%**/Φυσιολογικά

14%, Sugimura *et al.* (99), 1995; Hamada *et al.* (100), 1995; Sugimura *et al.* (101), 1994). Η Αφρο-Αμερικάνικη μετάλλαξη m3 δεν έδειξε καμία συσχέτιση σε 3 μελέτες με εξαίρεση μία όπου παρατηρήθηκε αυξημένο

**Πίνακας 6:** Πολυμορφισμοί του Cyp1A1 και καρκίνος του πνεύμονα σε διάφορους πληθυσμούς

Αριθμός μελέτης	Γονίδιο	Μετάλλαξη/ Αλληλόμορφο	Τύπος Καρκίνου	Χώρα/ Εθνικότητα	Ασθενείς/ Controls	Γενот. Συχνότητες	Βιβλιογραφία
1	Cyp1A1	M1	SCC AC SCLC LCLC	Γιαπωνέζοι	68/104	M1/m1: 23,5/10.6 wt/wt:35.3/49.0	Kawajiri <i>et al.</i> (87), 1990
2	Cyp1A1	M1	SCC (80) SCLC (55) AC (46) LCLC (27)	Νορβηγοί	221/212	m1/m1: <1/<1 wt/wt: 77.8/78.8	Tefre <i>et al.</i> (88), 1991
3	Cyp1A1	M2	SCC (57) AC (37) SCLC (8)	Φινλανδοί	106/122	m2/m2: 0/1.6 wt/wt: 78.3/78.7	Hirvonen <i>et al.</i> (91), 1992; Hirvonen <i>et al.</i> (92), 1992 Hirvonen <i>et al.</i> (93), 1993
4	Cyp1A1	M1	SCC (107) AC (84) SCLC (58)	Σουηδοί	296/329	m1: m1/m1: 1.3/0.3 wt/wt: 83.8/83.9 m2: m2/m2: 0/0 wt/wt: 94.6/93.0	Alexandrie <i>et al.</i> (96), 1994
5	Cyp1A1	M1	SCC (29) AC (18) LCLC (4) SCLC (5)	A-A (28/23) και Καυκάσιοι- Αμερικάνοι (28/25)	56/48	m1/m1: 3.5/6.2 wt/wt: 76.8/68.8	Shields <i>et al.</i> (94), 1993
6	Cyp1A1	m3	LC	A-A	72/97	m3/m3: 1.4/2.1 wt/wt: 83.3/76.3	Kelsey <i>et al.</i> (97), 1994
7	CYP1A1	m1, m2	LC	Βραζιλιάνοι	110/112	m1: m1/m1: 8/8 wt/wt: 63/63 m2: m2/m2: 2/2 m2/wt: 27/14	Sugimura <i>et al.</i> (99), 1995; Hamada <i>et al.</i> (100),



						wt/wt: 71/84	1995; Sugimura <i>et al.</i> (101), 1994
8	CYP1A1	M1	AC (225) SSC (116) SCLC (18) LCLC (23)	Λευκοί Αμερικάνοι	412/442	m1/m1: 1.0/1.0 m1/wt: 18.0/16.3 wt/wt: 81.0/82.7	Garcia Closas <i>et al.</i> (106), 1997
9	CYP1A1	m1	AC (110) SSC (67)	Καυκάσιοι	207/283	m1/m1: 1.0/0.7 m1/wt: 16.9/17.0 wt/wt: 82.1/82.3	Xu <i>et al.</i> (105), 1996
10	CYP1A1	m1, m2		Καυκάσιοι (στη Γαλλία)	150/171	m1/m1: 0.7/0 m1/wt: 12.0/10.5 m1,m2/wt: 5.3/8.7 m1,m2/m1,m2: 1.3/0 wt/wt: 80.7/80.7	Bouchardy <i>et al.</i> (108), 1997
11	CYP1A1	m1, m2, m3	SCC (37) AC (41) LCLC (8) SCLC (7)	A-A	96/278	m1/m1: 6.2/6.0 m1/wt: 20.8/27.0 m1/m3: 5.2/3.6 m1/m2: 0/4.7 m1/m1,m2: 3.0/0.4 m1/m3,m3: 1.0/0 m1/m2,m3: 1.0/0 m2/m2: 1.0/0 m2/wt: 3.0/1.1 m3/m3: 0/0.4 m3/wt: 10.5/10.4 wt/wt: 47.9/46.4	Taioli <i>et al.</i> (110), 1998; Taioli <i>et al.</i> (111), 1995
12	CYP1A1	m1	SCC (57) AC (60) SCLC (24) LCLC (10)	Japanese	151/375	m1/m1: 21.2/10.6	Nakachi <i>et al.</i> (89), 1991
13	CYP1A1	M2	SCC (67) AC (96)	Japanese	212/358	m2/m2: 12.3/4.7 wt/wt: 56.6/65.1	Hayashi <i>et al.</i> (90), 1992



14	CYP1A1	m1, m2	AC (38) SCLC (18) SCC (14)	Chinese	76/122		Persson <i>et al.</i> (114), 1999
15	CYP1A1	m1, m2	SCC (27) SCLC (15) AC (28)	Korean	85/63	<i>m1: m1/m1:</i> <i>7/5 wt/wt:</i> <i>40/46 m2:</i> <i>m2/m2: 1/2</i> <i>m2/wt: 80/95</i> <i>wt/wt: 19/3</i>	Hong <i>et al.</i> (115), 1998

ρίσκο για αδενοκαρκίωμα σε φορείς. Μια μετάλλαξη που περιγράφηκε πρόσφατα, η m4 που ομοιάζει αρκετά στην m1 δεν έχει μέχρι στιγμής ενοχοποιηθεί για αυξημένο ρίσκο εμφάνισης καρκίνου στην μοναδική στατιστική μελέτη που έχει διενεργηθεί μέχρι σήμερα σε Καυκάσιους (m1/m1 : Καρκινικά **1%**/Φυσιολογικά **0,7%**, Xu *et al.* (105), 1996). Στους Κινέζους, τόσο η m1 όσο και η m2 μετάλλαξη δεν έδειξαν συσχέτιση με την εμφάνιση καρκίνου ενώ αποτελέσματα από την Κορέα έδειξαν παραδόξως μειωμένη προδιάθεση για καρκίνο του πνεύμονα ανάμεσα στους φορείς του m2 αλληλομόρφου (m2/wt Καρκινικά **80%**/Φυσιολογικά **95%**, Hong *et al.* (115), 1998 ).

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 1. Προέλευση δειγμάτων

Το βιολογικό υλικό της παρούσας πειραματικής εργασίας προήλθε από 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 και φυσιολογικού παρακειμένου 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 τη χρήση τους.

## 2. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε κατά την διενέργεια των πειραμάτων για την μελέτη του πολυμορφισμού του *Cyp1A1* γονιδίου ήταν ο εξής:

- Ανακινούμενο υδατόλουτρο
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος
- Φασματοφωτόμετρο
- Μικροπιπέτες ακριβείας

- Συσκευή PCR
- Αναδευτήρας (Vortex)
- Συσκευή θέρμανσης THERMOBLOC
- pH-μετρο
- Φούρνο μικροκυμάτων
- Κλίβανος αποστείρωσης
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης
- Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας με ψηφιακή φωτογράφιση

### 3. Χημικά αντιδραστήρια

Παρακάτω δίνονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς της πειραματικής εργασίας καθώς και αναφορά της ακριβούς σύστασής τους:

- *Διάλυμα χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1):* 24 ml χλωροφόρμιο  
1 ml ισοαμυλικής αλκοόλης  
Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- *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  
Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- *Διάλυμα φόρτωσης ηλεκτροφόρησης (Loading Buffer):* 0.25% Βρωμοφαινόλη  
0.25% Xylene cyanol  
40% Γλυκερόλη  
ddH<sub>2</sub>O  
Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την παρασκευή των απαραίτητων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν χημικά αντιδραστήρια της εταιρείας “Sigma Chemical Company”, ενώ το ένζυμο Taq DNA πολυμεράση προήλθε από την εταιρεία “Invitrogen<sup>TM</sup>”. Στις ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε μοριακός δείκτης ελέγχου 100 bp της εταιρείας “Invitrogen<sup>TM</sup>”.

## ΜΕΘΟΔΟΙ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είχε ως στόχο την ανεύρεση ορατών πολυμορφισμών του γονιδίου *Cyp1A1* τόσο σε καρκίνο του πνεύμονα, όσο και σε παρακείμενο, μακροσκοπικά υγιή ιστό. Αρχικά, απομονώθηκε DNA από ομογενοποιημένους ιστούς, καρκινικούς και φυσιολογικούς. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση του γενετικού υλικού και ενίσχυσή του με την μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR για τον έλεγχο των PCR προϊόντων και έπειτα πέψη τους με το ένζυμο περιορισμού Msp I. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης σε πηκτή αγαρόζης για τον έλεγχο της πέψης και την ανίχνευση πολυμορφισμών.

### Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ιστούς

Μετά τη συλλογή των ιστών ακολούθησε η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA με την χρήση οργανικών διαλυτών. Η όλη διαδικασία περιλάμβανε συνολικά 8 στάδια:

- i. Ομογενοποίηση των ιστών: για την ομογενοποίηση ιστών χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα ιγδία και υγρό άζωτο. Μετά την κονιορτοποίηση του ιστού, το δείγμα (20 mg ιστού) κάθε ασθενή τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα

- σωληνάρια Eppendorf και διατηρούνταν στο  $-70^{\circ}\text{C}$  μέχρι να χρησιμοποιηθεί για απομόνωση γονιδιωματικού DNA.
- ii. Λύση κυτταρικών μεμβρανών: για να διαλυθούν οι κυτταρικές και οι πυρηνικές μεμβράνες των κυττάρων, προστέθηκαν 500  $\mu\text{l}$  Ρυθμιστικού Διαλύματος Λύσης κυττάρων (lysis buffer) για 20 mg κονιορτοποιημένου ιστού. Στη συνέχεια προστέθηκαν 15  $\mu\text{l}$  Πρωτεϊνάσης K (20mg/ml) για την πρωτεόλυση των ιστονών του DNA. Ακολουθούσε επώαση των δειγμάτων στους  $55^{\circ}\text{C}$  για 3 ώρες.
  - iii. Απομάκρυνση πρωτεϊνών: μετά την διάσπαση των πρωτεϊνών ακολούθησε η εκχύλιση τους με προσθήκη σε κάθε δείγμα ίσου όγκου (500  $\mu\text{l}$ ) ουδέτερης φαινόλης (pH 8.0) εξισορροπημένης με 0.1 M Tris.HCl Τα δείγματα στη συνέχεια αναδεύονταν ήπια στον αναδευτήρα για 5 λεπτά, και ακολούθως φυγοκεντρώνταν σε 12500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου  $4^{\circ}\text{C}$ .
  - iv. Ολοκληρωτική απομάκρυνση πρωτεϊνών: μετά τη φυγοκέντρωση σχηματίζονταν δύο διακριτές φάσεις, απ' όπου λαμβάνονταν η υπερκείμενη στιβάδα (υδατική φάση) και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf (100-1000  $\mu\text{l}$ ). Με την προσθήκη 250  $\mu\text{l}$  ουδέτερης φαινόλης (pH 8.0) εξισορροπημένης με 1M Tris.HCl (pH 8), και 250  $\mu\text{l}$  διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) σε κάθε δείγμα, πραγματοποιούνταν η ολοκληρωτική απομάκρυνση των πρωτεϊνών. Ακολουθούσε ήπια ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 12500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου  $4^{\circ}\text{C}$ .
  - v. Απομάκρυνση φαινόλης: μετά την φυγοκέντρωση σχηματίζονται δυο διακριτές φάσεις, εκ των οποίων λαμβάνονταν η υπερκείμενη στοιβάδα (υδατική φάση) και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf (100-1000  $\mu\text{l}$ ). Για την απομάκρυνση της φαινόλης από τα δείγματα ακολουθούσε προσθήκη 500  $\mu\text{l}$  διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) σε κάθε δείγμα. Τα δείγματα στη συνέχεια αναδεύονταν ήπια στον αναδευτήρα για 5 λεπτά και ακολούθως φυγοκεντρώνταν στις 12500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου  $4^{\circ}\text{C}$ .
  - vi. Απομάκρυνση υπολειμμάτων φαινόλης: Επανάληψη του 5<sup>ου</sup> σταδίου ώστε να απομακρυνθεί εντελώς η φαινόλη.

- vii. Κατακρήμνιση DNA: μετά τη φυγοκέντρηση σχηματίζονταν δύο διακριτές φάσεις, απ' όπου λαμβάνονταν η υπερκείμενη στοιβάδα (υδατική φάση) και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf (100-1000 μl). Ακολουθούσε προσθήκη διπλάσιου όγκου (1000μl) παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (100%) σε κάθε δείγμα με σκοπό την αφυδάτωση και κατακρήμνιση του DNA. Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύονταν ήπια στο ρότορα για 5 λεπτά, και ακολούθως φυγοκεντρώνονταν στις 6000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4 °C. Μετά την φυγοκέντρηση είχαμε κατακρήμνιση του DNA, το οποίο σχημάτιζε ένα άσπρο “κουβάρι” στον πάτο των σωληνάρων. Με προσεκτική απόχυση της αιθανόλης έμενε στο σωληνάριο μόνο το DNA, το οποίο ξεπλενόταν με 500 μl αιθανόλης 70%, αναδεύονταν ήπια στον αναδευτήρα για 5 λεπτά, και απομονώνονταν με απόχυση της υπερκείμενης αιθανόλης και στέγνωμα στον αέρα.
- viii. 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 φυγοκέντρωση, 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 σωληνάκια 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 φυγοκέντρωση σε 2500 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία φυγόκεντρου 4 °C.
- **Καθαρισμός λευκών αιμοσφαιρίων:** Μετά την παραπάνω φυγοκέντρωση, 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 φυγοκέντρωση των δειγμάτων σε 2500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία φυγόκεντρου 4 °C.
- **Λύση κυτταρικών μεμβρανών και πρωτεόλυση ιστονών:** Έπειτα από την παραπάνω φυγοκέντρωση 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 πρωτεϊνάσης 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 επωάσεις των PCR αντιδράσεων (Brown TA, 1995).

Κάθε αντίδραση PCR (κύκλος PCR) περιλαμβάνει 3 στάδια <sup>(1)</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) (Tris.HCl, EDTA), ακολούθησε ποσοτικός των δειγμάτων με τη μέθοδο της φωτομέτρησης. 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 4 μl DNA σε 996 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.

## Ενίσχυση των δειγμάτων DNA με τη μέθοδο της PCR

Για την ενίσχυση του γονιδίου *Cyp11A1* χρησιμοποιήθηκαν 200-400 ng γονιδιωματικού DNA.

Κάθε σωληνάκι PCR είχε τελικό όγκο 50  $\mu$ l και αναλυτικά περιείχε τα εξής:

Διάλυμα	Όγκος
10x PCR Buffer Cτελ 1x	5 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub> Cτελ 1,5 mM	4 $\mu$ l
25 mM dNTPs Cτελ 0,2mM	0,4 $\mu$ l
Sense Primer (100 pmol/ $\mu$ l)	0,35 $\mu$ l
Antisense Primer (100 pmol/ $\mu$ l)	0,35 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	38,6 $\mu$ l
1,5 U Taq DNA polymerase	0,3 $\mu$ l
200 ng DNA	~ 1 $\mu$ l
Σύνολο	50 $\mu$ l

Το ζεύγος εκκινητών είχε τις παρακάτω νουκλεοτιδικές αλληλουχίες:

forward primer : 5' – CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT – 3'

reverse primer : 5' – TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT – 3'

Οι αντιδράσεις τοποθετήθηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf PCR Machine) για την διεξαγωγή των αντιδράσεων ενίσχυσης του γενετικού υλικού. Το αναμενόμενο PCR προϊόν είχε μέγεθος 340 bp. Οι συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας του κυκλοποιητή αναφέρονται παρακάτω.

1. Μετουσίωση (Denaturation): 95 °C για 3 min
2. Μετουσίωση (Denaturation): 95 °C για 45 sec
3. Σύνδεση εκκινητών (Annealing): 57 °C για 1 min
4. Σύνθεση νέου DNA (Extension): 72 °C για 1 min
5. Επιστροφή στο βήμα 3 και επανάληψη 30 κύκλων.
6. Διακοπή δράσης ενζύμου: 72 °C για 5 min

Μετά την διενέργεια των 30 κύκλων τα δείγματα φυλάσσονταν στους 4° C μέχρι την χρησιμοποίησή τους.

## Έλεγχος PCR προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε έλεγχο με τη μέθοδο της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 2% σε TBE. Οι ηλεκτροφορήσεις διεξήχθησαν υπό τάση ~80 V και ένταση ρεύματος ~110 mA και διαρκούσαν γύρω στα 25 λεπτά.

Σε κάθε ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνταν 12 μl PCR δείγματος το οποίο αναμειγνυόταν με 3 μl κατάλληλου διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer). Μετά την φόρτωση όλων των προϊόντων στο πήκτωμα, ακολουθούσε προσθήκη (5μl) και του κατάλληλου δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder) για τον προσδιορισμό του μεγέθους των PCR προϊόντων. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αγαρόζης μεταφέρονταν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (2UVTM Transilluminator) για την ανάγνωση, τη φωτογράφιση και την εκτύπωση των αποτελεσμάτων.

## Πέψη των PCR προϊόντων με το ένζυμο περιορισμού MspI

Τα PCR προϊόντα με το πέρας της ηλεκτροφόρησης φυλάσσονταν στους 4° C μέχρι την χρήση τους για την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο MspI I. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη και οι ποσότητες τους για κάθε σωληνάριο αντίδρασης αναφέρονται παρακάτω :

Διάλυμα	Όγκος
Προϊόν PCR	10 μl
Ρυθμιστικό δ/μα NEB (2)	2 μl
MspI	0,5 μl
dd H <sub>2</sub> O	7,5 μl
Σύνολο	20 μl

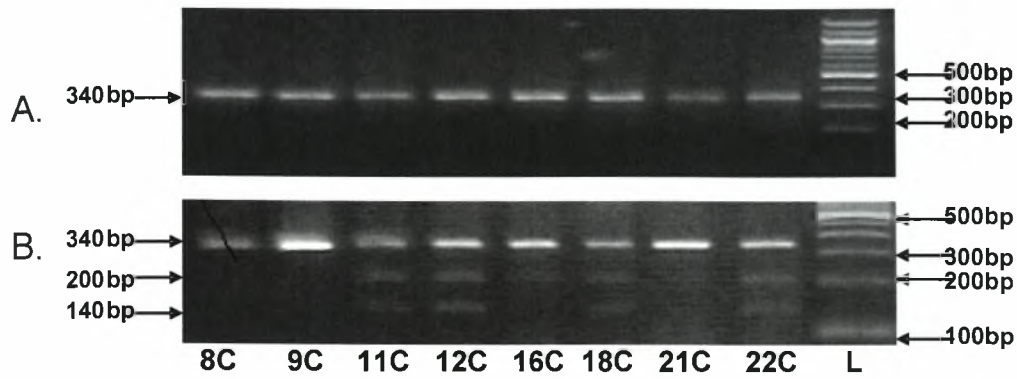
Ακολουθούσε επώαση των δειγμάτων στους 37° C για 2 ώρες σε υδατόλουτρο για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της ενζυματικής πέψης. Με το πέρας της επώασης τα δείγματα μεταφέρονταν για νέα ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης υψηλής ηλεκτροφορητικής ανάλυσης 3% με στόχο τον έλεγχο για ανίχνευση ορατών πολυμορφισμών. Η συνθήκες της ηλεκτροφόρησης ήταν οι ίδιες με αυτές της ηλεκτροφόρησης των PCR προϊόντων με τη διαφορά ότι στην περίπτωση αυτή γίνονται ηλεκτροφορήσεις όλης της αντίδρασης των προϊόντων επώασης (20 μl) τα οποία αναμειγνύονταν με 5 μl διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μελέτη της ύπαρξης του πολυμορφισμού MspI πραγματοποιήθηκε σε 44 δείγματα με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) και σε 46 φυσιολογικά δείγματα (μάρτυρες) με τη μέθοδο της PCR.

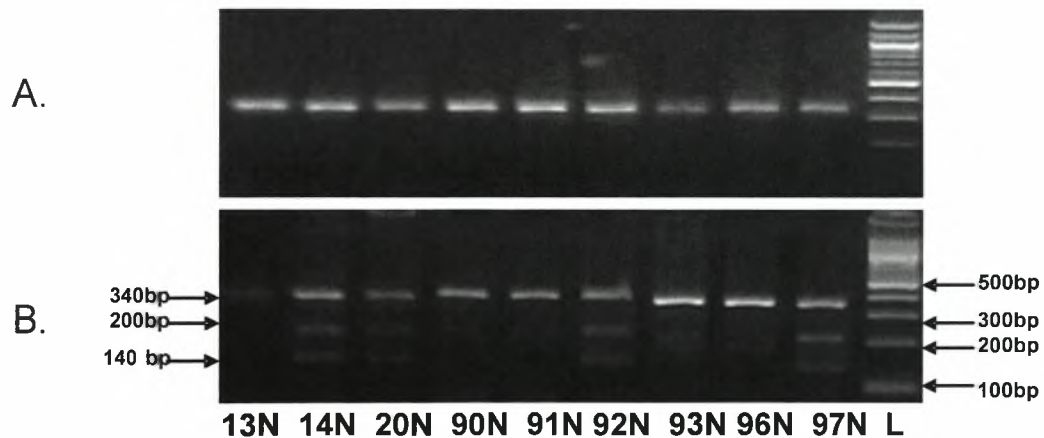
Σε ότι αφορά την ενίσχυση του γονιδίου Cyp1A1 με PCR περιμένουμε την εμφάνιση, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, ενός τμήματος DNA μεγέθους 340 bp. Μετά την πέψη του παραπάνω προϊόντος της PCR με το περιοριστικό ένζυμο MspI, τα αναμενόμενα τμήματα DNA είναι: α) Ομόζυγο αγρίου τύπου (wt/wt): 340 bp β) Ετερόζυγο για το αλληλόμορφο m1 (wt/m1) : 340 bp, 200 bp, 140 bp και γ) Ομόζυγο για το αλληλόμορφο m1 (m1/m1) : 200 bp και 140 bp

Στην παρούσα εργασία χαρακτηρίσαμε ως +/+ τις περιπτώσεις ομοζυγωτίας για το φυσιολογικό αλληλόμορφο +/- τις περιπτώσεις ετεροζυγωτίας και -/- την ομοζυγωτία για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Χαρακτηριστικές εικόνες PCR ενισχύσεων του γονιδίου Cyp1A1 τόσο σε καρκινικά δείγματα όσο και σε φυσιολογικά παρατηρούμε στις Εικ. 7 και 8.



A= PCR προϊόντα, B= προϊόντα πέψης

**Εικόνα 7:** Αντιπροσωπευτική εικόνα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR από δείγματα ατόμων με καρκίνο του πνεύμονα έπειτα από ενίσχυση του γονιδίου Cyp1A1 (A) και μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο MspI (B). C (καρκινικό δείγμα), L(ladder 100bp).



A= PCR προϊόντα, B= προϊόντα πέψης

**Εικόνα 8:** Αντιπροσωπευτική εικόνα ηλεκτροφόρησης PCR προϊόντων από δείγματα υγιών ατόμων έπειτα από ενίσχυση του γονιδίου Cyp1A1 (A) και μετά από επώαση με MspI (B). N (υγιές), L(ladder 100bp).

**Πίνακας 7:** Συγκεντρωτική παρουσίαση αποτελεσμάτων ανάλυσης 44 καρκινικών δειγμάτων για τον πολυμορφισμό MspI

Δείγματα ασθενών από καρκίνο πνεύμονα					Πολυμορφισμός MspI
Αρ.	Κάπνισμα (pack per years)	Φύλο	Ηλικία	Τυπος καρκίνου δείγματος	Γενότυποι
1C	-	M	58	Squamous GII	+/+
2C	-	F	58	Adeno	+/+
3C	>100	M	71	Adeno	+/+
4C	?	M	60	Squamous GIII	+/+
5C	>100	M	62	Squamous GIII	+/-
6C	40	M	66	Adeno	+/-
7C	55	M	75	Squamous GIII	+/-
8C	100	M	70	Adeno	+/+
9C	80	M	59	NSCLC	+/+
10C	45	M	51	Squamous GIII	+/-
11C	-	M	63	Adeno	+/+
12C	80	M	57	Squamous GII	+/-
13C	-	M	68	Adeno	+/-
14C	80	M	70	Adeno GII	+/+
15C	-	M	56	Adeno	+/-
16C	25	M	45	NSCLC GII	+/+
17C	50	M	65	Adeno	+/-
18C	-	M	67	Adeno GIII	+/+
19C	-	F	63	Adeno GII	+/+
20C	40	F	60	Squamous GII	+/+
21C	-	M	54	Adeno GII	+/+
22C	100	M	54	Adeno	+/+
23C	-	M	67	Adeno	+/+
24C	-	M	26	Lymphoblastic lymph.	+/-
25C	120	M	60	Squamous GIII	+/+
26C	120	M	69	Adeno GII	+/+
27C	40	M	64	Squamous GII	+/+
28C	120	M	51	Squamous GIII	+/+
29C	-	F	44	Squamous GIII	+/+
30C	-	F	72	Adeno	+/-
31C	-	F		Sarcoma	+/+
32C	-				+/+
33C	60	M	69	Squamous GIII, anthrakosis	+/+
34C	-	F	41	Ca thyroid+mediastinum	+/+
35C	-	M	-	-	+/+
36C	?	M	?	?	+/-
37C	?	?	?	?	+/+
38C	-	M	50	Squamous II	+/+
39C	-	M	-	Adeno III	+/+
40C	-	M	70	Adeno III	+/+
41C	-	M	61	Squamous III	+/+
42C	-	M	66	Squamous II	+/+
43C	-	M	64	Adeno II	+/+
44C	-	M		Adeno II-III	+/+



Αναλύοντας τα δεδομένα του Πίν. 7 παρατηρούμε ότι από τα 44 άτομα με καρκίνο του πνεύμονα τα 11 είναι ετερόζυγα για το αλληλόμορφο m1 (wt/m1, 25%) ενώ τα υπόλοιπα 33 είναι ομόζυγα άγριου τύπου (wt/wt, 75%). Κανένα από τα δείγματα δεν παρουσιάζει το -/- (m1/m1) γενότυπο.

**Πίνακας 8:** Συγκεντρωτική παρουσίαση αποτελεσμάτων ανάλυσης 46 φυσιολογικών δειγμάτων για τον πολυμορφισμό MspI

<b>Δείγματα υγιών ατόμων</b>	<b>ΓΕΝΟΤΥΠΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ MspI</b>
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	+/+
30N	+/+
31N	+/+
32N	+/-
33N	+/+
34N	+/-
35N	+/-
36N	+/+
37N	+/+



38N	+/+
39N	+/-
40N	+/-
41N	+/+
42N	+/+
43N	+/-
44N	+/+
45N	+/+
46N	+/-

Αναλύοντας τα δεδομένα του Πίν. 8 παρατηρούμε ότι από τα 46 φυσιολογικά άτομα τα 12 παρουσιάζουν ετερόζυγο γενότυπο (wt/m1, 26%). Ο ομόζυγος άγριος γενότυπος είναι παρών σε ποσοστό 74%. Κανένα από τα φυσιολογικά δείγματα δεν παρουσιάζει το -/- (m1/m1) γενότυπο.

Μελετώντας συγκριτικά τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τους πίνακες παρατηρούμε ότι ο ετερόζυγος γενότυπος wt/m1 εμφανίζεται στα 11/44 (25%) δείγματα των πασχόντων από καρκίνο του πνεύμονα σε αντίθεση με τα 12/46 (26%) 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 δεν είναι στατιστικά σημαντική ( $0,02 < p < 0,05$ ).

Στη συνέχεια ακολούθησε ομαδοποίηση των δειγμάτων ανάλογα με την ηλικία εμφάνισης του καρκίνου σε δύο ομάδες (**ομάδα 1** : ασθενείς με ηλικία <60 ετών και **ομάδα 2**: ασθενείς με ηλικία  $\geq 60$  ετών). Βρέθηκε λοιπόν ότι στην ομάδα 1 ο ετερόζυγος γενότυπος είναι παρών σε ποσοστό 28,5% ενώ σε όλη την ομάδα δύο σε ποσοστό 25%. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν δίνει στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

Αλλάζοντας τα κριτήρια ομαδοποίησης και επιλέγοντας ως κριτήριο διαχωρισμού το φύλο τα δείγματα ταξινομήθηκαν εκ νέου σε δύο ομάδες (**ομάδα 3**: άνδρες ασθενείς και **ομάδα 4**: γυναίκες ασθενείς). Ο ετερόζυγος γενότυπος βρέθηκε να είναι

παρών σε ποσοστό 28% στην ομάδα 3 ενώ στην ομάδα 4 σε ποσοστό 14%. Η διαφορά που παρατηρείται είναι στατιστικά σημαντική όπως αποδεικνύεται με τη χρήση του κριτηρίου  $\chi^2$ .

Με κριτήριο τον τύπο καρκίνου των ασθενών έγινε διαχωρισμός ξανά σε δύο ομάδες (**ομάδα 5:** ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα και **ομάδα 6:** ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα). Ο γενότυπος wt/m1 εδώ βρέθηκε σε ποσοστό 26,3% στην ομάδα 5 ενώ στην ομάδα 6 το ποσοστό ήταν 26,6%. Η διαφορά όπως αναμένεται δεν είναι στατιστικά σημαντική (κριτήριο  $\chi^2$ ,  $0,02 < p < 0,05$ ).

Τέλος η μελέτη της συχνότητας εμφάνισης των διαφόρων γενοτύπων του πολυμορφισμού MspI σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα συγκριτικά με τις συνήθειες καπνίσματος των ασθενών δεν ήταν εφικτή λόγω της έλλειψης στοιχείων για ένα σημαντικό μέρος των δειγμάτων.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν ασχοληθεί με την διερεύνηση του ρόλου που παίζουν ορισμένοι πολυμορφισμοί γονιδίων που κωδικοποιούν αποτοξινωτικά ένζυμα όπως το CYP1A1, στην εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα. Τα αποτελέσματα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία σχετικά με την σχέση του MspI πολυμορφισμού στο γονίδιο *Cyp1A1* και την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα είναι θετικά μόνο σε ορισμένες φυλές/ομάδες πληθυσμού όπως στους Ασιατικούς πληθυσμούς ενώ σε άλλες όπως στους Καυκάσιους είναι αρνητικές. Αξίζει να σημειωθεί ότι η εκπόνηση της παρούσας εργασίας αποτελεί μια από τις πρώτες προσπάθειες χαρτογράφησης των πολυμορφισμών του *Cyp1A1* και των πιθανών επιπτώσεων τους σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα στον ελληνικό πληθυσμό.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν 44 δείγματα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και 46 φυσιολογικά. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν την παρουσία του αλληλομόρφου m1 σε ετεροζυγωτία (wt/m1) σε ποσοστό 25% (11/44) των δειγμάτων καρκίνου του πνεύμονα που εξετάστηκαν σε σχέση με την συχνότητα εμφάνισης του στα φυσιολογικά άτομα που ήταν 26% (12/46). Η διαφορά αυτή είναι δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική οπότε συμπεραίνουμε ότι ο ετερόζυγος

γενότυπος δεν αυξάνει τις πιθανότητες στα άτομα που τον φέρουν να αναπτύξουν διάφορες μορφές καρκίνου του πνεύμονα όπως προκύπτει από τη μελέτη αυτού του τμήματος ελληνικού πληθυσμού. Παρόμοια αποτελέσματα συναντούμε στη βιβλιογραφία σε αρκετούς διαφορετικούς πληθυσμούς μεταξύ των οποίων και στους Καυκάσιους (m1/wt: Καρκινικά **18.0%**/Φυσιολογικά **16.3%** και Καρκινικά **16,9%**/Φυσιολογικά **17.0%**, Garcia Closas *et al.* (106), 1997, Xu *et al.* (105), 1996 αντίστοιχα)

Πρέπει εδώ να αναφερθεί ότι στις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές τονίζεται περισσότερο η σημασία της επίπτωσης του ομόζυγου μεταλλαγμένου γενότυπου (m1/m1) στους διάφορους πληθυσμούς. Επειδή όμως η συχνότητα εμφάνισης του εν λόγω γενότυπου στους Καυκάσιους είναι σπάνια, λόγω σπανιότητας του αλληλομόρφου, η προσπάθεια συσχέτισης του με την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα στην παρούσα εργασία δεν είναι εφικτή. Σε κανένα δείγμα τόσο για τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα όσο και για τους φυσιολογικούς δεν παρατηρείται ο γενότυπος -/- (m1/m1). Τα ίδια παρατηρούμε και στη βιβλιογραφία από τη μελέτη των Βόρειων Ευρωπαϊκών πληθυσμών (m1/m1 : Καρκινικά **1,3%**/Φυσιολογικά **0,3%**, Alexandrie *et al.* (96), 1994) και (m1/m1: Καρκινικά **<1%**/Φυσιολογικά **<1%**, Tefre *et al.* (88), 1991) αλλά και των Αμερικάνικων (m1/m1 : Καρκινικά **1.0%**/Φυσιολογικά **1,0%** Garcia Closas *et al.* (106), 1997) και Μεικτών Καυκάσιων πληθυσμών (m1/m1 : Καρκινικά **1.0%**/Φυσιολογικά **0,7%**, Xu *et al.* (105) 1996).

Σε ότι αφορά την συσχέτιση του πολυμορφισμού MspI με το φύλο, την ηλικία, τον τύπο καρκίνου και τα ποσοστά καπνίσματος οι έρευνες που διεξήχθησαν σε πληθυσμούς με ίδια φυλετικά χαρακτηριστικά με τον ελληνικό δεν έδειξαν διαφορές που να υποστηρίζουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, με εξαίρεση κάποιες που αναφέρουν θετική συσχέτιση σε ότι αφορά τους ελαφρείς καπνιστές (Ishibe *et al.*, 1997).

Στην παρούσα εργασία δε βρέθηκε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα στην περίπτωση της συσχέτισης με ηλικία και τύπο καρκίνου. Παρουσιάστηκε όμως μια σημαντική διαφορά στην περίπτωση του φύλου. Οι άνδρες ασθενείς παρουσιάζουν τον ετερόζυγο γενότυπο σε ποσοστό 28% έναντι 14% για τις γυναίκες. Το εύρημα αυτό είναι σημαντικό ωστόσο θα πρέπει να υπάρχει επιφύλαξη λόγω του μικρού αριθμού γυναικείων καρκινικών δειγμάτων. Μελλοντικές έρευνες στον ελληνικό πληθυσμό θα μπορούσαν να διασαφηνίσουν το ρόλο του φύλου στην παρουσία των

μεταλλαγμένου αλληλομόρφου m1 με μελέτη περισσότερων δειγμάτων καρκίνου του πνεύμονα από Ελληνίδες.

Τέλος, για την συχνότητα καπνίσματος των ασθενών υπήρξαν ελλιπή στοιχεία κάτι που καθιστά δύσκολη την στατιστική έρευνα και συσχέτιση με τον πολυμορφισμό MspI. Από τους 6 ετεροζυγώτες ασθενείς για τους οποίους υπάρχουν στοιχεία όμως οι 5 είχαν σχετικά μικρά ποσοστά pack per years (<80) ενώ μόλις 1 ήταν βαρύς καπνιστής με αριθμό pack per years 100. Το γεγονός αυτό είναι μια ένδειξη για την σχέση των ελαφρών καπνιστών με τον πολυμορφισμό MspI όπως δείχνουν κάποιες έρευνες σε Καυκάσιους και μη-Καυκάσιους πληθυσμούς (Ishibe et al, 1997).

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση του m1 αλληλομόρφου με τον καρκίνο του πνεύμονα στον Ελληνικό πληθυσμό.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ-REFERENCES

Alberg Anthony J. PhD, MPH and Jonathan M. Samet, MD, MS (2003),  
Epidemiology of Lung Cancer, Chest. © 2003;123:21S-49S.)

Alexandrov K, Cascorbi I, Rojas M, Bouvier G, Kriek E, Bartsch H (2002). CYP1A1  
and GSTM1 genotypes affect benzo[a]pyrene DNA adducts in smokers' lung:  
comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation. Carcinogenesis 1969-77

Bartsch Helmut, Urmila Nair, Angela Risch, Margarita Rojas, Harriet Wikman and  
Kroum Alexandrov (2000). Genetic Polymorphism of CYP Genes, Alone or in  
Combination, as a Risk Modifier of Tobacco-related Cancers. Cancer Epidemiology  
Biomarkers & Prevention Vol. 9, 3-28

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

Cauchi S, Stucker I, Solas C, Laurent-Puig P, Cenee S, Hemon D, Jacquet M,  
Kremers P, Beaune P, Massaad-Massade L (2001). Polymorphisms of human aryl  
hydrocarbon receptor (AhR) gene in a French population: relationship with CYP1A1  
inducibility and lung cancer Carcinogenesis 1819-24

Chu Yi-Wen (1997). Selection of invasive and metastatic subpopulations from a  
human lung adenocarcinoma cell line. *Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol.*) Vol. 17, No  
3

Cooper G. M.: The Cell- A molecular approach, 2nd Edition, Sinauer Associates Inc.,  
Sunderland, (2000).

DeAnn J. Liska, Ph.D. *Alternative Medicine Review* 1998 (Jun) ; 3(3) : 187-198

Demir A, Altin S, Demir I, Koksal V, Cetincelic U, Dincer T (2005). The role of CYP1A1 Msp1 gene polymorphisms on lung cancer development in Turkey. *Tuberk Toraks.* ;53(1):5-9

Dialyna IA, Miyakis S, Georgatou N, Spandidos DA. (2003). Genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer risk. *Oncol. Rep* 10(6):1829-35

Hung RJ, Boffetta P, Brockmoller J, Butkiewicz D, Cascorbi I, Clapper ML, Garte S, Haugen A, Hirvonen A, Antilla S, Kalina I, Le Marchand L, London SJ, Rannug A, Romkes M, Salagovic J, Shoket R, Gaspari L, Taioli C (2003). CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis. *Carcinogenesis.* 875-82

Iannuzzi Michael C, Mary Maliarik and Benjamin Rybicki (2002). Genetic polymorphisms in lung disease: bandwagon or breakthrough? *Respiratory Research* 3:15

Ingelman-Sundberg Magnus, Mikael Oscarson, Ann K. Daly, Seymour Garte and Daniel W. Nebert (2001) Human Cytochrome P-450 (CYP) Genes *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* Vol. 10, 1307-1308

Jafri N, R. Salgia (2004) Biology and novel therapeutics for neuroendocrine tumors of the lung. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*

Kufe et al (2003): *Cancer Medicine*, 6th Edition, Frei III, Emil, editors, BC Decker Inc., Canada

Lewin Benjamin, *Genes VIII* © 2004, Pearson Education, Inc

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

Meyerson M., (2000). Role of Telomerase in Normal and Cancer Cells *Journal of Clinical Oncology*, Vol 18, Issue 13, 2626-2634.

Ribeiro R. et al. (2006). A functional polymorphism in the promoter region of leptin gene increases susceptibility for non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*, 42, 8, 1188-1193.

Schiller J. H., D. Harrington, CP. Belani (2002). Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer. *New Engl. J. Med*; 346: 92-98.

Sekido Y, KM. Fong, JD Minna (1998). Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim. Biophys. Acta*; 1378:21-59.

Smith GB, Harper PA, Wong JM, Lam MS, Reid KR, Petsikas D, Massey TE (2001). Human lung microsomal cytochrome P4501A1 (CYP1A1) activities: impact of smoking status and CYP1A1, aryl hydrocarbon receptor, and glutathione S-transferase M1 genetic polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 839-53

Taioli E, Gaspari L, Benhamou S, Boffetta P, Brockmoller J, Butkiewicz D, Cascorbi I, Clapper ML, Dolzan V, Haugen A, Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Kalina I, Kremers P, Le Marchand L, London S, Rannug A, Romkes M, Shoket B, Seidegard J, Strange RC, Stucker I, To-Figueras J, Garte S (2003). Polymorphisms in CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and lung cancer below the age of 45 years. *Int J Epidemiol*. 32(1):60-3

Thun J Michael MD Phyllis A. MS Wingo PhD MS Cancer Medicine, Section 4;  
Cancer Epidemiology, © 2003 BC Decker Inc.

Trichopoulos D. (1995). Risk of lung cancer and passive smoking. *Important Advances in Oncology*; 77-85.

Vaporciyan Ara A MD, Jonathan C. Nesbitt MD, JinSoo Lee MD, Craig Stevens MD, Ritsuko Komaki MD, Jack A. Roth MD (2003). Section 28; Neoplasms of the



Thorax; 88.Lung Cancer Cancer Medicine, 6th Edition, Frei III, Emil, editors, BC Decker Inc., Canada

Wenzlaff AS, Cote ML, Bock Ch, Land SJ, Santer Sl, Scwartz DR, Schwartz AC (2005). CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogenesis*. 26(12):2207-12. Epub 2005 Jul 28

Wu X, H. Zhao, R. Suk and D. Christiani (2004). Genetic susceptibility to tobacco-related cancer. *Oncogene* 23, 6500-6523.

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

Ishibe N, Wiencke JK, Zuo ZF, Mc Millan A, Spitz M, Kelsey KT (1997). Susceptibility to lung cancer in light smokers associated with CYP1A1 polymorphisms in Mexican- and African-Americans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6(12):1075-80

---

