

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**Οι πολυμορφισμοί της Ενδοθηλιακής
Συνθετάσης του Μονοξειδίου του Αζώτου
(eNOS) στον Καρκίνο του Μαστού**

**Μαρία Γραμματικού
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΚΗ
ΛΑΡΙΣΑ 2015**

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα

(νόμος 5443, άρθρο 202, παράγραφος 2)

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

1.Χρήστος Ν. Παπανδρέου.

Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

(επιβλέπων).

2.Ηλίας Ζιντζαράς

Καθηγητής Βιομαθηματικών – Βιομετρίας

3.Κωνσταντίνος Νταφόπουλος

Αν.Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1.Καθ Χ.Ν. Παπανδρέου

2.Καθ.Η. Ζιντζαράς

3. Αν. Καθ . Κων/νος Νταφόπουλος

4.Καθ. Φ. Τρυποσκιιάδης

5.Καθ. Λ. Σακκάς

6. Καθ. Ι.Στεφανίδης

7. Καθ. Ε. Αθανασίου

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

| | |
|--|-----------|
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 8 |
| ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ NOS | 12 |
| ΕΝΖΥΜΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ NOS | 13 |
| ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ NOS | 18 |
| ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ NO | 19 |
| ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ NO..... | 20 |
| ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ NOS | 21 |
| ΝΕΥΡΩΝΙΚΗ ΣΥΝΘΑΣΗ ΤΟΥ NO (nNOS) | 21 |
| ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ nNOS | 22 |
| nNOS και παθολογικές καταστάσεις | 24 |
| ΕΠΑΓΩΓΙΜΗ ΣΥΝΘΑΣΗ ΤΟΥ NO (iNOS) | 25 |
| ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ iNOS..... | 25 |
| iNOS και παθολογικές καταστάσεις | 26 |
| ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΣΥΝΘΑΣΗ ΤΟΥ NO (eNOS) | 27 |
| ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ eNOS | 27 |
| Άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις..... | 33 |
| Ορμόνες και eNOS | 34 |
| ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ eNOS..... | 36 |
| Αγγειοδιαστολή και αναστολή της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων. | 36 |
| Αναστολή της συσώρευσης των λευκοκυττάρων και αγγειακή φλεγμονή. | 37 |

| | |
|---|-----------|
| Έλεγχος στην διαφοροποίηση των λείων μυικών ινών. | 37 |
| Αγγειογένεση. | 38 |
| Ενεργοποίηση των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων. | 38 |
| Γονιδική θεραπεία με eNOS..... | 40 |
| eNOS ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ..... | 41 |
| Αθηροσκλήρυνση και θρομβώσεις..... | 42 |
| Υπέρταση. | 44 |
| Σακχαρώδης Διαβήτης. | 45 |
| Αυτοάνοσα νοσήματα. | 45 |
| eNOS, ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ | 47 |
| Δράσεις της eNOS στον καρκίνο. | 47 |
| eNOS σε διάφορες μορφές καρκίνου | 51 |
| Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας. | 53 |
| Καρκίνος του πνεύμονα. | 53 |
| Γαστρικός Καρκίνος. | 54 |
| Καρκίνος του Εγκεφάλου. | 56 |
| Καρκίνος Κεφαλής και Τραχήλου. | 56 |
| Καρκίνος του μαστού. | 57 |
| Επαγωγική καρκίνου vs ογκοκτόνος δράση του NO. | 60 |
| ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ | |
| ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ eNOS | 63 |
| G7894T (Glu298Asp), exon 7 (rs 1799983) πολυμορφισμός. | 65 |
| T786C, promoter (rs2070744) πολυμορφισμός..... | 65 |
| Intron 4, VNTR, b/a | 67 |

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ eNOS και ΝΟΣΗΜΑΤΑ

| | |
|---|-----------|
| ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ | 68 |
| Αρτηριακή Υπέρταση. | 68 |
| Έμφραγμα του μυοκαρδίου (MI)..... | 70 |
| Πνευμονικό Οίδημα. | 70 |
| ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ | 71 |
| ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΜΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ | 73 |
| ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ | 77 |
| Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ). | 77 |
| Νόσος Αδαμαντιάδη-Behcet. | 77 |
| Ρευματοειδή αρθρίτιδα. | 78 |
| ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ. | 81 |
| Προεκλαμψία..... | 81 |
| Επαναλαμβανόμενες απώλειες κυήματος. | 82 |
| ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ eNOS ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ..... | 84 |
| ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ | 84 |
| ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ | 86 |
| ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΣΤΟΜΑΧΟΥ | 87 |
| ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ | 88 |
| ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ | 89 |
| ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ | 90 |
| ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ | 91 |
| ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ..... | 92 |

B.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

| | |
|--|------------|
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 98 |
| ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ | 98 |
| ΜΕΘΟΔΟΣ | 100 |
| G7894T (Glu298Asp) πολυμορφισμός | 101 |
| Intron 4, VNTR, b/a πολυμορφισμός | 102 |
| ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ | |
| ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ | 104 |
| ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ | 104 |
| ΕΞΑΓΩΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ | 105 |
| ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ | 106 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ | 110 |
| . ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ | 110 |
| . ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 113 |
| Για τον πολυμορφισμό G894T | 113 |
| Για το πολυμορφισμό 4b/a | 115 |
| Για τον πολυμορφισμό T786C | 115 |
| Πιθανά bias | 115 |
| ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 117 |
| ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ..... | 118 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 124 |

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνή μορφή καρκίνου στον κόσμο και αποτελεί ένα σημαντικότατο πρόβλημα στο τομέα της δημόσιας υγείας. Περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις εμφάνισης του παρατηρούνται σε βιομηχανικές περιοχές κυρίως Ευρώπης και Βόρειας Αμερικής.

Ο μηχανισμός εμφάνισης του καρκίνου του μαστού είναι εν πολλοίς άγνωστος. Αυτό που αποτελεί την γενικότερη αντίληψη είναι ότι υπάρχει ένας συνδυασμός περιβαλλοντικών παραγόντων (ατμόσφαιρα, ρύπανση, διατροφή) που δρουν πάνω σε ορισμένα άτομα που θεωρούνται ότι έχουν κάποια γενετική προδιάθεση. Πάνω σε αυτή την τελευταία παρατήρηση έχει γίνει ένας τεράστιος αριθμός μελετών στην προσπάθεια ανίχνευσης γονιδίων και μεταλλάξεων αυτών που μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πορεία της καρκινογένεσης. Ένα από αυτά τα γονίδια που μελετώνται όλο και πιο έντονα τα τελευταία χρόνια σε διάφορες μορφές καρκίνου είναι και το γονίδιο της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS).

Το NO έχει αποδειχθεί ένα σημαντικό βιομόριο το οποίο συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, όπως την νευροδιαβίβαση, την ρύθμιση της αγγειοδιαστολής, την αγγειογένεση. Παράγεται από ένα ένζυμο το NOS, το οποίο απαντάει σε τρεις ισομορφές στα διάφορα κύτταρα του οργανισμού μας. Το μόριο αυτό φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στα αρχικά όσο και στα μεταγενέστερα στάδια των διαφόρων μορφών καρκίνου, ενώ η σημαντικότερη ισομορφή του ενζύμου NOS που έχει μελετηθεί και έχει ενδιαφέρον είναι η αυτή που παράγεται από το ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων (eNOS).

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους μπορεί να προσεγγίσει κανείς πειραματικά τον ρόλο του NO και του eNOS στην καρκινογένεση. Ένας από αυτούς είναι και η μελέτη των πολυμορφισμών του γονιδίου του επάγει την σύνθεση του, δηλαδή του eNOS. Εάν ανατρέξει κανείς στην βάση δεδομένων της GenBank dbSNP, μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πάνω από 200 πολυμορφισμοί του γονιδίου αυτού. Αντίθετα οι πολυμορφισμοί που φαίνεται να έχουν ταυτόχρονα και σημαντικό ρόλο στην κλινική πράξη (καθώς επηρεάζουν την μετάφραση, μεταγραφή ή γενικά την βιοδιαθεσιμότητα του μορίου) είναι ελάχιστοι, με τους ερευνητές να έχουν εστιάσει την προσοχή τους κυρίως σε τρεις από αυτούς. Αυτοί έχουν μελετηθεί σε πάρα πολλές μορφές καρκίνου (προστάτη, ωθηκών, παχέως εντέρου κα.) καθώς και σε πλήθος άλλων παθολογικών καταστάσεων. Αντίθετα οι βιβλιογραφικές αναφορές πάνω στην μελέτη των πολυμορφισμών του eNOS σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού είναι περιορισμένες.

Στην παρούσα μελέτη ελέγχθησαν ασθενείς με καρκίνο του μαστού για την παρουσία δυο πολυμορφισμών του γονιδίου της eNOS. Πιο αναλυτικά στο γενικό μέρος περιγράφεται εν συντομία : Η βιοχημική υπόσταση του NOS, η βιολογική σημασία των διαφόρων μορφών του και η τρόπος με τον οποίο γίνεται η ρύθμιση της δράσης του. Εν συνεχεία αναφέρονται οι κυριότερες μελέτες που αφορούν την δράση του eNOS σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Τέλος περιγράφονται οι κυριότεροι πολυμορφισμοί που έχουν μελετηθεί στο γονίδιο αυτό στις διάφορες κατηγορίες νοσημάτων δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στις μελέτες που αφορούν ασθενείς με ογκολογικά προβλήματα.

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο τομέα Παθολογίας και την Ογκολογική κλινική καθώς και στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής και Κυτταρολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Για την εκπόνηση της υπήρξε πολύτιμη βοήθεια από πολλούς στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ Χ. Παπανδρέου για την υπόδειξη του θέματος, την καθοδήγηση και την πολυδιάστατη υποστήριξη που προσέφερε ώστε η διατριβή αυτή να ολοκληρωθεί. Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Καθ κ Η. Ζιντζαρά για τις συμβουλές του και την αμέριστη βοήθεια στην στατιστική επεξεργασία των δεδομένων καθώς και για τη πολύτιμη συμβολή του στη δημοσίευση αυτής της εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αν. Καθ. Κω/νο Νταφόπουλο καθώς και τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τον χρόνο που αφιέρωσαν για τη μελέτη αυτής της διατριβής. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλους τους Ιατρούς και το προσωπικό τόσο της Ογκολογικής Κλινικής όσο και του Εργαστηρίου της Παθολογικής Ανατομικής για την λεπτομερή καταγραφή των στοιχείων των φακέλων και την συλλογή των δειγμάτων καθώς και για την παρασκευή των ιστολογικών τομών, τους ιατρούς κ. Α. Πατρικίδου, Χ. Δοξάνη και Π. Βλαχοστέργιο, χωρίς τη συνδρομή όλων δεν θα ήταν δυνατή η εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣ

Το νιτρικό οξείδιο (nitric oxide- NO) είναι ένα μόριο-κλειδί για την αγγειοδιαστολή και την νευροδιαβίβαση σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά και εξαιρετικά κυτταροτοξικό μόριο σε υψηλές συγκεντρώσεις [1]. Πρωτοανακαλύφθηκε το 1980 ως ένα διαλυτό μόριο που παράγεται από το ενδοθήλιο των κυττάρων των αγγείων και έχει την ικανότητα να ελέγχει σημαντικές αγγειακές λειτουργίες όπως η διαστολή, ή διαπερατότητα των αγγείων και η προστασία από θρομβώσεις [2]. Το NO παράγεται από ένα ειδικό ένζυμο που ονομάζεται συνθάση του νιτρικού οξειδίου (NO synthase-NOS). Στους ζωικούς οργανισμούς υπάρχουν 3 διαφορετικές ισομορφές του NOS: η νευρωνική (neuronal-nNOS), η ενδοθηλιακή (endothelial-eNOS) και η inducible ισομορφή (inducible-iNOS) [3].

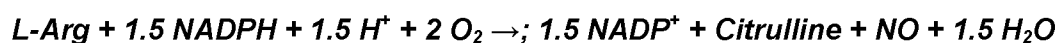
Στο ενδοθήλιο των αγγείων, το NO παράγεται από την eNOS των ενδοθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται στην εσωτερική επιφάνεια των αρτηριών, και ελέγχει την πίεση του αίματος [3]. Στα εγκεφαλικά κύτταρα, υπάρχει η nNOS και εδώ η παραγωγή NO είναι σημαντική για την μεταβίβαση του νευρωνικού μηνύματος. Επιπρόσθετα nNOS μπορεί να υπάρχει και στο περιφερικό νευρικό σύστημα αλλά και σε μυικούς ιστούς [3]. Τέλος, η iNOS ισομορφή υπάρχει στα μακροφάγα κύτταρα και εδώ η παραγωγή NO λειτουργεί ως αμυντικός-προστατευτικός μηχανισμό [4-5]. Σε γενικές γραμμές θα λέγαμε ότι οι ισομορφές eNOS και nNOS είναι αυτές που παράγονται με συνεχή τρόπο (constitutively expressed-cNOS) και που ελέγχουν τα επίπεδα του NO, με μηχανισμό ασβεστιο-εξαρτώμενο, ενώ η iNOS ισομορφή είναι ασβεστιο-ανεξάρτητη και εκφράζεται πάντοτε σε απόκριση στις παραγόμενες κυτταροκίνες ή παράγωγα των βακτηρίων.

Ένα εναλλακτικό μονοπάτι in vivo παραγωγής NO είναι η σύθεση του από ανόργανα ανιόντα (nitrate, nitrite). Υπό αυτό το πρίσμα, η δίαιτα πλούσια σε nitrate και nitrite σε διάφορες καρδιαγγειακές και άλλες παθήσεις φαίνεται ότι έχει ιδιαίτερη σημασία [6-7].

Η βιοδιαθεσιμότητα του NO είναι στενά συνδεδεμένη με τα επίπεδα του ενζύμου NOS. Υπέρμετρη βιοσύνθεση του NO από την NOS σχετίζεται με μεγάλο αριθμό παθολογικών καταστάσεων που κυρίως αφορούν διάφορες ισχαιμικές καταστάσεις, όπως το έμφραγμα, όπως επίσης και διάφορες μορφές καρκίνου [8].

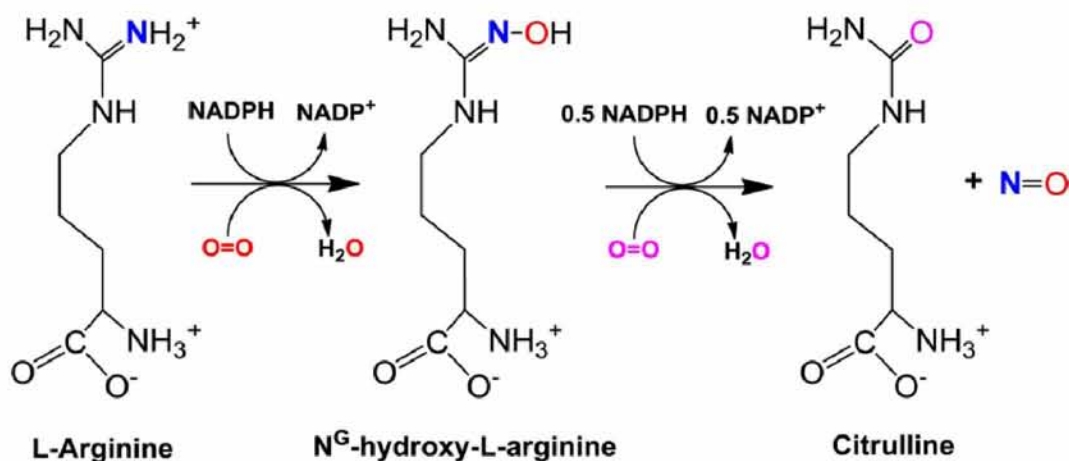
ENZYMΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ NOS

Από ενζυμικής-χημικής απόψεως η NOS είναι μια μονοοξυδάση που οδηγεί στην παραγωγή NO και κιτρουλίνης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την L-αργινίνη σύμφωνα με τον παρακάτω χημικό τύπο [3]:

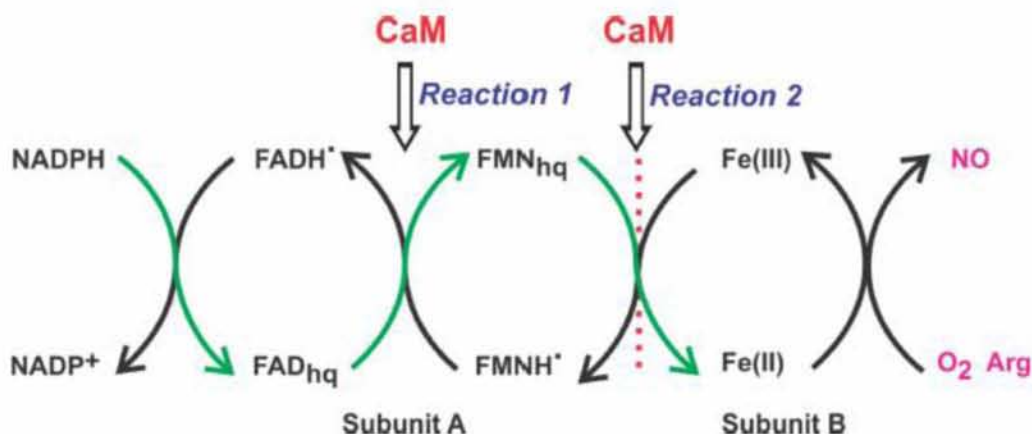


Πιο αναλυτικά, η NOS καταλυτική δράση της NOS πραγματοποιείται σε δύο βήματα (εικόνα 1) [9-10]. Το υπόστρωμα της L-αργινίνης αρχικά μετατρέπεται σε ένα ενδιάμεσο προϊόν, την N-υδρόξυ-L-αργινίνη (NOHA), η οποία εν συνεχεία διασπάται σε κιτρουλίνη και NO. Έτσι το NO που προκύπτει τελικά έχει ένα άτομο αζώτου (N) που προέρχεται από την γουανιδινική ομάδα της L-αργινίνης, ενώ το άτομο του οξυγόνου (O) προέρχεται από το O₂.

Από βιοχημικής απόψεως, για να μετατραπεί σε ενεργό ένζυμο η πρωτεΐνη NOS, χρειάζεται μια σειρά από συμπαραγόντες (co-factors) και αυτοί είναι οι φλαβίνες-τόσο με την μορφή φλαβινο-αδενίνο-δινουκλεοτιδίων (flavin-adenine-dinucleotide-FAD), όσο και με την μορφή φλάβινο-μονονουκλεοτιδίων (flavin mononucleotide-FMN) , η αίμη, η 5,6,7,8-τετραυδροβιοπτερίνη (H₄B) καθώς και ιόντα ψευδαργύρου [11]. Οι βλαβίνες FAD και FMN χρησιμοποιούνται για την σταδιακή μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADPH στο O₂ που είναι δεσμευμένο στο μόριο της αίμης. όπου και θα οξειδωθεί και εν συνεχεία θα μπορέσει να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή NO (εικόνα 2). Στο τελικό στάδιο της μεταβίβασης είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί ως συμπαραγόντας η H₄B ενώ τα ιόντα ψευδαργύρου χρησιμοποιούνται για την σταθεροποίηση της τρισδιάστατης δομής του ενεργού κέντρου του ενζύμου.

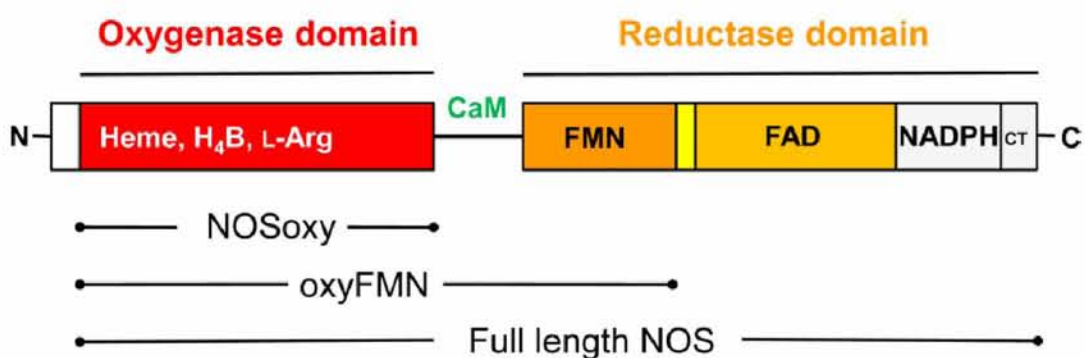


Εικόνα 1. Παραγωγή του NO από το ένζυμο NOS. Η NOS χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα L-αργινίνη και ως συμπαραγόντα NADPH και O₂, οδηγεί στην παραγωγή ενός ενδιάμεσου μορίου που ονομάζεται N-υδρύξυ-L-αργινίνη, η οποία εν συνεχεία διασπάζεται στα τελικά προϊόντα, κιτροουλίνη και μονοξειδιο του αζώτου. Το άτομο του αζώτου (μπλέ) προέρχεται από την γουανιλική ομάδα του αμινοξέως ενώ το άτομο οξυγόνου (κόκκινο) του NO προέρχεται από το O₂ που χρησιμοποιείται στο πρώτο στάδιο [3].



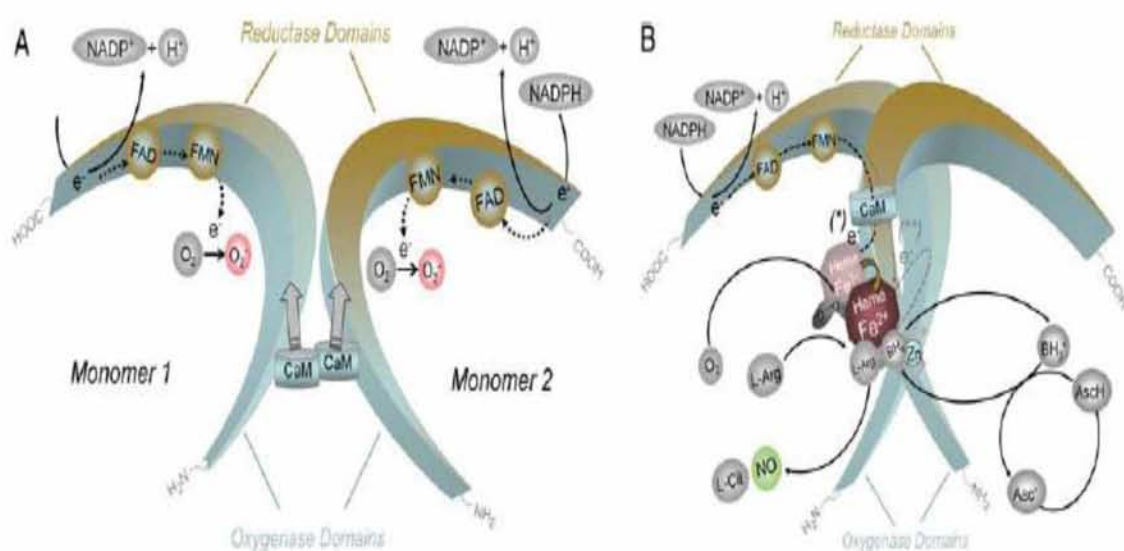
Εικόνα 2. Ενδομοριακή μεταφορά ηλεκτρονίων (πράσινο βέλος) στο μόριο της NOS από το NADPH μέσω FAD και FMN στην αίμη. Στην πρώτη αντίδραση είναι απαραίτητη και η δράση της καλμοδουλίνης που δεσμεύεται σε ειδική περιοχή του μορίου των ισομορφών eNOS και nNOS. Η δεύτερη αντίδραση εκτός από την παρουσία καλμοδουλίνης είναι απαραίτητη και η συμμετοχή της H₄B [3].

Όλες οι NOS πρωτεΐνες είναι ομοδιμερή. Έτσι σε γενικές γραμμές θα λέγαμε ότι η NOS είναι μια ομοδιμερής φλάβο-αιμο-πρωτεΐνη, και κάθε της υπομονάδα αποτελείται από δύο επιμέρους περιοχές (εικόνα 3), μια αμινοτελική καταλυτική περιοχή η οποία περιέχει την αίμη και έχει δράση NO οξυγενάσης (NOSoxy) και μια καρβόξυτελική περιοχή η οποία περιέχει την φλαβίνη και έχει δράση ρεδοκτάσης (NOSred) (εικόνα 3).



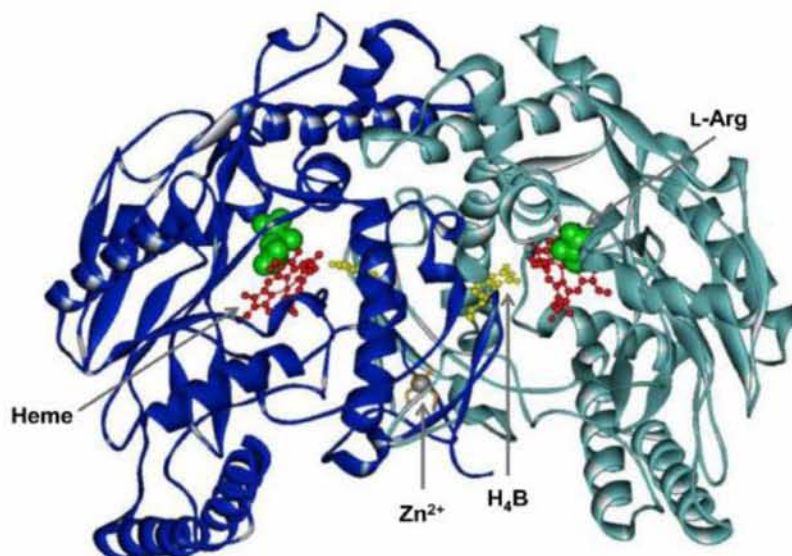
Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση στην οποία φαίνονται οι δύο βασικές ενζυμικές υπομονάδες της NOS, οι περιοχές της οξυγενάσης και της ρεδοκτάσης, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με την περιοχή CaM. Στην περιοχή της οξυγενάσης μπορεί να γίνει πρόσδεση της αίμης, της H₄B, ενώ είναι και η περιοχή που αναγνωρίζει ως υπόστρωμα την L-αργινίνη. Η περιοχή της ρεδοκτάσης αποτελείται από την FMN, την περιοχή που αναγνωρίζει τις φλαβίνες, την περιοχή που προσδέεται το NADPH και ακολουθεί μια καρβόξυτελική ουρά [3].

Οι δύο αυτές περιοχές συνδέονται μεταξύ τους με μια συνδετική περιοχή που λέγεται CaM (Calmodulin binding linker), που θεωρείται σημαντική για την μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από την NOSred στην NOSoxy περιοχή. Εδώ βρίσκεται και η βασική δομική διαφορά των ισομορφών: στην iNOS (ασβεστίο-ανεξάρτητη) ισομορφή, ο συνδέτης προσδένεται πάνω στην CaM σταθερά αλλά αντιστρεπτά, ενώ στις eNOS και nNOS ισομορφές (ασβεστίο-εξαρτώμενες) η δέσμευση πάνω στην περιοχή αυτή απαιτεί την παρουσία ιόντων Ca^{++}

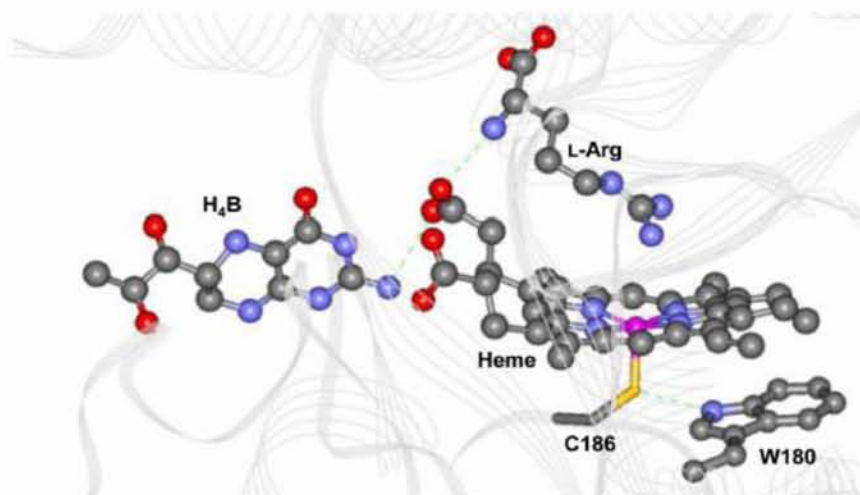


Εικόνα 4. Δομικές και καταλυτικές υπομονάδες του λειτουργικού ομοδιμερούς NOS. Κάθε μονομερές δομή έχει την ικανότητα να μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADPH σε FMN μόρια, ενώ έχει και μικρή ικανότητα να μετατρέπει το μοριακό οξυγόνο σε υπεροξίδιο του οξυγόνου (O_2^-). Η περιοχή της ρεδοκτάσης-αναγωγής μπορεί να δεσμεύσει καλμοδουλίνη (CaM), η οποία ενισχύει την ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων της ρεδοκτάσης. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι το κάθε μονομερές ξεχωριστά δεν μπορεί να δεσμεύσει την BH_4 ούτε το υπόστρωμα της αργινίνης και επομένως δεν μπορεί να παράγει NO, ενώ για δημιουργηθεί το ομοδιμερές χρειάζεται η παρουσία της αίμης. Η αίμη επιπρόσθετα είναι απαραίτητη για την μεταφορά ηλεκτρονίων από την φλαβίνη στην αίμη του αντίθετου μονομερούς. Όλες οι ισομορφές επίσης χρειάζονται ιόντα ψευδαργύρου ώστε να εξασφαλίζεται συνένωση των μονομερών συνδεδεμένη σε χαρακτηριστικές αμινοξικές ακολουθίες, σε ζευγάρια με μοτίβο CXXXXC. Η παρουσία τους είναι μείζονος σημασίας για για την πρόσδεση BH_4 και αργινίνης. Η προσωρινή οξειδωση της BH_4 θα οδηγήσει στην δημιουργία ρίζας τριυδρο-βιοπτερίνης (BH_3^+) η οποία στην συνέχεια μπορεί να ανακυκλωθεί υπό την δράση του ασκορβικού οξέος (Asc) [12-17].

(a)



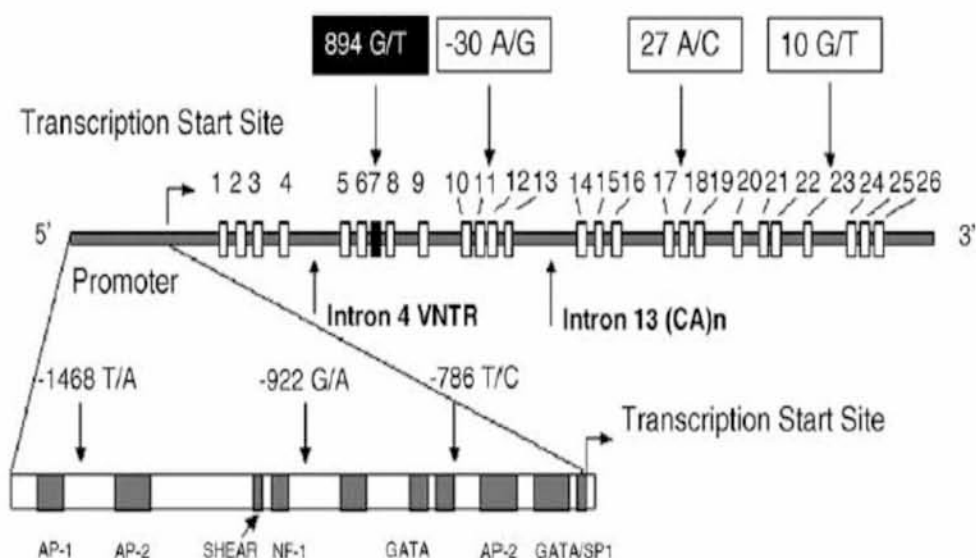
(b)



Εικόνα 5. (α). Σχηματική τρισδιάστατη αναπαράσταση της στερεοδομής της eNOS στην οποία φαίνεται η θέση δέσμευσης της αίμης και του υποστρώματος της L-αργινίνης (που δεσμεύεται κοντά στην θέση πρόσδεσης της αίμης) και της BH₄. Τα δυο μονομερή του ενζύμου είναι πανομοιότυπα (σκουρο μπλέ και ανοικτό μπλε). Κάθε υπομονάδα περιέχει την χαρακτηριστική ομάδα αίμης, μια θέση δέσμευσης του υποστρώματος, μια θέση δέσμευσης για την BH₄ ενώ ένα ιόν ψευδαργύρου που συνδέεται σε τέσσερις θέσεις (δύο από κάθε υπομονάδα, από τις οποίες ένα είναι κατάλοιπο κυστεΐνης) είναι απαραίτητο για την δομική και λειτουργική ακεραιότητα. (β) δομή του ενεργού κέντρου του μορίου του eNOS. Το μόριο της αίμης συνδέεται με υδρογονικούς δεσμούς τόσο με την κυστεΐνη στην θέση 186 (Cys186) όσο και με την τρυπτοφάνη στην θέση 180 (W180). Το υπόστρωμα της L-αργινίνης και της BH₄ συνδέονται με υδρογονικό δεσμό, με υδρογόνο που προσφέρεται από την προπιονική αλυσίδα της αίμης [3].

ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ NOS

Πολύ νωρίς μετά την ανακάλυψη και τον χαρακτηρισμό της δράσης του ενζύμου NOS, έγινε κλωνοποίηση και χαρτογράφηση του γονιδίου NOS, αρχικά για το nNOS [18], εν συνεχεία για το γονίδιο της iNOS [19] και τελικά για το γονίδιο της ισομορφής eNOS [20-22]. Ειδικά για το γονίδιο eNOS, βρέθηκε ότι αυτό εδράζεται στο χρωμόσωμα 7 (και συγκεκριμένα στην περιοχή του μικρού βραχίονα, 7q35-36), έχει περίπου μοριακό βάρος 23 kb και αποτελείται από 26 εξόνια και 25 ιντρόνια (εικόνα 6) [23].



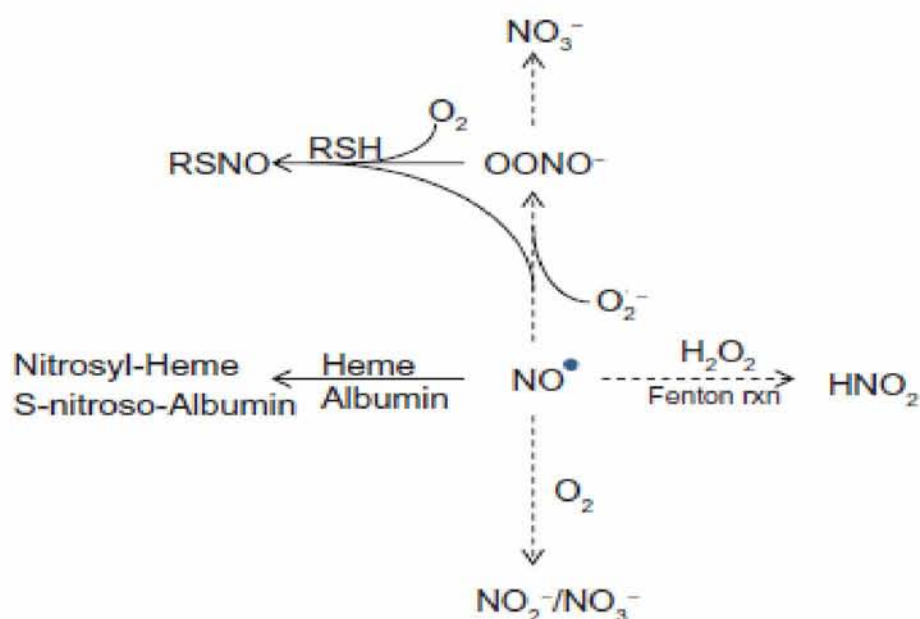
Εικόνα 6. Σχηματική παράσταση της δομής του γονιδίου της ενδοθηλιακής συνθάσης του νιτρικού οξέος. AP-1 k -2: Activating protein -1 and -2. Shear: Shear response element. Επισημαίνονται με βέλος οι περιοχές όπου μπορούν να παρατηρηθούν οι συχνότεροι πολυμορφισμοί, ο σημαντικότερους από τους οποίους είναι ο G894T (μαύρο κουτί).

Στο ιντρόνιο 4 υπάρχει μια χαρακτηριστική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 27 βάσεων, γνωστή ως VNTR (variable number of tandem repeats), ενώ στο ιντρόνιο 13 υπάρχει μια υψηλής πολυμορφικότητας επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (CA)_n (εικόνα..) [23]. Αυτό αργότερα επιβεβαιώθηκε και από άλλες μελέτες με την διαφορά ότι το μέγεθος του γονιδίου φαίνεται ότι είναι λίγο μικρότερο (22 kb) [24]. Σε μια νεότερη μελέτη

διαπιστώθηκε ότι η VNTR περιοχή έχει συνολικά 5 επαναλήψεις, ενώ η περιοχή του ιντρονίου 13 έχει συνολικά 35 επαναλήψεις [25].

ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ NO

Το παραγόμενο από τη eNOS μονοξείδιο του αζώτου μπορεί να εξασκήσει την βιολογική του δράση σε πολλαπλά επίπεδα στα διάφορα όργανα-στόχους όπως θα αναφερθεί πιο αναλυτικά παρακάτω. Από πλευράς βιοχημείας όμως αυτό επιτυγχάνεται μέσω αντίδρασης του με διάφορα άλλα μόρια και ρίζες που επηρεάζουν την βιοδιαθεσιμότητα του καθώς και το συνολικό οξειδωτικό φορτίο (εικόνα 7) [26].

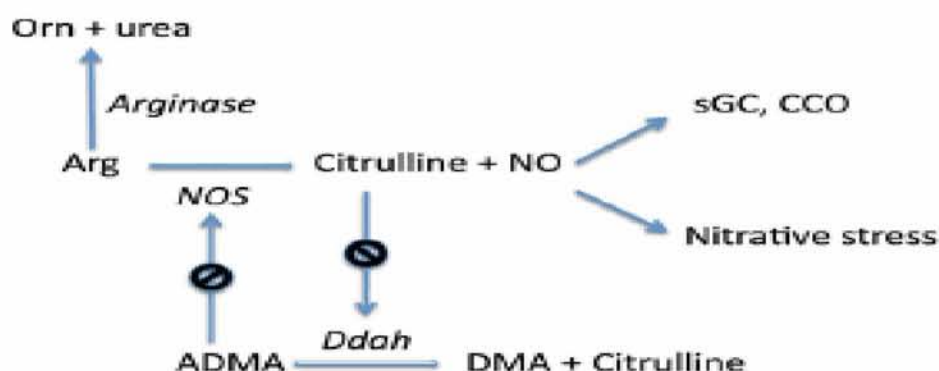


Εικόνα 7. Βιοχημικές αλληλεπιδράσεις του NO. Το NO μπορεί να μειώσει την βιολογική του δράση, μέσω παραγωγής ριζών όπως τα νιτρώδη (NO_2^-) και τα νιτρικά (NO_3^-). Άλλοι βιοχημικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν την σύνδεση του με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) με παραγωγή νιτρώδους οξέος (HNO_2). Άλλη βιοχημική οδός είναι μέσω σύνδεσης με ρίζα οξυγόνου που μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή, υπερόξεινιτρικών ριζών (OONO^-) S-νιτροσθειολών (RSNO) ;είτε τέλος κάνοντας νιτροζυλίωση της αίμης και άλλων πρωτεϊνών, στην προσπάθεια του οργανισμού να τις προστατέψει από το οξειδωτικό στρες.

ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

NO

Έχει βρεθεί ότι κάθε φορά που παράγεται NO από την NOS, ενεργοποιείται ενδογενής μηχανισμός που έχει ως στόχο να μειώσει την υπέρμετρη δραστικότητα του NO. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι αυξάνεται η παραγωγή ενός μόριου του ADMA (ασύμμετρη διμέθυλοαργινίνη, που συνδέεται μη αντιστρεπτά στη συνθάση αναστέλλοντας την δράση της. Με την σειρά του το ADMA ελέγχεται και αυτό μέσω διάσπασης του από αντίστοιχη υδρολάση (Ddah) (εικόνα 8) [27].



Εικόνα 8. Μεταβολικός έλεγχος παραγωγής του NO. Το NO παράγεται από την συνθάση η οποία χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα L-αργινίνη και εν συνεχεία δρά σε διάφορους βιοχημικούς στόχους όπως η γουανυλική κυκλάση (sGC) και η οξειδάση του κυτοχρώματος c (CCO). Τα αυξημένα επίπεδα της κιτορυλίνης αναστέλλουν ένα ένζυμο, την διμεθυλοαργινιν-διμεθυλ-αμινο-υδρολάση (Ddah) που φυσιολογικά διασπά την ADMA (ασύμμετρη διμέθυλοαργινίνη). Έτσι αυξάνονται τα επίπεδα της ADMA που με την σειρά της αναστέλλει την δράση της NOS για παραγωγή επιπλέον κιτρουλίνης, λειτουργώντας έτσι ως μηχανισμός εσωτερικής-παλίνδρομης ρύθμισης. Ο μηχανισμός αυτός διαταράσσεται σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις.

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΝΟΣ

Το μονοξειδίο του αζώτου είναι ένα ιδιαίτερο μόριο αγγειοφόρος που έχει πολυάριθμους μοριακούς στόχους. Το NO μπορεί να ελέγχει λειτουργίες όπως η νευροδιαβίβαση [28-29], ο αγγειακός τόνος [30], η ρύθμιση μετάγραφης γονιδίων [31-32] και μετάφρασης mRNA [33-34] και η μεταμεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών [35-36]. Μια φυσιολογική χημική πορεία του NO είναι να συνδεθεί με μόρια υπεροξειδίου του οξυγόνου (O_2^-) με αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερνιτωδών ριζών ($ONOO^-$), ρίζες οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες, νίτρωση, S-νιτροζυλίωση και άλλες τροποποιήσεις σε πρωτεΐνες, λιπίδια αλλά και DNA μόρια [37-39]. Υπάρχουν όπως έχουμε αναφέρει τρεις βασικές ισομορφές του NOS αν και τα τελευταία χρόνια γίνονται αναφορές για την παρουσία μιας τέταρτης ισομορφής, της μιτοχονδριακής.

ΝΕΥΡΩΝΙΚΗ ΣΥΝΘΑΣΗ ΤΟΥ NO (nNOS)

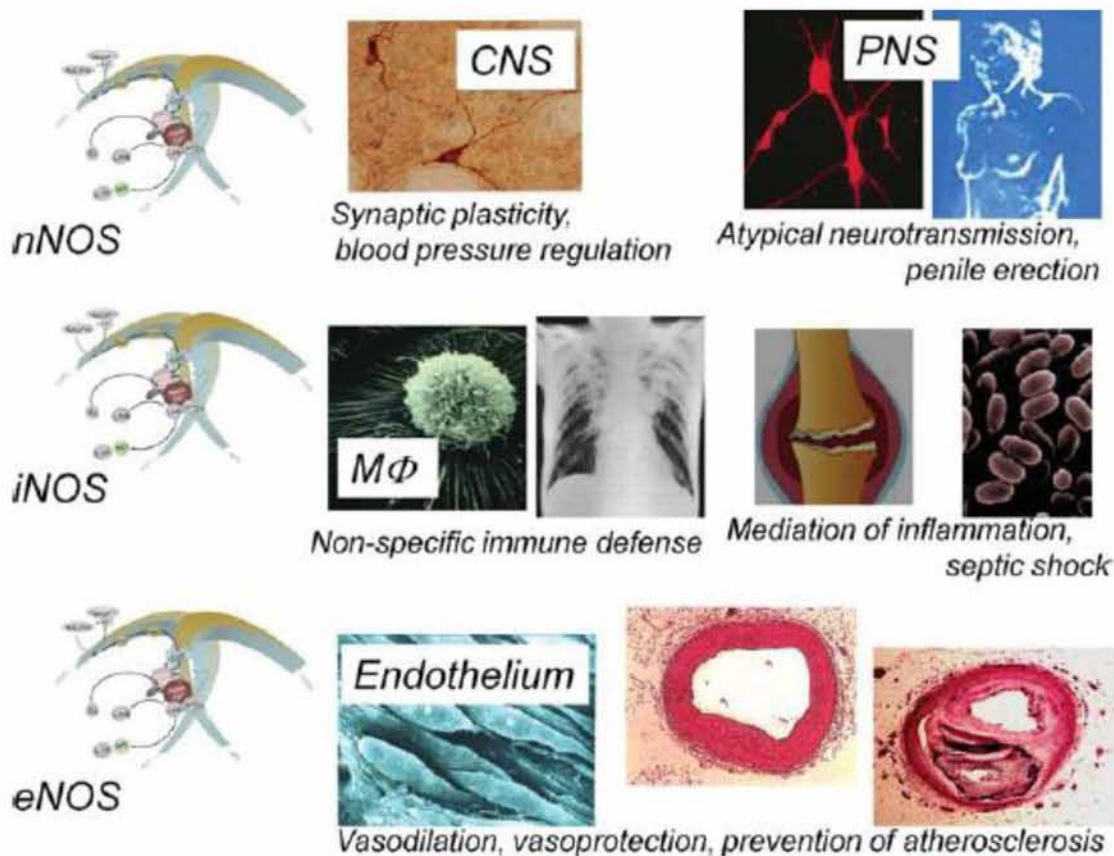
Η νευρωνική συνθάση του NO (nNOS) εκφράζεται ιδιοσυγκρασιακά σε συγκεκριμένους νευρώνες του εγκεφάλου. Η δραστηριότητα του μορίου ρυθμίζεται από τα επίπεδα του Ca^{++} και την παρουσία καλμοδουλίνης. Η nNOS συναντάται στα κύτταρα τόσο σε μικροσωματική όσο και σε διαλυτή μορφή και η διαφορετική αυτή υποκυτταρική εντόπιση πιθανώς να αντικατοπτρίζει και διαφορετική λειτουργία [40]. Η nNOS εμπεριέχει στο μόριο της μια PDZ περιοχή και μπορεί να αλληλεπιδρά άμεσα με PDZ περιοχές άλλων πρωτεϊνών. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις επίσης καθορίζουν την υποκυτταρική κατανομή και την ενεργότητα του ενζύμου [40]. Εκτός του εγκεφάλου, nNOS έχει επίσης ταυτοποιηθεί με ανοσοιστοχημεία ότι υπάρχει

και σε άλλους ιστούς όπως στο νωτιαίο μυελό, τα συμπαθητικά γάγγλια, τα επινεφρίδια, σε περιφερικά νεύρα, σε επιθηλιακά κύτταρα διαφόρων οργάνων, στα κύτταρα της macula densa του νεφρού, σε κύτταρα νησιδίων του παγκρέατος και στις λείες μυικές ίνες των αγγείων [41]. Στα θηλαστικά, η μεγαλύτερη πηγή nNOS από άποψη μάζας ιστού είναι ο μυικός ιστός [41-42].

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ nNOS

Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων έχει δείξει ότι ο σημαντικότερος ρόλος της nNOS εστιάζεται στην μετάδοση του σήματος στις νευρικές συνάψεις. Η nNOS έχει ενοχοποιηθεί ότι συμμετέχει στην ρύθμιση φυσιολογικών διεργασιών όπως η μάθηση, η μνήμη και η νευρογέννεση [40]. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, η nNOS μεσολαβεί κυρίως στην μακροπρόθεσμη ρύθμιση της μετάδοσης μέσω σύναψης (μακροχρόνια ενίσχυση σήματος και αναστολή αυτού) ενώ δεν υπάρχουν ενδείξεις συμμετοχής στην οξεία νευροδιαβίβαση [28-29, 43-44].

Επίσης επηρεάζει την παλίνδρομη και πολλαπλή επικοινωνία μεταξύ συνάψεων, διαδικασία που είναι σημαντική για τον σχηματισμό της μνήμης γιαυτό και σε πειραματικά μοντέλα, αναστολείς της nNOS βλάπτουν την μάθηση και προκαλούν αμνησία σε ζώα [45]. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι η nNOS που παράγεται στον εγκέφαλο συμμετέχει στον μηχανισμό κεντρικής ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης [46-48]. Έτσι ο αποκλεισμός της δραστηριότητας της nNOS στον προμήκη μυελό και στον υποθάλαμο προκαλεί συστηματική υπέρταση σε πειραματικά μοντέλα [49].



Εικόνα 9. Σημαντικότερες λειτουργίες των διαφόρων ισομορφών του NOS. Η nNOS εκφράζεται σε ειδικούς νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Εμπλέκεται σε διαδικασίες που αφορούν την συναπτική πλαστικότητα (δυνατότητα μακροπρόθεσμης διατήρησης του δυναμικού της μεμβράνης και της μακροπρόθεσμης αναστολής). Τα βιοχημικά αυτά φαινόμενα εμπλέκονται στις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης. Η nNOS συμμετέχει επίσης στην κεντρική ρύθμιση της πίεσης του αίματος. Στο περιφερικό νευρικό σύστημα δρά ως ένας άτυπος νευροδιαβιβαστής που προκαλεί χαλάρωση των μυικών ινών που σχετίζονται με την περιστολή του εντέρου, την αγγειοδιαστολή και την στυτική λειτουργία. Το μπορεί iNOS να μπορεί να επάγεται από κυτταροκίνες και άλλους παράγοντες κυρίως στα μακροφάγα αλλά γενικά σχεδόν σε κάθε τύπο κυτάρων. Η επαγωγή ενεργοποίησης της iNOS στα μακροφάγα είναι ουσιαστική για τον έλεγχο ενδοκυττάρων βακτηρίων. Οστόσο iNOS μπορεί να ανιχνεύσει κανείς και διάφορες αυτοάνοσες και φλεγμονώδεις νόσους. Τέλος το NO που παράγεται από το iNOS είναι ο κυρίαρχος διαμεσολαβητής στην αγγειοδιαστολή και την πτώση της αρτηριακής πίεσης στο σηπτικό shock. Η eNOS είναι η βασική ισομορφή που ρυθμίζει την περιφερική αγγειοδιαστολή αλλά συγχρονως είναι και ένας ισχυρός αναστολέας της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων και της προσκόλλησης στο αγγειακό τόχωμα. Παράλληλα μπορεί να μειώσει την ενδοθηλιακή διαπερατότητα και την μειωμένη εισροή λιποπρωτεϊνών στο τόχωμα προσφέροντας έτσι σημαντική προστασία έναντι της πορείας αθηροσκλήρωσης των αγγείων.

Στην περιφέρεια, πολλές μυικές ίνες νευρώνονται από νεύρα που περιέχουν nNOS και μπορούν να βιοσυνθέσουν και να απελευθερώσουν NO.

Στις περιπτώσεις αυτές το NO (μέσω ενεργοποίησης NO- ευαίσθητης

γουανιλικής κυκλάσης) μπορεί να μειώσει τον τόνο των μυικών ινών των αιμοφόρων αγγείων [41]. Έτσι η συμβατική μέχρι τώρα αντίληψη ότι μόνο η eNOS συμμετέχει στην ρύθμιση του αγγειακού τόνου στην περιφέρεια έχει αμφισβητηθεί τα τελευταία χρόνια. Αυτό έχει αποδειχθεί και πειραματικά όπου χορήγηση SMTC (S-μέθυλο-L-θειοκυτρουλίνη), μια ουσία που αποτελεί εκλεκτικό αναστολέα μόνο του nNOS και όχι του eNOS μείωσε την βασική ροή του αίματος στο ανθρώπινο αντιβράχιο και στην στεφανιαία κυκλοφορία [50]. Έτσι φαίνεται ότι nNOS και η eNOS έχουν διακριτούς ρόλους στην ρύθμιση του αγγειακού τόνου. Φαίνεται έτσι ότι πολλές φορές όταν για διάφορους λόγους υπάρχει δυσλειτουργία στην δράση της eNOS, τα επίπεδα του nNOS που υπάρχουν μπορούν να διατηρήσουν κάποιου βαθμού αγγειοδιαστολή [51].

nNOS και παθολογικές καταστάσεις

Η ανώμαλη NO σηματοδότηση έχει παρατηρηθεί σε μια σειρά από νευροκυβλιτικές καταστάσεις όπως στο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, στην σκληρυνση κατά πλάκας, στην νόσο Alzheimer και στην νόσο του Parkinson [52]. Υπερδραστηριότητα της nNOS (που οδηγεί σε μαζική εισροή Ca^{++} στα νευρωνικά κύτταρα) έχει θεωρηθεί ότι συμμετέχει στον θάνατο εγκεφαλικών κυττάρων μετά από εγκεφαλικό επεισόδιο [53]. Αυτό πιθανώς να γίνεται μέσω υπερόξεινιτρικής ενεργοποίησης της PARP ή μέσω διαταραχής στην μιτοχονδριακή διαπερατότητα [54]. Υψηλά επίπεδα NO σχετίζονται επίσης με εξάντηλη των αποθεμάτων ενέργειας των κυττάρων μέσω αναστολής της γλυκόλυσης και του κύκλου του Crebs [54].

Τέλος υπάρχουν ,μελέτες που υποστηρίζουν ότι πολλές περιπτώσεις γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης οφείλονται σε διαταραχές του τόνου

των λείων μυικών ινών που νευρώνουν το στόμαχο εξαιτίας υπερπαραγωγής NO από την nNOS των περιφερικών νεύρων [55-56].

ΕΠΑΓΩΓΙΜΗ ΣΥΝΘΑΣΗ ΤΟΥ NO (iNOS)

Η επαγώγιμη συνθάση του NO (iNOS) δεν εκφράζεται υπό φυσιολογικές συνθήκες στα κύτταρα αλλά η έκφραση της μπορεί να επαχθεί από λιποπολυσακχαρίτες βακτηρίων, κυτταροκίνες και άλλους παράγοντες [41]. Παρόλο που εντοπίζονται γενικά στα μακροφάγα κύτταρα, η έκφραση του ενζύμου μπορεί να επαχθεί σχεδόν σε οποιοδήποτε κύτταρο αρκεί να υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες [41]. Από την στιγμή που θα παραχθεί, η iNOS είναι συνεχώς ενεργή και η δράση της δεν ρυθμίζεται από τις ενδοκυττάρια συγκεντρώσεις Ca^{++}

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ iNOS

Το iNOS όταν επάγεται στα μακροφάγα, παράγει πολύ μεγάλες ποσότητες NO το οποίο είναι εντόνως κυτταροτοξικό [57]. Λόγω της χημικής του συγγένειας με πρωτείνες που δεσμεύουν σίδηρο, το NO αναστέλει όλα τα ένζυμα που χρησιμοποιούν ως σίδηρο στο ενεργό τους κέντρο. Τέτοιες πρωτείνες είναι εκείνες που συμμετέχουν στην μιτοχονδριακή μεταφορά ηλεκτρονίων, η ριβονουκλεική αναγωγή, και η cis-ακονιτάση (ένζυμο κλειδί στο κύκλο του κιτρικού οξέος) [57]. Το NO επίσης μπορεί να επέμβει άμεσα στο DNA των κυττάρων προκαλώντας ρήγματα στην έλικα [58-59]. Ένας συνδυασμός όλων αυτών των λειτουργιών φαίνεται ότι αποτελεί την βάση της κυτταροστατικής και κυτταροτοξικής δράσης του NO επί παρασιτικών μικροοργανισμών και ορισμένων καρκινικών κυττάρων.

Είναι ενδιαφέρον επίσης το γεγονός ότι η iNOS μπορεί να ενεργοποιηθεί και σε άλλα κύτταρα (μη ανοσολογικά) υπό την επίδραση ορισμένων κυτταροκινών, και να επηρεάσουν την δράση γειτονικών κυττάρων. Έτσι φαίνεται ότι με μηχανισμούς που σχετίζονται με την δράση της iNOS, ορισμένα επιθηλιακά κύτταρα-με ενεργοποιημένη iNOS μπορούν να λύουν καρκινικά κύτταρα, όπως επίσης και ηπατοκύτταρα μπορούν να σκοτώσουν σποροζωΐδια ελονοσίας [60-61].

iNOS και παθολογικές καταστάσεις

Τα υψηλά επίπεδα NO που παράγονται από ενεργοποιημένα μακροφάγα (και πιθανώς ουδετερόφιλα και άλλα κύτταρα) μπορεί να είναι τοξικά όχι μόνο για ανεπιθύμητα κύτταρα- μικρόβια, παράσιτα ή κύτταρα όγκου- αλλά όταν βρεθούν σε λάθος θέση μπορούν να βλάψουν και υγιή κύτταρα. Η μεγάλη πλειονότητα αυτοάνοσων και αυτοφλεγμονωδών νοσημάτων χαρακτηρίζονται από αυθονία ενεργοποιημένων μακροφάγων και ουδετεροφίλων με σημαντικές ποσότητες NO να εκρίνεται από τα κύτταρα αυτά προκαλώντας καταστροφή του περιβάλλοντος ιστού [59, 62]. Επίσης μελέτες δείχνουν ότι ενεργοποίηση του iNOS μπορεί να σχετίζεται με διαδικασίες απόρριψης του αλλογενούς μοσχεύματος [63].

Πολλές παθήσεις του εγκεφάλου είναι αποτέλεσμα φλεγμονώδους νευροεκφυλισμού στις οποίες ενεργοποιημένα αστροκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα καταστρέφουν τα νευρωνικά κύτταρα. Πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι αυτό γίνεται μέσω αυξημένης δράσης NADPH οξειδάσης και iNOS, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή υπερόξυ-νιτριδίου

(ONOO⁻) το οποίο είναι εξαιρετικά τοξικό και προκαλεί αναστολή του κυτοχρώματος και απόπτωση [64-65].

Πρόσφατα βρέθηκε ότι η υπερβολική παραγωγή NO μέσω δραστηριοποίησης της iNOS διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο και στο σηπτικό σοκ, κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται από αγγειογιαστολή, υπόταση και μικροαγγειακή βλάβη [66]. Πολλές κυτταροκίνες, όπως θρομβοξάνη, παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, ιντερλευκίνη 1, TNF, ιντερφερόνη-γ έχουν εμπλακεί στην παθοφυσιολογία της, οστόσο η πτώση της αρτηριακής πίεσης φαίνεται πως οφείλεται κυρίως στην υπερβολική παραγωγή NO από την iNOS που επάγεται στο αγγειακό τοίχωμα [66-67].

ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΣΥΝΘΑΣΗ ΤΟΥ NO (eNOS)

Η ενδοθηλιακή συνθάση του NO (eNOS) εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ωστόσο, το ισοένζυμο αυτό έχει επίσης ανιχνευθεί σε καρδιακά κύτταρα, σε αιμοπετάλια, σε ορισμένους νευρώνες του εγκεφάλου, σε συγκυτιοτροφοβλάστες του ανθρώπινου πλακούντα και σε LLC-PK1 κύτταρα (επιθηλιακά κύτταρα των σωληναρίων των νεφρών) [41].

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ eNOS

Παρόμοια με την nNOS, η παρουσία καλμοδουλίνης (ενεργοποιημένη από ιόντα Ca⁺⁺) είναι απαραίτητη για την ρύθμιση της δραστικότητας της eNOS. Η ενδοθηλιακή eNOS συνθέτει NO κατά ώσεις και η δραστικότητα της αυξάνει όσο αυξάνουν τα επίπεδα του ενδοκυττάριου ασβεστίου, καθώς το Ca προκαλεί την πρόσδεση της καλμοδουλίνης στο ένζυμο. Ωστόσο έχει βρεθεί ότι και άλλες πρωτεΐνες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την eNOS

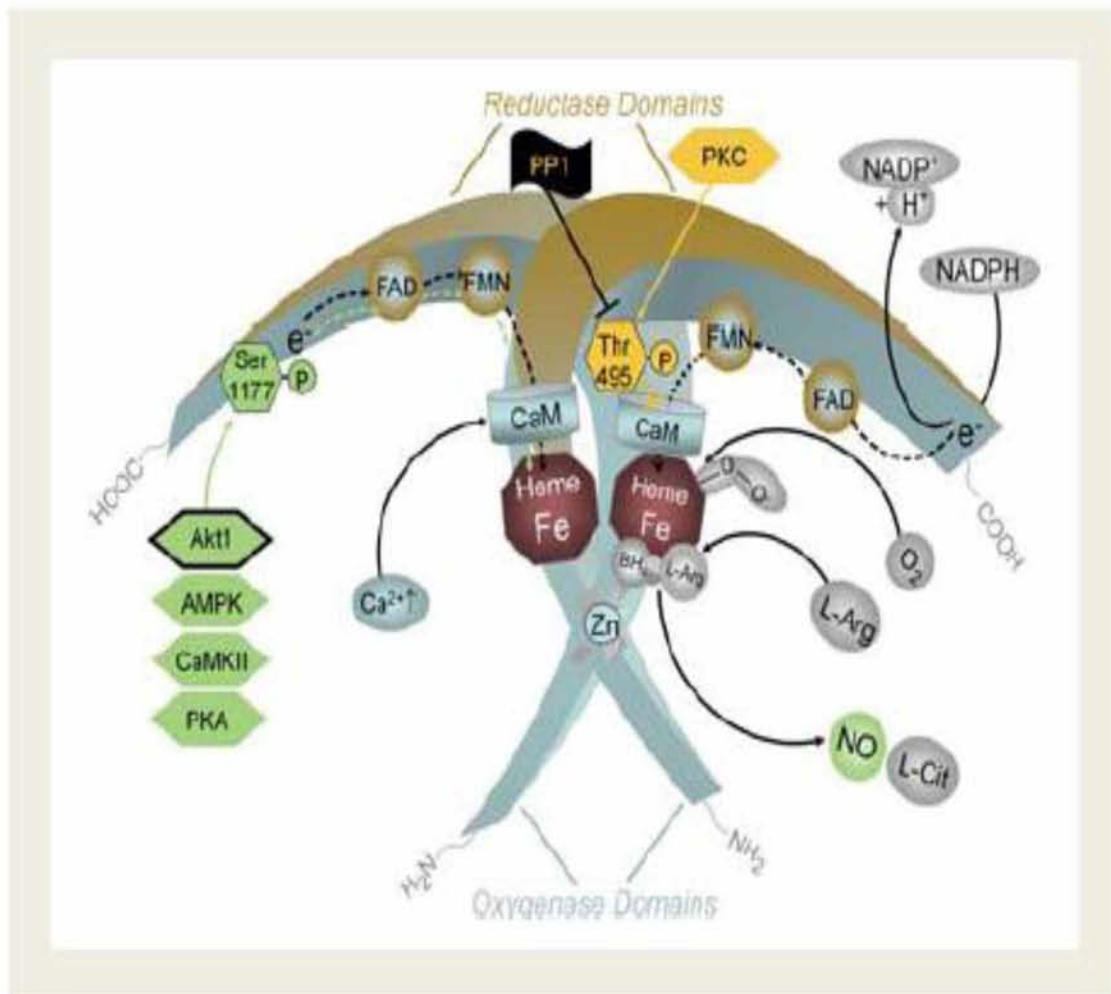
και να ρυθμίσουν την δραστικότητα της. Μια από αυτές είναι η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 (heat shock protein 90- hsp90), η οποία λειτουργεί ως αλλοστερικός διαμορφωτής του ενζύμου, ενώ συγχρόνως προάγει την διμεροποίηση του μορίου [68-70]. Άλλο μόριο είναι η caveolin-1 της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων που μπορεί να συνδεθεί στην eNOS αναστέλλοντας την δράση της [71]. Αυτό έχει φανεί και γενετικά από μελέτες σε caveolin-ελλειματικά ποντίκια που παρουσίαζαν αιμοφόρα αγγεία με παρατεταμένη χαλάρωση και χωρίς δυνατότητα αγγειόσπασμου [72]. Επιπρόσθετα, η hsp90 και η καλμοδουλίνη, μπορούν να εκτοπίσουν την calveolin και να οδηγήσουν στην επανα-ενεργοποίηση του eNOS [73].

Επιπρόσθετα όμως έχει βρεθεί ότι η eNOS μπορεί να ενεργοποιηθεί και από ερεθίσματα τα οποία είναι ανεξάρτητα από την διαμεσολάβηση του Ca. Ο καλύτερα μελετημένος τέτοιος ενεργοποιητής είναι ένας μηχανισμός που είναι γνωστός ως fluid shear stress. Η ενεργοποίηση εδώ γίνεται μέσω διαδικασίας φωσφορυλίωσης του ενζύμου [74-75]. Η eNOS μπορεί να ενεργοποιηθεί σε διάφορα αμινοξικά κατάλοιπα όπως σερίνης (Ser), θρεονίνης (Thr) και τυροσίνης (Tyr). Η φωσφορυλίωση της Ser 177, που βρίσκεται στην περιοχή της ρεδοκτάσης, οδηγεί στην ροή ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία του ενζύμου στο Ca (απαιτούνται πλέον υπο-δεκαπλάσιες ποσότητες ιόντων ασβεστίου για να το ενεργοποιήσουν) (εικόνα 10) [75-76]. Επίπρόσθετα τα οιστρογόνα και ο αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων (VEGF, vascular endothelial growth factor) μπορούν να ενεργοποιήσουν την eNOS, φωσφορυλιώνοντας κατάλοιπα Ser και Thr (μέσω ενεργοποίησης της Akt κινάσης) [77]. Η ινσουλίνη επίσης μέσω Akt κινάσης και AMPK (AMP-

ενεργοποιημένη κινάση), ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης την eNOS [77]. Τέλος η βραδυκινίνη, μέσω CaMII (Ca/calmodulin ανεξάρτητη κινάση II), μπορεί να φωσφορυλιώσει την Ser177, ενώ γενικά διάφορες καταστάσεις στρες μπορούν μέσω φωσφορυλίωσης να ενεργοποιήσουν την eNOS, με άγνωστους εν πολλοίς μηχανισμούς (πιθανώς μέσω PKA-protein kinase A) (εικόνα 10). [77].

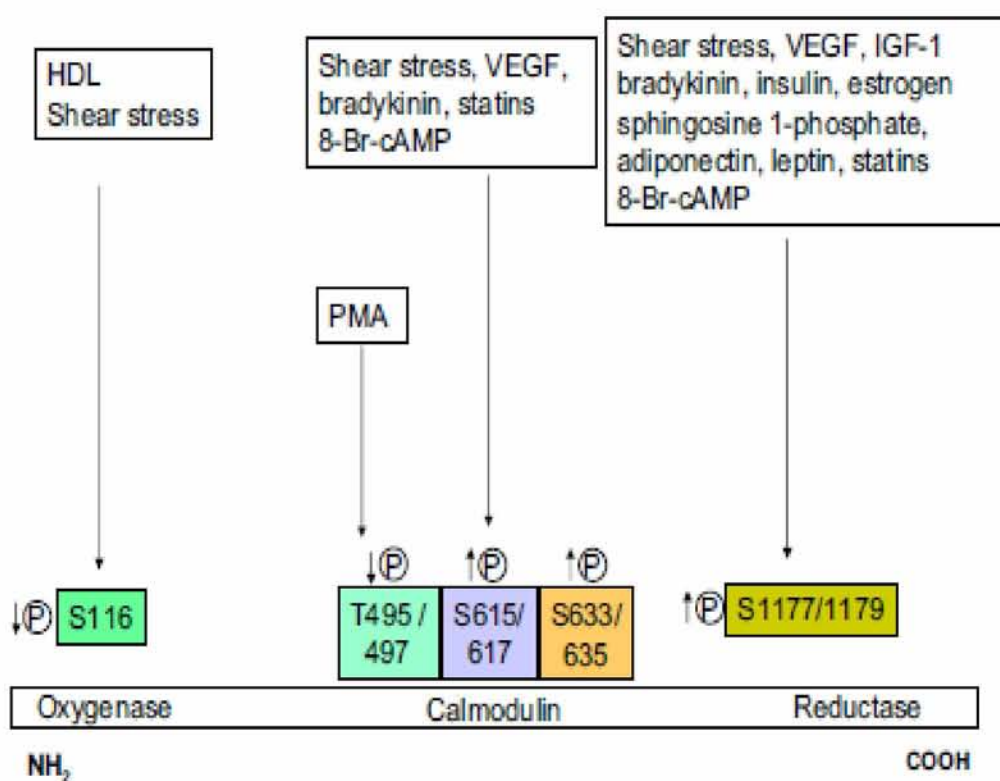
Όλα αυτά έχουν αποδειχθεί και πειραματικά καθώς A₁κ-ανεπαρκή ποντίκια δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν την eNOS, λόγω αδυναμίας φωσφορυλίωσης, ενώ ποντίκια με σημειακή μεταλλαγή στη σερίνη έδειξαν ότι αν γίνει αντικατάσταση από άλλο φωσφομιμητικό αμινοξύ (δηλαδή αμινοξύ που μπορεί επίσης να φωσφορυλιώνεται) δεν επηρεάζεται η δραστηριότητα της eNOS, ενώ σε μεταλλάξεις όπου η αντικατάσταση γίνεται με αμινοξύ που δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί, μειώνεται κατά πολύ η δραστηριότητα της eNOS [77].

Εκτός από την Ser177, άλλη θέση, η φωσφορυλίωση της οποίας μπορεί να επηρεάσει την ενεργοποίηση της eNOS είναι η Thr495 (πιθανώς μέσω δράσης της protein kinase C), η οποία αντιστοιχεί στην περιοχή σύνδεσης της καλμοδουλίνης. Αυτό όμως γίνεται με αντίθετο τρόπο σε σχέση με την Ser, καθώς εδώ η αποφωσφορυλίωση αυτής της θέσης φαίνεται ότι αυξάνει την δραστηριότητα του eNOS, μέσω αυξημένης ικανότητας σύνδεσης της καλμοδουλίνης και αύξησης της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου [78]. Τέλος, άλλες θέσεις στο μόριο του eNOS, που μπορεί να φωσφορυλιωθούν και να επηρεάσουν την ενεργότητα του μορίου, λιγότερο καλά μελετημένες είναι η Ser114, Ser633, Tyr81 και Tyr657 [79].

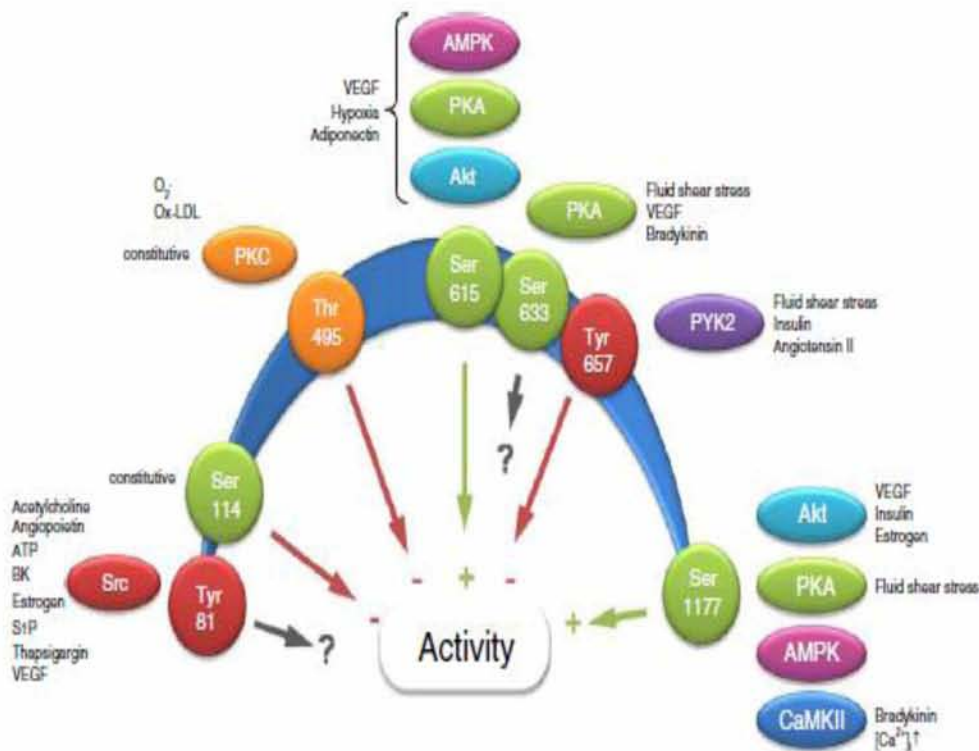


Εικόνα 10. Ρύθμιση της δραστηριότητας του eNOS μέσω ασβεστίου και φωσφορυλίωσης. Μια αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου οδηγεί σε μια ενισχυμένη πρόσδεση της καλμοδουλίνης (CaM) στο ένζυμο με αποτέλεσμα να γίνεται αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης που διευκολύνει την ροή ηλεκτρονίων από το NADPH στην περιοχή της ρεδοκτάσης. Σημαντικές θέσεις φωσφορυλίωσης αποτελούν τη σερίνη 177 (Ser177) και η θρονίνη 495 (Thr495). Σε κατάσταση ηρεμίας-ανεργότητας του ενζύμου η θέση της Ser177 δεν είναι φωσφορυλιωμένη. Η φωσφορυλίωση επάγεται από ουσίες όπως VEGF, οιστρογόνα, ινσουλίνη βραδυκινίνη. Η λειτουργικότητα των κινάσων που κάνουν την φωσφορυλίωση (πράσινα εξάγωνα στο σχεδιάγραμμα) εξαρτάται από το πρωτεύων ερέθισμα. Πάντως τα οιστρογόνα έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνουν μέσω ενεργοποίησης της κινάσης Akt1. Η ινσουλίνη πιθανώς να ενεργοποιεί την Akt ή και την AMPK. ενώ η βραδυκινίνη φωσφορυλιώνει μέσω ενεργοποίησης της PKA και CaMKII. Η φωσφορυλίωση της Ser177 είναι απαραίτητη για να γίνεται πιο απρόδοκτα η ροή των ηλεκτρονίων στην περιοχή της ρεδοκτάσης. Σε αντίθεση με την Ser177, η φωσφορυλίωση της Thr495 μειώνει την ικανότητα ροής των ηλεκτρονίων επομένως μειώνει την ενεργότητα του ενζύμου και γιαυτό η θέση αυτή δεν φωσφορυλιώνεται όταν το ένζυμο είναι λειτουργικό και ενεργοποιημένο. Η φωσφορυλίωση της Thr495 γίνεται μέσω διαφορετικών κινάσων, η κυριότερη των οποίων είναι η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) (κίτρινο εξάγωνο στο σχήμα). Έτσι η φωσφορυλίωση της Thr495 η δραστηριότητα του ενζύμου μειώνεται και για το λόγο αυτό, όταν πρόκειται να γίνει ενεργοποίηση του μορίου της eNOS, αυτό επιτυγχάνεται με φωσφορυλίωση της Ser177 και ταυτόχρονη αποφωσφορυλίωση της Thr495 από ένα ένζυμο που λέγεται πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1, μαύρο εξάγωνο στο σχεδιάγραμμα) [11].

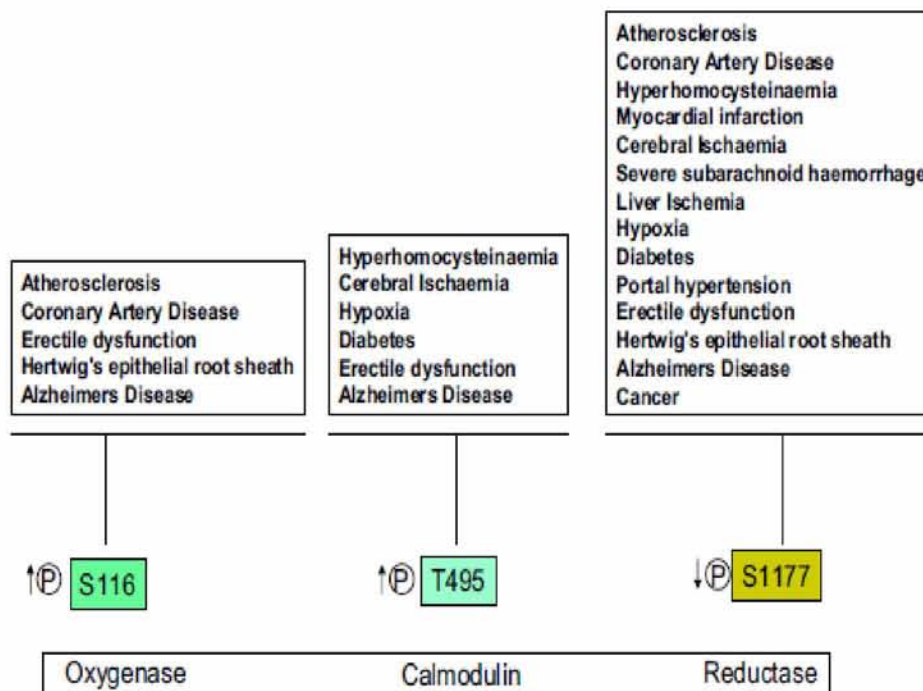
Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότεροι παράγοντες που έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την ενεργότητα του eNOS μέσω φωσφορυλίωσης /αποφωσφορυλίωσης θέσεων, ανευρίσκονται (εικόνες 11 και 12) [80]. Οι θέσεις αυτές έχουν μελετηθεί διεξοδικά σε πάρα πολλές παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με επηρεασμένη δραστηριότητα του eNOS και έχει βρεθεί ότι υπάρχουν συγκεκριμένες παθήσεις που επηρεάζουν (αυξάνουν ή μειώνουν) την φωσφορυλίωση συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων (εικόνα 13) [80].



Εικόνα 11. Ρύθμιση της ενεργότητας του eNOS μέσω ελέγχου της φωσφορυλίωσης/αποφωσφορυλίωσης διαφόρων αμινοξικών καταλοίπων, κυρίως σερίνης (S) και τυροσίνης (T). Στο σχήμα φαίνονται συνοπτικά οι διάφορες θέσεις καταλοίπων S και T καθώς οι διάφοροι παράγοντες που επιδρούν στις θέσεις αυτές VEGF: vascular endothelial cell growth factor. 8-Br-cAMP: 8-bromoadenosine-3'5'-cyclic monophosphate. S-1 P: sphingosine 1-phosphate.



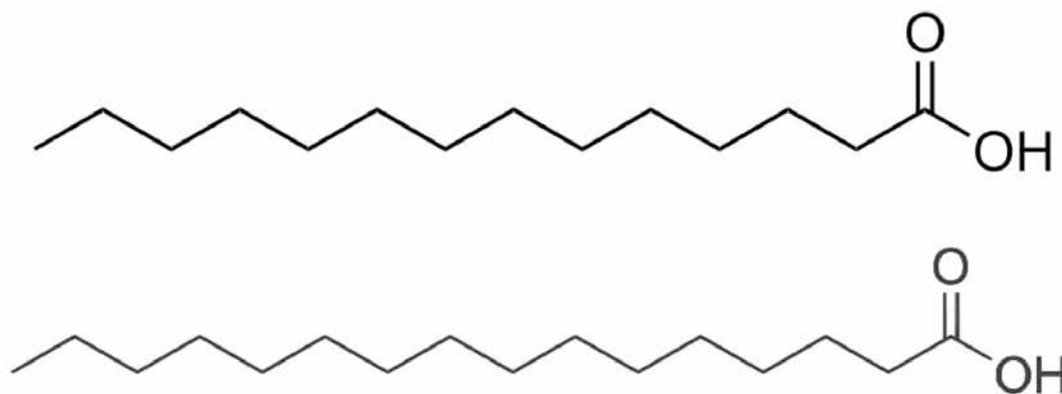
Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικότερων θέσεων όπου μπορεί να γίνει φωσφορυλίωση του μορίου. Το πράσινο βέλος δείχνει ότι φωσφορυλίωση οδηγεί στην ενεργοποίηση του, το κόκκινο βέλος στην αναστολή του ενώ το γκρι βέλος υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει σημαντική μεταβολή στην ενεργότητα του μορίου του eNOS. Τα νούμερα αναφέρονται στην αμινοξική ακολουθία.



Εικόνα 13. Επίδραση των διαφόρων παθολογικών καταστάσεων στην φωσφορυλίωση θέσεων στην πρωτεΐνη του Epos.

Άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Τα Τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι εκτός από την φωσφορυλίωση, για να γίνει ενεργοποίηση μιας eNOS πρωτεΐνης χρειάζεται και κάποιου άλλου είδους μετα-μεταφραστική τροποποίηση, η ακυλίωση δηλαδή η προσθήκη αλυσίδων λιπαρών οξέων σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα [80]. Για την eNOS δυο τέτοιες τροποποιήσεις ακυλίωσης έχουν βρεθεί: η μυριστολίωση (myristoylation) και η παλμιτολίωση (palmytoylation). Η μυριστολίωση είναι μια διαδικασία προσθήκης ρίζας μυριστικού οξέος σε αμινοξικό κατάλοιπο, συνήθως γλυκίνης, αντίδραση η οποία καταλύεται από ένα ένζυμο που ονομάζεται MNT (N-myristoyltransferase). Η παλμιτολίωση είναι η προσθήκη ρίζας παλμιτοεικού οξέος σε αμινοξικό κατάλοιπο πρωτεΐνης, συνήθως κυστεΐνης και δευτερευόντως σερίνης και θρεονίνης (εικόνα 14) [80].

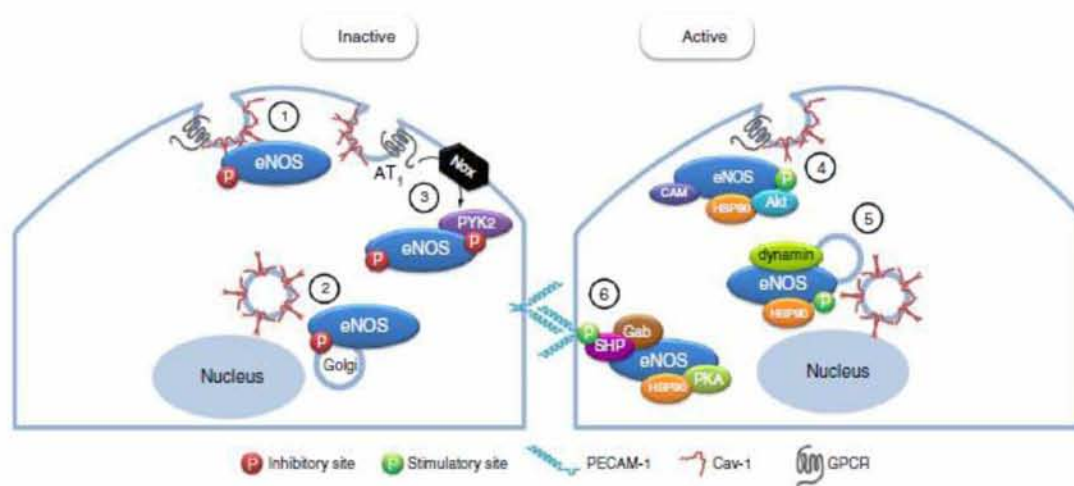


Εικόνα 14. Ρίζες μυριστικού οξέος (14 άτομα C) και παλμιτικού οξέος (16 άτομα C) που χρησιμοποιούνται για την μετα-μεταφραστική τροποποίηση του μορίου της eNOS πρωτεΐνης.

Η μυριστολίωση συμβαίνει στο σύστημα Golgi και φαίνεται ότι γίνεται για να ενισχύσει την ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης σε μεμβράνες [81-82]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για την πρόσδεση της πρωτεΐνης eNOS στην κυτταρική μεμβράνη, γεγονός

απαραίτητο για την δράση της καθώς παύει να βρίσκεται στο κυτοσόλιο [83-84]. Αντίθετα η διαδικασία της παλμιτολίωσης θεωρείται απαραίτητη για να μπορέσει η eNOS να ενεργοποιηθεί από μόρια όπως η βραδυκινίνη [85].

Έτσι φαίνεται ότι υπάρχει πλήθος μηχανισμών και μορίων που είναι απαραίτητα για την φυσιολογική βιοδιαθεσιμότητα του eNOS (εικόνα 15) [79].

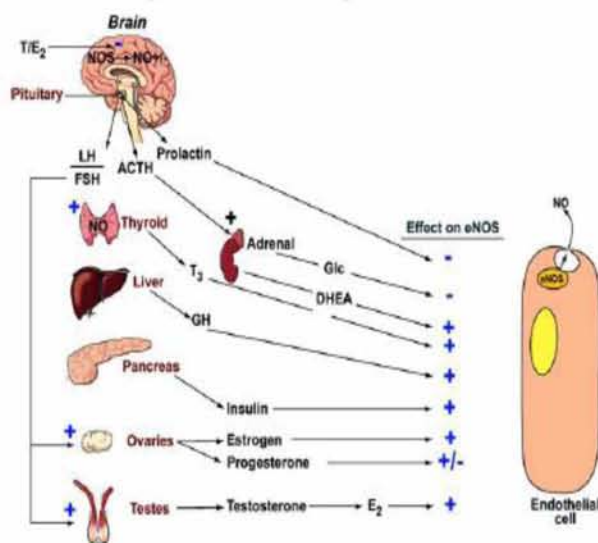


Εικόνα 15. Βήματα ενεργοποίησης της eNOS. Η λειτουργική eNOS πρωτεΐνη είναι ένα διμερές που συνδέεται είτε στην μεμβράνη του Golgi είτε στην πλασματική μεμβράνη. Στην ανενεργή του μορφή η eNOS είναι δεσμευμένη στην πλασματική μεμβράνη μέσω σύνδεσης με την πρωτεΐνη Cav-1 που μειώνει την ενεργότητα του μορίου (1). Επιπλέον η eNOS είναι φωσφορυλιωμένη στην θέση Thr495 (υπό την δράση της PYK-2 επαγόμενη κινάση που εμποδίζει την σύνδεση της με την Cam (2). Επιπρόσθετα, το ένζυμο μπορεί να ανασταλεί και από καταστάσεις οξειδωτικού στρες μέσω NOX-PYK2 (3). Όταν γίνεται ενεργοποίηση του μορίου, η αποφωσφορυλίωση της θέσης 495, οδηγεί στην σύνδεση της Cam, που με την σειρά της επιτρέπει την φωσφορυλίωση της Ser177 (4 και 5). Όταν το ενδοθήλιο υπόκειται σε κατάσταση shear stress, η eNOS μπορεί να προσδένεται στη τοιχωματική κυτταρική μεμβράνη, αλληλεπιδρώντας με την PECAM-1 και την πρωτεΐνη υποδοχέα Gab-1 που επίσης μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση του μορίου (6).

Ορμόνες και eNOS

Έχει βρεθεί πρόσφατα ότι διάφορες ορμόνες τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε παθολογικές καταστάσεις μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή NO. Αυτό μπορεί να γίνει με δύο μηχανισμούς, είτε μέσω φωσφορυλίωσης αμινοξικών καταλοίπων επηρεάζοντας επομένως τον

βαθμό ενεργότητας ή την ικανότητα ενεργοποίησης της πρωτεΐνης eNOS, είτε επηρεάζοντας την μεταγραφή του γονιδίου (εξασκώντας κυρίως δράση στα RRE-repressor response elements), ελέγχοντας επομένως το ποσό του παραγώμενου eNOS [86]. Ορμόνες που αυξάνουν την παραγωγή eNOS είναι τα οιστρογόνα, η ινσουλίνη και η αυξητική ορμόνη. Αντίθετα τα γλυκοκορτικοστεροειδή και η προλακτίνη μειώνουν την παραγωγή του eNOS (εικόνα 16) [86]. Διτός είναι ο ρόλος της προγεστερόνης η οποία υπό διαφορετικές συνθήκες μπορεί να λειτουργήσει είτε διεγερτικά είτε ανασταλτικά ως προς την δράση του eNOS. Αυτό έχει να κάνει μάλλον με τα επίπεδα της ορμόνης καθώς χαμηλές συγκεντρώσεις προγεστερόνης αυξάνουν την ενεργότητα του eNOS, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις της ορμόνης έχουν αντίθετα αποτελέσματα [86].



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση του τρόπου δράσης των ορμονών στην διαθεσιμότητα του eNOS. Η μεταβολή στην παραγωγή του NO μπορεί να γίνει μέσω επηρεασμού του γονιδίου ή όχι. Οι ορμόνες μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα NO είτε μέσω απευθείας δράσης στην ενεργότητα του eNOS, είτε μέσω μεταβολής στην βιοδιαθεσιμότητα των συν-παραγόντων, είτε τέλος μέσω αλλαγής της βιοδιαθεσιμότητας του NO μέσω σύζευξης του με ελεύθερες ρίζες. Ο μηχανισμός μπορεί να γίνει πιο πολύπλοκος καθώς το NO που παράγεται σε όργανα όπως ο εγκέφαλος και ο θυρεοειδής μπορούν να οδηγήσουν στην απελευθέρωση γοναδοτροπινών που με την σειρά τους επηρεάζουν επιπρόσθετα και με άλλους μηχανισμούς την παραγωγή eNOS.

Η συμμετοχή των ορμονών στην διαχείριση του eNOS μπορεί να εξηγήσει εν μέρει γιατί καταστάσεις όπως η γήρανση, μεταβολικά-ενδοκρινολογικά νοσήματα, η εγκυμοσύνη και το στρες χαρακτηρίζονται από μεταβολή των παραγώμενων επιπέδων του.

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ eNOS

Αγγειοδιαστολή και αναστολή της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων.

Η eNOS φαίνεται ότι είναι σημαντική για την ομοιόσταση και ρύθμιση πολλών καρδιαγγειακών λειτουργιών. Το NO που παράγεται από την eNOS, προκαλεί διαστολή όλων των τύπων των αιμοφόρων αγγείων μέσω ενεργοποίησης της γουανιλικής συνθετάσης αυξάνοντας τα επίπεδα του κυκλικού GMP σε όλες τις λείες μυϊκές ίνες [87]. Σε πειραματικά μοντέλα, ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου του eNOS, είχαν ανεξέλεγκτα αυξημένη αρτηριακή πίεση [88-89]. Επιπρόσθετα το NO που απελευθερώνεται μέσα στον αυλό των αγγείων είναι ένας ισχυρός αναστολέας της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα [90-92]. Έτσι εκτός από προστασία έναντι θρόμβωσης, εμποδίζει την απελευθέρωση PDGF (platelet-derived growth factor), η οποία θα προκαλέσει επιπλέον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και του υποκείμενου matrix. Τέλος η eNOS έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητη για την προσαρμοστική αναδιαμόρφωση των αγγείων σε καταστάσεις που απαιτούν αλλαγή στην ροή του αίματος [93].

Αναστολή της συσσώρευσης των λευκοκυττάρων και αγγειακή φλεγμονή.

Το NO που παράγεται από την eNOS ελέγχει την έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην διαδικασία της αθηρωμάτωσης. Καταρχάς το NO μειώνει την έκφραση ενός βασικού χημειοτακτικού παράγοντα, της πρωτεΐνης MCP-1 [94]. Επιπρόσθετα, το NO αναστέλλει την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο τοίχωμα των αγγείων, μέσω καταστολής ή μείωσης ικανότητας του μορίου CD11/CD18 των λευκοκυττάρων (από τα βασικότερα μόρια των λευκοκυττάρων που αναγνωρίζουν συμπληρωματικές δομές στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων [95-96]. Επειδή γενικά η προσκόλληση λευκοκυττάρων στο ενδοθηλιακό τοίχωμα των αγγείων θεωρείται ένα πρώιμο γεγονός στην πορεία της αθηρωμάτωσης, η παρουσία αυξημένων επιπέδων NO φαίνεται ότι μπορεί να προστατεύσει έναντι της αθηρογένεσης. Τέλος το NO μπορεί να αναστείλει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων είτε αυτή επάγεται από τραυματισμό-αγγειακή βλάβη μέσω προφλεγμονωδών κυτταροκινών, είτε από την δράση αθηροσκληρυντικών παραγόντων όπως οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species) και η αγγειοτενσίνη II (AT II, angiotensin II) [97].

Έλεγχος στην διαφοροποίηση των λείων μυικών ινών.

Το NO έχει βρεθεί ότι μπορεί να αναστέλλει τοπικά την σύνθεση του DNA, την μιτογένεση και την διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό των λείων μυικών ινών [98-101]. Αυτό γίνεται πιθανώς μέσω του κυκλικού GMP, ενώ η αδυναμία παραγωγής PDGF από τα αιμοπετάλια, αναστέλλει επιπλέον στον πολλαπλασιασμό των λείων μυικών ινών και την παραγωγή

ινώδους πλάκας [98-99, 102]. Υπό αυτό το πρίσμα, το NO μπορεί να μπλοκάρει και τα προχωρημένα στάδια της αθηρογένεσης . Όλα τα παραπάνω καθιστούν το NO ως ένα ισχυρό αντι-αθηροσκληρυντικό παράγοντα [103].

Αγγειογένεση.

Το NO που παράγεται από το eNOS παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία αγγειογένεσης κυρίως επηρεάζοντας τα επίπεδα διαφόρων αγγειογεννητικών παραγόντων. eNOS-ανεπαρκή ποντίκια παρουσιάζουν έντονα προβλήματα στην ανάπτυξη των πνευμόνων και στην μορφογένεση του πνευμονικού παρεγχύματος, παρουσιάζοντας παθολογοανατομική εικόνα με εκτεταμένη δυσπλασία των τριχοειδών των κυψελίδων προκαλώντας σημαντικό βαθμό πνευμονική υπέρταση και αναπνευστική ανεπάρκεια [104]. Επίσης έχει βρεθεί ότι η δράση της eNOS είναι κρίσιμης σημασίας για τον ασφαλή σχηματισμό δομών αγγειογένεσης μετά από ισχαιμία [105]. Επιπρόσθετα, η θετική επίδραση του eNOS στην επιβίωση των τραυματισμένων ενδοθηλιακών κυττάρων συμβάλλει στην ευκολότερη και γρηγορότερη αγγειογένεση [97].

Ενεργοποίηση των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων.

Ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου της eNOS έχουν εξαιρετικά μειωμένη αγγειογένεση. Αυτό φαίνεται ότι σχετίζεται με αδυναμία διαφοροποίησης των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων. Έτσι η κινητοποίηση των προγονικών αυτών κυττάρων από τον VEGF είναι μειωμένη σε eNOS –ανεπαρκή ποντίκια [106]. Επιπρόσθετα, αν στα ποντίκια αυτά γίνει έγχυση τέτοιων προγονικών κυττάρων αγρίου τύπου, βελτιώνεται η αγγειογένεση ,κάτι όμως

που δεν επιτυγχάνεται με μεταμόσχευση μυελού των οστών. Αυτό δείχνει ότι η κινητοποίηση προγονικών κυττάρων από τον μυελό είναι μειωμένη σε eNOS –ανεπαρκή ποντίκια [106]. Αυτό επιβεβαιώνεται έμμεσα και από την παρατήρηση ότι τα επίπεδα της MMP-9 (matrix metalloproteinase 9, μιας πρωτεΐνης που θεωρείται απαραίτητη για την κινητοποίηση των προγονικών κυττάρων από το μυελό των οστών) είναι μειωμένα σε eNOS –ανεπαρκή ποντίκια [106]. Φαίνεται δηλαδή ότι το eNOS εξασκεί επιρροή στα προγονικά κύτταρα.

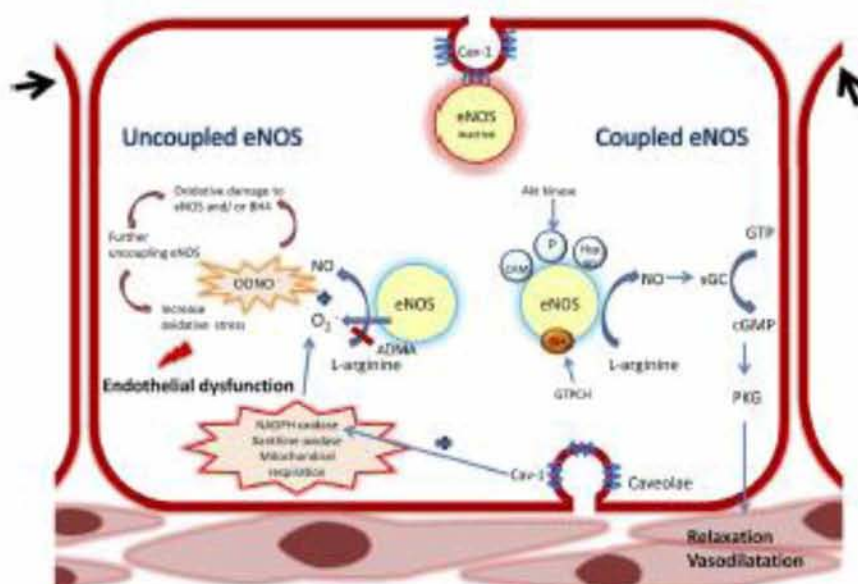
Σε ασθενείς με ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια έχει βρεθεί ότι η δραστικότητα της eNOS είναι μειωμένη και αυτό πιθανώς αντανακλά στην μειωμένη ικανότητα νεοαγγειογένεσης [11, 106]. Επίσης, κύτταρα μυελού των οστών που πάρθηκαν από ασθενείς με ισχαιμική καρδιακή νόσο είχαν μειωμένη ικανότητα in vivo να προάγουν νεοαγγείωση. Αντίθετα να προεπώασεις τα κύτταρα αυτά με ουσίες που προκαλούν ενεργοποίηση της eNOS όπως η 4-φθόρο-N-ινδαλ-2-υλοβενζαμίνη, τότε βελτιώνεται κατά πολύ η ικανότητα των κυττάρων αυτών να προάγουν νεοαγγείωση, ενώ η χορήγηση ουσιών-αναστολέων της eNOS, όπως η NG-νίτρο-L-αργινίνη μειώνει κατά πολύ την επαγωγική ικανότητα νεοαγγείωσης [107-108]. Η χορήγηση ενεργοποιητών eNOS έχει επιχειρηθεί να χρησιμοποιηθεί ως φαρμακευτικό όπλο αύξησης της νεοαγγείωσης σε ασθενείς με ισχαιμικό καρδιακό επεισόδιο [108]. Επιπρόσθετα με μηχανισμό όχι απόλυτα κατανοητό έχει βρεθεί ότι και η σιμβαστατίνη μπορεί να λειτουργήσει επίσης ως ενισχυτής της δράσης της eNOS, αυξάνοντας τον αριθμό των ενεργών προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων σε ασθενείς μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου [109]

Γονιδικακή θεραπεία με eNOS.

Η γονιδικακή θεραπεία αναφέρεται στην εισαγωγή ειδικού γονιδίου σε άτομο-ξενιστή ικανό να παρέμβει στην παθοφυσιολογία της νόσου. Έτσι η προσπάθεια γονιδικής θεραπείας με eNOS χορήγηση έχει τύχει αντικείμενο έντονων πειραματικών μελετών, καθώς υπάρχουν πολλές παθήσεις, κυρίως καρδιαγγειακές που σχετίζονται με μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου αυτού. Σε ορισμένα πειραματικά ζωικά μοντέλα, σε ποντίκια με καρδιακή ισχαιμία, υπερπλασία του έσω χιτώνα ή επαναστενώσεις, φαίνεται ότι η ενσωματώση του γονιδίου της eNOS, αναστέλλει την πορεία υπερπλασίας του αγγειακού χιτώνα και ενισχύει την επανα-ενδοθηλία στα τραυματισμένα ή θρομβωμένα αιμοφόρα αγγεία [110-111]. Ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να αποδειχθεί αν μπορεί να εφαρμοσθεί η παραπάνω παρατήρηση ως θεραπευτική προσέγγιση ασθενούς με καρδιαγγειακή νόσο.

eNOS ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Υπό φυσιολογικές συνθήκες το ενεργοποιημένο μόριο του eNOS, οδηγεί στην παραγωγή NO, το οποίο εν συνεχεία προάγει την βιολογική του δράση. Η δράση αυτή είναι γνωστή ως συζευγμένη μορφή eNOS (coupled eNOS). Αντίθετα, στις περισσότερες παθολογικές καταστάσεις, εκτός από την διαφορετική λειτουργική ικανότητα του μορίου eNOS, συμβαίνει και μια άλλη βιολογική τροποποίηση που λέγεται διαδικασία αποσύνδεσης του eNOS (uncoupled eNOS), δηλαδή αδυναμία φυσιολογικής βιοδιαθεσιμότητας του NO (εικόνα 17) [112].



Εικόνα 17. Κεντρικός ρόλος της διαδικασίας αποσύνδεσης του eNOS. Στην παθογένεια διαφόρων νοσημάτων. Μετά από την ενεργοποίηση του eNOS δημιουργείται ένα σύμπλεγμα της πρωτεΐνης με την CAM και την Hsp90 και με κατάλληλες θέσεις φωσφορυλιωμένες. Η τετραυδροβιοπτερίνη (BH4) είναι ένας απαραίτητος συμπαραγόντας για την ενεργότητα του eNOS καθώς βοηθάει την μεταφορά-ροή των ηλεκτρονίων από την περιοχή της ρεδοукτάσης στην περιοχή της οξυγενάσης (με την συν-βοήθεια και του NADPH) έτσι ώστε τελικά η L-αργινίνη να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή NO. Σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις υπάρχει είτε 1. μειωμένη απόδοση υποστρώματος L-αργινίνης. 2. μειωμένη ποσότητα ή δραστηριότητα BH4. 3. αυξημένη δραστηριότητα ενός ενδογενούς αναστολέα του eNOS που λέγεται ADMA (asymmetric Dimethylarginine). Το τελικό αποτέλεσμα είναι η μειωμένη παραγωγή NO με σύγχρονη αυξημένη παραγωγή O₂, κάτι που οδηγεί στην παραγωγή διαφόρων ριζών όπως της OONO⁻ και επομένως στην αύξηση του οξειδωτικού στρες, συντελώντας στην προαγωγή της νόσου (ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, φλεγμονή, καρκινογένεση κα).

Αθηροσκλήρυνση και θρομβώσεις.

Εκτός από την προαγωγή της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, η ανεπάρκεια NO έχει βρεθεί ότι αυξάνει την αθηροσκληρυντική επιβάρυνση των αγγείων σε in vivo μελέτες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το NO ασκεί αθηροπροστατευτική δράση μέσω διαφόρων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων της μείωσης της απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων και της αναστολής της έκφρασης του NF- κ B και άλλων γονιδίων που προάγουν την φλεγμονή [113]. Ένας άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου το NO εμποδίζει την αθηρογένεση είναι η εξασθένηση της ικανότητας προσκόλλησης των λευκοκυττάρων στο ενδοθηλιακό τοίχωμα των αγγείων [96].

Η ανεπάρκεια BH₄, που αποτελεί κοινό εύρημα σε ασθενείς με αγγειακή νόσο, οδηγεί στην αποσύνδεση NO (uncoupling NO), στο αγγειακό σύστημα, οδηγώντας στην παραγωγή O₂⁻ και στην μειωμένη παραγωγή NO και επομένως η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του BH₄ μπορεί να προάγει την αθηρογένεση. Σε μια πρόσφατη μελέτη, προσδιορίστηκε ο βαθμός αθηροσκλήρυνσης σε knock out ποντίκια για απολιποπρωτεΐνη E (ApoE-NO) τα οποία διασταύρωσαν με ποντίκια που υπερεκφράζουν eNOS (eNOS-Tg) και διαπίστωσαν ότι ο βαθμός και ο αριθμός της αθηρωμάτωσης ήταν αυξημένος στα ApoE-NO/ eNOS -Tg ποντίκια σε σχέση με τα ApoE-NO [114]. Αυτό το εύρημα αποδόθηκε στην αποσύνδεση NO, λόγω μειωμένης βιοδιαθεσιμότητας BH₄ κάτι που αποδείχθηκε και πειραματικά καθώς υβριδικά ApoE-NO / GTP-CH Tg ποντίκια, δηλαδή ποντίκια ApoE-NO που διασταυρώθηκαν με άλλα που εξεύραζαν GTP-κυκλοξυγενάση I, (ένα

ένζυμο που αυξάνει την παραγωγή BH₄), δεν εμφάνιζαν αθηρωματικές αλλοιώσεις [114].

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία έχει επίσης εμπλακεί στην βιολογία της αθηροσκλήρυνσης ιδιαίτερα σε άτομα με υπερχοληστερολαιμία. Αρκετές μελέτες σε πειραματικά μοντέλα δείχνουν ότι η αυξημένη τιμή χοληστερίνης μπορεί να μειώσει την παραγωγή και την ενεργοποίηση της eNOS [115-116], καθώς και ότι μπορεί να γίνει μικρή αναστροφή της πορείας αυτής με χορήγηση διατροφικών συμπληρωμάτων L-αργινίνης [117-118].

Η ανεπάρκεια eNOS καθώς και η μειωμένη δραστικότητα αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως το σύστημα της γλουταθειόνης, φαίνεται ότι αποτελούν αποδείξεις για την αντιθρομβωτική ικανότητα του NO σε *in vivo* μελέτες ατόμων με αγγειακές παθήσεις και εγκεφαλικά επεισόδια [119]. Η πρώτη άμεση απόδειξη ότι η ανεπάρκεια NO, μπορεί να προάγει αρτηριοθρομβωτική νόσο, προέρχεται από την μελέτη δύο αδελφιών που παρουσίασαν σε νεαρή ηλικία αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Τα άτομα αυτά βρέθηκε να έχουν υπερ-αντιδραστικά αιμοπετάλια, τριπλάσια επίπεδα υπεροξειδίου του οξυγόνου (H₂O₂) στο αίμα και μειωμένη δραστικότητα ενός ενζύμου, του GPx-3 (ένζυμο το οποίο μειώνει τα επίπεδα H₂O₂ και οξειδωσης των λιπιδίων και επομένως ασκεί προστατευτική δράση στα κύτταρα) [120]. Νεότερες μελέτες έδειξαν ότι το ένζυμο αυτό (που παράγεται στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια των νεφρών) μπορεί να επηρεάζει την διαθεσιμότητα του NO, ασκώντας προστατευτική δράση [121]. Αυτό αποδείχθηκε ότι ισχύει αργότερα όχι μόνο σε ασθενείς με αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια αλλά και ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου [122] ή σε άτομα με αγγειακές θρομβώσεις [123].

Υπέρταση.

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που χαρακτηρίζει άτομα με αυξημένη αρτηριακή πίεση φαίνεται ότι οφείλεται εν μέρει στην ανισορροπία στην παραγωγή ROS και στην μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO [124-126]. Η eNOS διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο στην βιοδιαθεσιμότητα του NO, το οποίο συμβάλει στην ενδοθηλιακή λειτουργία. Αυτό που έχει παρατηρηθεί είναι ότι στις περισσότερες περιπτώσεις που υπάρχει ενδοθηλιακή δυσλειτουργία ως αποτέλεσμα έντονου οξειδωτικού στρες υπάρχει αυξημένη παραγωγή eNOS [127-128].

Μελέτες επίσης έχουν δείξει ότι παρόμοια με την αθηρογένεση, και σε πειραματικά μοντέλα με υπέρταση υπάρχει και εδώ μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του συν-παράγοντα BH₄, που προκαλεί και εδώ αποσύνδεση NO και παραγωγή ριζών οξυγόνου [129-130]. Αν και αρκετές μελέτες δείχνουν ότι και εδώ η χορήγηση συμπληρωμάτων L-αργινίνης μπορεί να βελτιώσει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και να μειώσει την πίεση [131-132], οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος της L-αργινίνης σε άτομα με υπέρταση φαίνονται φυσιολογικές και επομένως δεν φαίνεται να αποτελεί το βασικό αίτιο μειωμένης βιοδιαθεσιμότητας του NO [133]. Αντίθετα φαίνεται ότι αυτό γίνεται μέσω μειωμένης σύνδεσης του BH₄ στο μόριο του eNOS, λόγω εξάντλησης του από την αυξημένη συγκέντρωση OONO⁻ που παράγεται εξαιτίας υπερδραστηριότητας της NADPH-οξειδάσης [134-135].

Σακχαρώδης Διαβήτης.

Παρόμοια με την υπέρταση, η παραγωγή ROS και η οξειδοαναγωγική ανισοροπία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη αγγειακή δυσλειτουργία των ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη [136-137]. Αυξημένα επίπεδα O_2^- έχουν παρατηρηθεί σε διαβητικά ποντίκια [138-139] το οποίο εν συνεχεία επιβεβαιώθηκε και σε διαβητικούς ασθενείς [140]. Φαίνεται ότι η υπεργλυκαιμία προάγει την παραγωγή O_2^- από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [141]. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην δράση στα ελεύθερα λιπαρά οξέα, στην προαγωγή της γλυκόζυλωσης ορισμένων προιόντων [141].

Η ενεργοποίηση της NADPH-οξειδάσης έχει βρεθεί ότι αποτελεί την σημαντικότερη πηγή ROS τόσο σε άτομα με υπεργλυκαιμία όσο και σε διαβητικά ποντίκια (μέσω PKC και PI3KD) οδηγώντας στην υπερπαραγωγή ROS [142-144]. Επιπρόσθετα, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα επίσης επάγουν την παραγωγή ROS από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [145-146]. Σε μελέτες σε ποντίκια βρέθηκε επίσης ότι πιθανώς σε όλα αυτά να υπάρχει συνεργική δράση και από το ένζυμο G6PD, η ενεργότητα του οποίου είναι αυξημένη σε διαβητικά ζώα [147].

Αυτοάνοσα νοσήματα.

Ο ρόλος του NO στην παθογένεια των αυτοανόσων νοσημάτων ανακαλύφθηκε πριν από μια δεκαετία. Η υπερπαραγωγή του NO θα μπορούσε να συμβάλει στην ιστική βλάβη δεδομένης της ικανότητας του να αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα, να οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων τοξικών ριζών όπως το υπεροξει-νιτρικό και να επάγει κυτταροτοξικότητα [148-149]. Η φυσιολογική ενδοθηλιακή λειτουργία χαρακτηρίζεται από μια

δυναμική ισορροπία μεταξύ NO και οξειδωτικών ουσιών. Αυξημένη παραγωγή NO λόγω ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας έχει μελετηθεί καλά σε πειραματικά ζωικά μοντέλα σε άτομα με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο (ΣΕΛ) [150-153]. Ομοίως, η αυξημένη συγκέντρωση NO έχει συσχετισθεί με την σοβαρότητα της νόσου ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ), καθώς το NO θεωρείται βασικός διαμεσολαβητής που επάγει απόπτωση μέσα στην άρθρωση [154-155]. Επιπρόσθετα, αυξημένα επίπεδα NO έχουν μελετηθεί και σε ασθενείς με αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα Hashimoto [156].

Ο βαθμός του οξειδωτικού στρες σχετίζεται με την ενεργότητα της νόσου σε άτομα με ΣΕΛ και ΡΑ [157]. Σε πειραματικά μοντέλα έχει βρεθεί ότι η αναστολή της δράσης του NO μειώνει σημαντικά την ενεργότητα της νόσου της ΡΑ [158]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ισομορφή που είναι υπεύθυνη για την αυξημένη παραγωγή του NO στα αυτοάνοσα νοσήματα είναι η ενδοθηλιακή μορφή eNOS [159]. Τέλος, το γονιδιακό screening σε άτομα με ΣΕΛ έχει αναδείξει πολλές χρωμοσωμικές περιοχές (susceptibility loci) που σχετίζονται με την παθογένεια της νόσου, και μια από αυτές είναι η χρωμοσωμική θέση που εδράζεται το γονίδιο eNOS [160-161].

Παθολογική έκφραση του eNOS έχει επίσης καταγραφεί και σε ασθενείς με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, συμπεριλαμβανομένων νόσο Αδαμαντιάδη, αγγειίτιδες, πρωτοπαθή χολική κίρρωση, ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη, αλωπεκία κλπ [162]. Με βάση όλα τα παραπάνω ευρήματα, η περαιτέρω μελέτη του eNOS φαίνεται να αποχτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την κατανόηση της παθογένειας των αυτοάνοσων νοσημάτων.

eNOS, ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

Δράσεις της eNOS στον καρκίνο.

Η eNOS μέσω του παραγόμενου από αυτήν NO, μπορεί να ασκήσει σημαντική δράση σε διάφορα στάδια της καρκινογένεσης. Έτσι η παρουσία της έχει συσχετισθεί με διάφορες διαδικασίες που προάγουν την καρκινογένεση όπως η αγγειογένεση, η απόπτωση, η διεισδυτικότητα, η μεταστατικότητα και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου [163].

Σε γενικές γραμμές τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι το παραγόμενο NO έχει ευρεία επίδραση στην βιολογία του όγκου και εμπλέκεται σε βιολογικές διεργασίες που αφορούν τον κυτταρικό μετασχηματισμό, την δημιουργία ογκογόνων εστιών και την μεταστατικότητα ενός όγκου. Καταρχάς το NO έχει άμεση τοξική επίδραση στο γενετικό υλικό του κυττάρου [164]. Μπορεί να προάγει δημιουργία μεταλλάξεων, να προκαλέσει χρωμοσωμικές βλάβες και να καταστείλει του μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών του DNA [58, 165-167]. Επιπρόσθετα το NO έχει συσχετισθεί με προαγωγή της σημειακής μετάλλαξης GC σε AT στο γονίδιο της p53 με αποτέλεσμα καταστροφή της φυσιολογικής-ογκοκατασταλτικής του δραστηριότητας [168]. Το NO επίσης προκαλεί άμεση αναστολή της δράσης των κασπασών, πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον μηχανισμό της απόπτωσης [168]. Άλλες αντι-αποπτωτικές δράσεις του NO φαίνεται ότι είναι η (ρυθμιζόμενη μέσω συστήματος c-GMP) αναστολή της δράσης του κυτοχρώματος C, η αύξηση της έκφρασης του Bcl-2 γονιδίου που εκτός των άλλων ελέγχει και την μιτοχονδριακή διαπερατότητα, η επαγωγή πρωτεϊνών θερμικού σοκ (κυρίως οι HSP-70 και HSP-32) η καταστολή της παραγωγής

κηραμιδίου και τέλος η ενεργοποίηση της κυκλο-οξυγενάσης 2 (COX-2) [169-170]. (Πίνακας ...).

Το NO επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στην πορεία της καρκινογένεσης και μέσω ρύθμισης της αγγειογένεσης. Το eNOS προάγει την αυξημένη ροή του αίματος προς τον όγκο μέσω διαστολής των αιμοφόρων αρτηριολίων [171]. Επιπρόσθετα μειώνει την ικανότητα προσκόλλησης των λευκοκυττάρων στο ενδοθηλιακό τοίχωμα ενώ αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα [171]. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο παραγόμενος από κύτταρα του όγκου VEGF, χρειάζεται ένα λειτουργικό NO/c-GMP μονοπάτι μέσα στα κύτταρα προκειμένου να προωθήσει την νέο-αγγειογένεση [168, 171]. Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο το παραγόμενο από eNOS μονοξείδιο του αζώτου προάγει την αγγειογένεση είναι μέσω ενεργοποίησης της COX-2 η οποία με την σειρά της διεγείρει την παραγωγή προσταγλαδινών και άλλων αγγειογενετικών παραγόντων [168]. (Πίνακας 1)

Επιπλέον, το NO μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη του όγκου μέσω ενίσχυση της παραγωγής μεταλλοπρωτεϊνών (MMP-matrix metalloproteinases) κυρίως τις MMP-2 και MMP-9 καθώς και μείωση της παραγωγής/δράσης των αναστολέων των MMP (TIMP- tissue inhibitors of MMPs) κυρίως της TIMP-2 και πιθανώς και της TIMP-3 [172]. Τέλος μελέτες δείχνουν ότι το NO μπορεί να μειώσει την ανοσολογική απόκριση προς τα καρκινικά κύτταρα μέσω αναστολής της ικανότητας διαφοροποίησης των λευκοκυττάρων και μέσω αυτού του μηχανισμού μπορεί να εμπλέκεται στην ανάπτυξη και εξάπλωση του όγκου [58]. (Πίνακας 1)

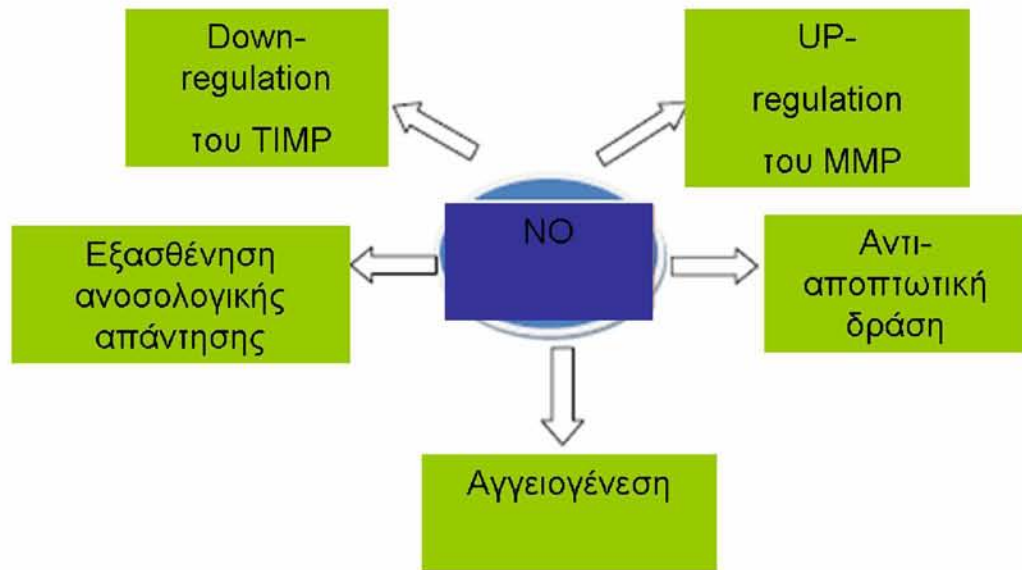
Νεότερα όμως δεδομένα δείχνουν ότι η δράση του eNOS θα μπορούσε να χαρακτηριστεί και ως διχοτομική διότι εκτός από την σαφή επίδραση της στην προαγωγή του καρκίνου, φαίνεται ότι μπορεί υπό ορισμένες συνθήκες να έχει και αντίθετο δηλαδή προστατευτικό ρόλο. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι το NO μπορεί να ασκήσει κυτταροστατική ή/και κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα καθώς περιορίζει την λειτουργικότητα της κυτταρικής αναπνοής και επηρεάζει το μεταβολισμό του σιδήρου, ενώ συγχρόνως καταστέλλει την DNA σύνθεση, μπορεί να επάγει παραγωγή p53 και την

| ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ NO | ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΠΡΟΑΓΟΥΝ ΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ |
|---|--|
| Τοξικότητα | <ul style="list-style-type: none"> • σχηματισμός τοξικών ουσιών • προαγωγή μεταλλάξεων • απευθείας δράση στην έλικα του DNA με ρωγμές, οξειδωση και απαμίνωση των αμινοξέων • αναστολή του συστήματος επιδιόρθωσης των βλαβών στο DNA |
| Αντι-αποπτωτική δράση | <ul style="list-style-type: none"> • σημειακή μετάλλαξη GC→AT στο γονίδιο του p53 προκαλώντας αναστολή της κατασταλτικής του ικανότητας. • αναστολή της λειτουργίας του κυτοχρώματος C • ενίσχυση της έκφρασης του Bcl-2 γονιδίου • καταστολή της αναγέννησης του κεραμιδίου • ενεργοποίηση των κυκλοοξυγενασών |
| Προαγωγή της αγγειογένεσης (μέσω eNOS αλλά και μέσω iNOS) | <ul style="list-style-type: none"> • διαστολή των αιμοφόρων αγγείων • αυξημένη παραγωγή VEGF και αύξηση της διαπερατότητας του αγγειακού επιθηλίου. • αύξηση της παραγωγής PGE2 που επηρεάζει την αγγειακή διαπερατότητα • Ενεργοποίηση του COX-2 που προκαλεί παραγωγή προσταγλαδινών και αγγειογενετικών παραγόντων |

| | |
|---------------------------------------|--|
| Εξασθένηση της ανοσολογικής απάντησης | <ul style="list-style-type: none"> • καταστολή της διαδικασίας ενεργοποίησης και διήσδησης των λευκοκυττάρων |
| Προαγωγή μεταστάσεων | <ul style="list-style-type: none"> • προαγωγή λεμφαγγειογένεσης και διασποράς προς τους λεμφαδένες, πιθανώς διαμέσω VEGF-C • Ρύθμιση προς τα πάνω της έκφρασης MMP-2 και MMP-9 • Ρύθμιση προς τα κάτω της παραγωγής TIMP-2 και TIMP-3 |

Πίνακας 1. Μηχανισμοί με τους οποίους το παραγώμενο από eNOS μονοξειδίο του αζώτου μπορεί να οδηγήσει σε προαγωγή της καρκινογένεσης

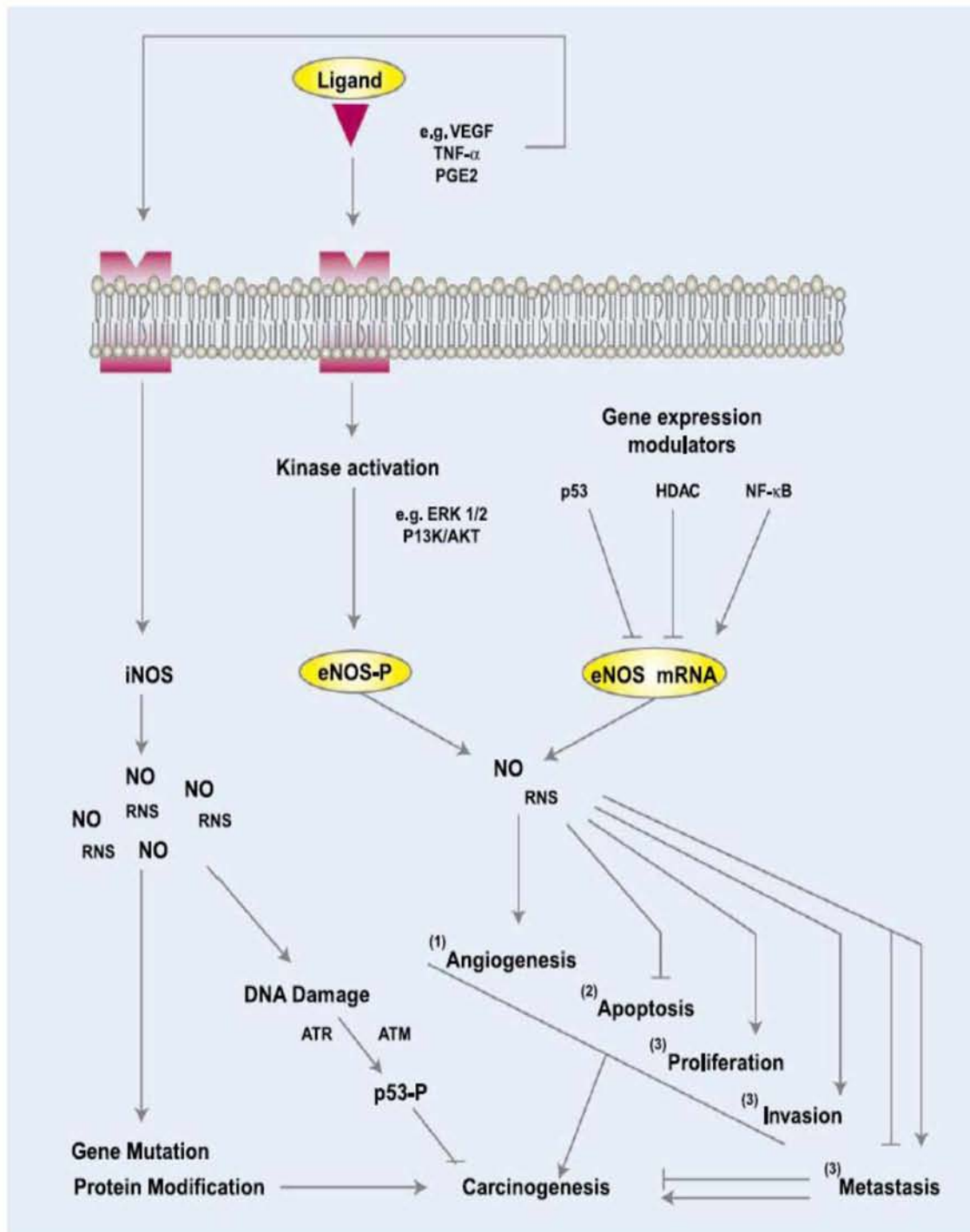
παραγωγή πρωτεϊνών που προάγουν την απόπτωση [168]. Επίσης φαίνεται ότι οδηγεί σε υπερέκφραση σημαντικών ογκο-προστατευτικών ενζύμων όπως η πόλυ-(ADP ριβόζη) πολυμεράση (PARP, poly-ADP-ribose-polymerase) και η DNA εκαρτώμενη κινάση πρωτεϊνών (DNA-PK) ενώ παράλληλα προάγει την απόπτωση [173-174]. Έτσι η σαφή κατανόηση του ακριβούς ρόλου της eNOS στην βιολογία του καρκίνου θα βοηθήσει στην μείωση της σύγχυσης και πιθανώς να οδηγήσει στην ανάπτυξη θεραπειών που θα αποδειχθούν χρήσιμες στην πρόληψη και θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου.



Σχήμα 18. Πιθανοί παθογενετικοί ρόλοι του NO στην ανάπτυξη του όγκου.

eNOS σε διάφορες μορφές καρκίνου

Το επαγόμενο από eNOS, NO έχει μελετηθεί σχετικά με τον ρόλο του στην προαγωγή καρκινογένεσης σε διάφορα όργανα [175-178]. Στην συνέχεια θα αναφερθούν συνοπτικά τα κυριότερα ευρήματα που αφορούν την δράση της eNOS σε διάφορες μορφές καρκίνου δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στον καρκίνο του μαστού.



Εικόνα 19. Σύνδεση μεταξύ eNOS και καρκινογένεσης. Η eNOS μπορεί να ενεργοποιηθεί είτε από μετα-μεταφραστική τροποποίηση του μορίου της (από φωσφορυλίωση μέσω των κινασών ERK1/2 και P13K/AKT) ή μέσω υπέρμετρης μεταγραφής του γονιδίου της υπό την δράση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF-κB). Ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον η απελευθέρωση χαμηλών συγκεντρώσεων NO μπορεί να διεγείρει την αγγειογένεση, να αναστείλει την απόπτωση ή να ενισχύσει τον πολλαπλασιασμό και την διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων, ενώ πιθανώς να επηρεάζει και την μεταστατικότητα τους. Αντίθετα το NO που παράγεται από την iNOS (σε υψηλότερες συγκεντρώσεις) μπορεί να αναστείλει ή να περιορίσει την πορεία προς την καρκινογένεση, ενώ εναλλακτικά οι ρίζες RNS που παράγονται μπορούν να επάγουν γονιδιακές μεταλλάξεις ή επιβλαβείς τροποποιήσεις πρωτεϊνών. (1) εκτενή και επιβεβαιωμένα πειραματικά δεδομένα. (2) επαρκή πειραματικά δεδομένα. (3) λίγα πειραματικά δεδομένα [163].

Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο καρκίνος του τραχήλου επάγεται από μια σειρά από παράγοντες κινδύνου όπως το κάπνισμα, η πολυτοκία, η μακροχρόνια χρήση αντισυλληπτικών, η χρόνια φλεγμονή και τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα (*Chlamydia trachomatis*, HSV-2) [179]. Όλοι αυτοί οι παράγοντες φαίνεται ότι δρουν μέσω προαγωγής της παραγωγής NO στο μικροπεριβάλλον του τραχήλου [180-182]. Επιπρόσθετα, στον ορό ασθενών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έχουν παρατηρηθεί υψηλότερα επίπεδα NO, σε σύγκριση με υγιή άτομα [183-184], ενώ σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης eNOS και του ποσοστού NO-επαγόμενων μεταλλάξεων του γεννητικού υλικού [185-186]. Τέλος, το παραγόμενο από την eNOS NO λειτουργεί ως ένας συν-παράγοντας (co-factor) που ενισχύει την δράση του ιού του ανθρώπινου θηλώματος (HPV) προάγοντας την καρκινογένεση [187-188].

Καρκίνος του πνεύμονα.

Το κάπνισμα όπως είναι γνωστό αποτελεί την κυριότερη αιτία καρκίνου του πνεύμονα, οδηγώντας σε χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών με συσσώρευση και ενεργοποίηση λευκοκυττάρων που παράγουν ROS και NO [189-190]. Έχει βρεθεί ότι ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα έχουν αυξημένα επίπεδα NO, νιτρωδών (nitrite) και νιτροτυροσίνης σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό [191]. Επίσης τα ποσά του ανιχνεύσιμου NO σε καρκινικούς ιστούς πνεύμονα είναι υψηλότερα σε καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές [192], ενώ υψηλή ανοσοδραστικότητα έναντι eNOS

παρατηρήθηκε ακόμη και σε δυσπλαστικές περιοχές του πνευμονικού παρεγχύματος [193]. Τέλος το ποσοστό του εκπνεόμενου NO μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη δοκιμασία για την διάγνωση και εξέλιξη της νόσου [194].

Το παραγόμενο NO, μπορεί να προάγει την καρκινογένεση στο πνεύμονα μέσω διαδικασίας νίτρωσης (nitration- δηλαδή προσθήκη μιας νιτρικής ομάδας) των πρωτεϊνών [195-196]. Η νίτρωση είναι μια από τις τροποποιήσεις που μπορούν να παρατηρηθεί σε πρωτείνες υπό συνθήκες οξειδωτικού/νιτρωσικού stress [196-197]. Αυτή γίνεται κατά κύριο λόγο σε κατάλοιπα τυροσίνης. Επομένως πρωτείνες που διαθέτουν υψηλό ποσοστό τυροσινών στην αμινοξική τους αλληλουχία ή στο ενεργό τους κέντρο, μπορούν να αδρανοποιηθούν λόγω έντονης νίτρωσης. Μια τέτοια πρωτεΐνη είναι και η p53 και μελέτες έδειξαν ότι πάνω από 90 % των όγκων του πνεύμονα συνοδεύονται από ελλειμματική λειτουργικότητα της p53 [190, 198].

Συγκεντρωτικά, φαίνεται ότι η υπερέκφραση NO (μέσω eNOS αλλά και iNOS) μπορεί να επηρεάσει το αντι-οξειδωτικό δυναμικό του πνεύμονα, μειώνοντας την ενεργότητα σημαντικών πρωτεϊνών (πχ p53), ή προάγοντας την γλυκόλυση και την αγγειογένεση και γενικά δημιουργεί ένα μικροπεριβάλλον που ευνοεί την καρκινογένεση και πιθανώς την μεταστατικότητα του όγκου [190].

Γαστρικός Καρκίνος.

Ο καρκίνος του γαστρεντερικού συστήματος παραμένει ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας παγκοσμίως. Διάφοροι αιτιολογικοί παράγοντες έχουν συνδεθεί με την νόσο, όπως η λοίμωξη με το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού

(*Helicobacter pylori*) καθώς και διαιτητικές συνήθειες, κάπνισμα και κατανάλωση οινόπνεύματος [199].

Στον γαστρεντερικό σωλήνα έχει βρεθεί ότι φυσιολογικά υπάρχει έκφραση και των τριών ισομορφών του NOS, eNOS, iNOS αλλά και nNOS [200]. Σε μελέτες φαίνεται ότι υπάρχει αυξημένη έκφραση eNOS αλλά και iNOS στον καρκίνο του παχέος εντέρου, ενώ σε ιστούς από ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου ανιχνεύονται μεγάλα ποσά mRNA της NOS [201].

Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και στον καρκίνο του στομάχου, ο οποίος είναι μια διαδικασία που ξεκινάει από χρόνια ατροφική γαστρίτιδα (CAG, chronic atrophic gastritis), δυσπλασία (DYS, dysplasia), εντερική μεταπλασία (IM, intestinal metaplasia) μέχρι να καταλήξουμε στην γαστρική καρκινογένεση (GC, gastric carcinogenesis) [202]. Σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι καθώς προχωράμε από το φυσιολογικό προς το καρκινικό επιθήλιο: normal→CAG→DYS→IM→GC υπάρχει μεγαλύτερο ποσοστό έκφρασης NOS σε μελέτες ανοσοϊστοχημείας, και επιπρόσθετα υπάρχει θετική συσχέτιση με την έκφραση p53 και VEGF.

Η σχέση μεταξύ καρκίνου του στομάχου και *H. pylori* έχει αποδειχθεί και από επιδημιολογικά δεδομένα αλλά και από πειραματικά μοντέλα [203-205]. Η υπερπαραγωγή NO φαίνεται ότι είναι ένας σημαντικός παθογόνος παράγοντας που προκαλεί την αρχική γαστρίτιδα, ενώ στην πορεία της νόσου μέσω παραγωγής ROS μπορεί να δημιουργηθούν μεταλλάξεις που προάγουν την καρκινογένεση [205]. Επίσης στον καρκίνο του στομάχου υπάρχει αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων στο γονίδιο της p53 [206], και είναι επίσης γνωστό ότι σημειακές μεταλλάξεις C→T στο γονίδιο του p53 μπορούν να επάγονται από NO. Με βάση λοιπόν τα δεδομένα αυτά θα

μπορούσαμε να πούμε ότι το H. Pylori μπορεί να οδηγήσει σε γαστρική καρκινογένεση μέσω υπερπαραγωγής NO.

Καρκίνος του Εγκεφάλου.

Το NO επηρεάζει όπως έχει προαναφερθεί διάφορες ζωτικές λειτουργίες του εγκεφάλου συμπεριλαμβανομένου του αγγειακού τόνου και της νευροδιαβίβασης. Το NO αυτό παράγεται κυρίως από την δράση της nNOS και έτσι η ισομορφή αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης του βαθμού διαφοροποίησης όγκων του εγκεφάλου. Παρόλα αυτά σε μια μελέτη σε ασθενείς με κακοήγη νεοπλασμάτα του κεντρικού νευρικού συστήματος διαπιστώθηκε μια υπερέκφραση και των τριών ισομορφών του NOS ενζύμου, με απροσδόκητα υψηλά επίπεδα NO και NADPH διαφοράσης (ενός ιστοχημικού δείκτη της ενεργότητας του NO) και επομένως το NO θα μπορούσε να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην παθοφυσιολογικές διεργασίες που προάγουν την ανάπτυξη στους όγκους αυτούς [177].

Καρκίνος Κεφαλής και Τραχήλου.

Αποτελεί την έκτη πιο σημαντική στατιστικά κακοήθεια με υψηλό ποσοστό θνησιμότητας [207]. Η εμφάνιση του καρκίνου αυτού έχει συσχετισθεί με συνήθειες όπως το κάπνισμα και το μάσημα του καπνού. Παρόμοια με τον καρκίνο του πνεύμονα, είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι και εδώ ο καπνός μπορεί να διαταράξει μέσω υπερπαραγωγής NO το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα και να προάγει καρκινογένεση, ενώ η βλάβη στο γονιδίωμα από μεταλλάξεις εξαιτίας παρουσίας ROS/RNS ριζών θα μπορούσε να είναι ένας άλλος μηχανισμός. Σε πρόσφατες μελέτες διαπιστώθηκε ότι ασθενείς με πρώιμα στάδια καρκίνου οισοφάγου έχουν

αυξημένα επίπεδα ριζών NO₂ και NO₃. Το ίδιο συμπέρασμα προέκυψε επίσης και από μελέτη υγιών ατόμων με συνήθεια μασίματος καπνού σε σχέση με αυτούς με έλλειψη της παραπάνω συνήθειας. Ως εκ τούτου η μέτρηση του NO θα μπορούσε να αποκτήσει κλινική σημασία ως βιοδείκτης εκτίμησης του κινδύνου καρκινογένεσης σε ασθενείς με προκαρκινωμάτωσης βλάβες ή στους υγιείς χρήστες καπνού.

Η πρόσληψη οιοπνεύματος επίσης έχει συσχετισθεί με καρκίνο του στόματος. Σε μια πρόσφατη μελέτη υποστηρίζεται ότι η διέγερση της παραγωγής NO από την αιθανόλη μπορεί να παίζει σημαντικό παθοφυσιολογικό ρόλο [208]. Γενικά όμως είναι πολύ λίγες οι μελέτες εκείνες που υποστηρίζουν κάποιο σαφή ρόλο του NO στην ανάπτυξη καρκίνου κεφαλής και τραχήλου, παρά ίσως στα αρχικά φλεγμονώδη-προκαρκινικά στάδια.

Καρκίνος του μαστού.

Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνή μορφή καρκίνου σε γυναίκες τόσο σε αναπτυγμένες όσο και σε αναπτυσσόμενες χώρες. Ο ρόλος του NO έχει μελετηθεί διεξοδικά καθώς φαίνεται ότι συμμετέχει στην προώθηση του καρκίνου του μαστού. Αυξημένη έκφραση της eNOS και αυξημένη παραγωγή NO έχει παρατηρηθεί τόσο σε καρκινικούς ιστούς όσο και σε κυτταρικές σειρές από κύτταρα μαστικού καρκινώματος. Αυξημένα όμως επίπεδα NO έχουν βρεθεί και στο αίμα ασθενών με καρκίνο μαστού [209]. Επιπρόσθετα διαπιστώθηκε ότι η δραστηριότητα της eNOS είναι πιο αυξημένη σε ασθενείς με επιθετικές μορφές καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με άτομα που έχουν καλοήθεις όγκους μαστού ή με φυσιολογικά

άτομα. Αυξημένη έκφραση eNOS όμως υπάρχει και σε ασθενείς με *in situ* καρκίνωμα σε σύγκριση με υγιή άτομα. Όλα αυτά υποδηλώνουν ότι η υπερέκφραση eNOS και η παραγωγή NO φαίνεται ότι αποτελεί ένα πρώιμο γεγονός στην καρκινογένεση. Μια πολύ σημαντική μελέτη που αναδεικνύει ακόμα περισσότερο το προηγούμενο συμπέρασμα, ασχολείται με τον προσδιορισμό του ποσοστού έκφρασης και των τριών ισομορφών του γονιδίου NOS, τόσο σε φυσιολογικό μαστικό ιστό, όσο και σε άτομα με *intraductal carcinoma* (CDIS) και *invasive ductal carcinoma* (IDC) [210]. Τα συμπεράσματα της μελέτης αυτής φαίνονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα 2

| Ιστός | nNOS (p=0,874) | eNOS (p=0,001) | iNOS (p=0,001) |
|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Φυσιολογικός | 55 (98%) n=56 | 15 (24%) n=63 | 0 (0%) n=71 |
| CDIS | 60 (97%) n=62 | 39 (58%) n=67 | 24 (43%) n=56 |
| IDC | 89 (97,8%) n=91 | 43 (47%) n=91 | 36 (39,6%) n=91 |

Πίνακας 2. Ποσοστό έκφρασης των τριών ισομορφών του γονιδίου NOS, σε άτομα με υγιή μαστικό ιστό, σε άτομα με τοπικό και με διηθητικό καρκίνο του μαστού. CDIS: *intraductal carcinoma*, IDC: *invasive ductal carcinoma*.

Η μελέτη αυτή προσπάθησε επίσης να συσχετίσει την έκφραση των ισομορφών με διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, όπως το είδος των ορμονικών υποδοχέων, το ποσοστό έκφρασης της πρωτεΐνης p53, το κλινικό στάδιο, το ιστολογικό στάδιο και η ύπαρξη ή όχι

λεμφαδενικών μεταστάσεων [210]. Τα βασικά συμπεράσματα από αυτή την μελέτη συνοψίζονται παρακάτω:

- Όπως φαίνεται και στο πίνακα.. όλοι σχεδόν οι μαστικοί ιστοί εκφράζουν nNOS. Η παρουσία nNOS δεν σχετίζεται στατιστικά με καμιά από τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που αναφέραμε.
- Η ισομορφή eNOS εκφράζεται πολύ περισσότερο σε άτομα με IDC, λιγότερο σε άτομα με DCIS, και ακόμη λιγότερο στα υγιή άτομα. Η έκφραση του όμως δεν σχετίζεται με καμιά από τις παραμέτρους που μελετήθηκαν.
- Η ισομορφή iNOS δεν εκφράζεται στο φυσιολογικό υγιή ιστό, αλλά εκφράζεται σε περίπου παρόμοιο ποσοστό σε ασθενείς με DCIS και IDC. Η έκφραση του iNOS σχετίζεται με το ιστολογικό στάδιο, το κλινικό στάδιο και την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων [210].

Σε μια πρόσφατη μελέτη, βρέθηκε ότι η υπερέκφραση eNOS σε μεταπλαστικά κύτταρα του μαστού τα οδηγεί να έχουν αποκρινή δράση σε άτομα με ινοκυστική νόσο και πρότεινε αυτό είναι το αρχικό γεγονός που προωθεί την εξέλιξη του μεταπλαστικού επιθηλίου σε καρκινικό.

Επιπρόσθετα, επειδή όπως έχει γραφτεί και προηγουμένως, το NO μπορεί να αυξάνει την ροή του αίματος και να προάγει την αγγειογένεση, μελέτες έχουν δείξει ότι στο καρκίνο του μαστού υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων NO και του βαθμού κακοήθειας [209]. Η νιτροτυροσίνη, που αποτελεί ένας βασικό εργαστηριακό βιοδείκτη του NO, έχει βρεθεί ότι σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα του VEGF-C όπως και με τον βαθμό λεμφαδενικής μετάστασης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, υποδηλώνοντας ότι το NO, εκτός από τα αρχικά στάδια δημιουργίας του

καρκίνου, συμμετέχει και στην εξέλιξη και μεταστατικότητα του. Έτσι μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η υπερέκφραση eNOS σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού σχετίζεται με φτωχότερη επιβίωση [211].

Σε αντίθεση με τους άλλους καρκίνους, ο καρκίνος του μαστού δέχεται την επίδραση των στεροειδών ορμονών του φύλου. Πρόσφατες μελέτες εμπλέκουν το NO σε μερικές από τις δράσεις αυτές. Τα οιστρογόνα και η προγεστεροειδή μπορούν να ρυθμίσουν την παραγωγή eNOS, και το παραγόμενο από αυτή NO, μπορεί να επηρεάσει την ομοιοστάση των καρκινικών κυττάρων. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα οιστρογόνα διεγείρουν την παραγωγή eNOS από τα καρκινικά κύτταρα, ενώ σε κυτταρικές σειρές από καρκίνο μαστού βρέθηκε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης eNOS και την έκφρασης του υποδοχέα των οιστρογόνων [212]. Η προγεστερόνη επιπρόσθετα μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή NO, όχι μόνο μέσω eNOS αλλά και μέσω iNOS [213]. Έχει επίσης προταθεί ότι το παραγόμενο από την eNOS NO, μπορεί και ενισχύει την δράση των οιστρογόνων όταν αυτό είναι σε χαμηλά επίπεδα, αντίθετα σε υψηλά επίπεδα (μέσω eNOS αλλά και iNOS) μπορεί να ενισχύσει αποπτωτικούς μηχανισμούς [213].

Επαγωγική καρκίνου vs ογκοκτόνος δράση του NO.

Παρόλο που οι περισσότερες μελέτες όπως προαναφέραμε, αναφέρονται στην ικανότητα του NO να προάγει καρκινογένεση, υπάρχουν μερικές μελέτες που υποστηρίζουν ότι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, το NO έχει αντίθετη δράση δηλαδή μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του όγκου. Έχει αναφερθεί ότι το NO που παράγεται από μακροφάγα, NK κύτταρα και

ενδοθηλιακά μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη διαφόρων όγκων. Οι μελέτες αυτές υποστηρίζουν ότι το NO μπορεί υπό ορισμένες συνθήκες να έχει κυτταροστατική/κυτταροτοξική δράση απέναντι σε καρκινικά κύτταρα. Αρκετά μόρια στόχοι έχουν αναφερθεί όπως η ακονιτάση και η ριβονουκλεορεδουκτάση, ενώ επίσης μπορεί να προκληθεί και αναστολή της σύνθεσης του DNA και προαγωγή της απόπτωσης. Επίσης έχει προταθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις NO μπορούν να καταστείλουν και την μετάσταση [214]. Υπάρχουν αρκετές μελέτες in vitro που υποστηρίζουν το γεγονός αυτό. Σε μια από αυτές η χορήγηση NO (μέσω εισαγωγής ουσιών που λειτουργούν ως δότες NO όπως η DETA-NONOate) σε καρκινικές σειρές προστατικών καρκινικών κυττάρων, μπορεί να αναστείλει το φαινόμενο της επιθηλιακής μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT-epithelial-mesenchymal transition). Σε μια άλλη η χορήγηση NO μπορεί να περιορίσει την μεταστατικότητα των κυττάρων αυτών και να προκαλέσει την αναστροφή της αντίστασης σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα [215]. Παρόλα τα in vitro ευρήματα αυτά, δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι ισχύουν και in vivo. Έχει προταθεί για παράδειγμα ότι οι συγκεντρώσεις του NO που ανευρίσκονται σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνο οισοφάγου, να μεν είναι υψηλότερες σε σχέση με αυτές που βρίσκουμε σε υγιή άτομα, αλλά γενικά κρίνονται ανεπαρκείς να προάγουν απόπτωση και αντίθετα είναι ικανοποιητικές στο να προάγουν αγγειογένεση. Επίσης το αν το NO εξασκήσει ανασταλτική ή διεγερτική δράση σε ένα ιστό εξαρτάται όχι μόνο από την ακριβή συγκέντρωση του αλλά και από άλλους παράγοντες όπως ο τύπος του κυττάρου που εκτίθεται η οξειδοαναγωγική του κατάσταση, η τελική ενδοκυττάρια συγκέντρωση του NO, ο συνολικός χρόνος έκθεσης κ.κ.

Φαίνεται επίσης ότι αυτό ισχύει μόνο στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης διότι όταν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί η κυτταροτοξική-ογκολυτική δράση του ΝΟ φαίνεται μειωμένη [216].

ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ eNOS

Ένας βασικός τρόπος πειραματικής προσέγγισης και μελέτης ενός γονιδίου, η έκφραση του οποίου επηρεάζεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, είναι η μελέτη των πολυμορφισμών του γονιδίου αυτού στις διάφορες παθήσεις συγκριτικά με την αντίστοιχη συχνότητα στον υγιή πληθυσμό. Η μελέτη των πολυμορφισμών εστιάζεται πάντοτε στις γονιδιακές εκείνες θέσεις, οι οποίες επηρεάζουν την στερεοδιαμόρφωση και επομένως την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης-προϊόντος της μεταγραφής του γονιδίου αυτού.

Το γονίδιο της eNOS είναι ένα τέτοιο γονίδιο, οι πολυμορφισμοί του οποίου έχουν μελετηθεί αρχικά σε ασθενείς με καρδιαγγειακές παθήσεις, αλλά εν συνεχεία επεκτάθηκε και σε πληθώρα άλλων παθολογικών καταστάσεων συμπεριλαμβανομένων αυτοάνοσων νοσημάτων, λοιμώξεων, ενώ τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια μελέτης των πολυμορφισμών αυτών και σε διάφορες μορφές καρκίνου.

Παρόλο το γεγονός ότι το γονίδιο του eNOS έχει μελετηθεί σε πολλές διαφορετικές γονιδιακές περιοχές, τρεις είναι οι κύριες και βασικές θέσεις στο γονίδιο, όπου εστιάζεται κυρίως η μελέτη των πολυμορφισμών:

- η θέση 894 στο εξόνιο 7, όπου μελετάται η αντικατάσταση G→T (G894T) ή σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας η αντικατάσταση γλουταμινικού από ασπαρτικό στην θέση 298 (Glu298Asp) στο εξόνιο 7 (rs number: rs1799983),
- Η θέση 786 στην περιοχή του υποκινητή όπου μελετάται η αντικατάσταση T→C (T786C, rs number: rs2070744),

- ο αριθμός των επαναλήψεων μοτίβων στο ιντρόνιο 4 (4b/a, όπου b, είναι το γονίδιο που περιέχει 5 επαναλήψεις, και a, το γονίδιο που περιέχει τέσσερεις επαναλήψεις).

Άλλες θέσεις του γονιδίου όπου σπανιότερα έχει γίνει ο προσδιορισμός πολυμορφισμών είναι οι C762T, rs 2853796 στο ιντρόνιο 1, C43T, rs 1549758 (D258D) στο εξόνιο 1, A26G, rs 1007311 στο ιντρόνιο 1, G63T, rs 1799983 (E298D) στο εξόνιο 7 και ο G62T, rs2853796 στο ιντρόνιο 15 [217].

Βέβαια η προσπάθεια συσχέτισης ενός πολυμορφισμού με κάποιο κλινικό φαινότυπο δεν είναι πάντοτε εφικτή και εύκολη και αυτό έχει να κάνει κυρίως με διάφορα προβλήματα μεθοδολογίας όπως για παράδειγμα το μέγεθος του δείγματος, οι πολλαπλές κλινικές εκδηλώσεις ενός νοσήματος καθώς και το είδος των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου (control group) . Έτσι στην περίπτωση της μελέτης των πολυμορφισμών του eNOS, είναι σημαντικό να ξέρουμε το ποσοστό της γονοτυπικής συχνότητας του κάθε πολυμορφισμού στον υγιή πληθυσμό το οποίο διαφέρει σημαντικά μεταξύ Ασιατικής φυλής και των Καυκάσιων (πίνακας 3). Αυτό εν μέρει εξηγεί και τα διαφορετικά στατιστικά συμπεράσματα στα οποία καταλήγουν μελέτες από Ευρώπη σε σχέση με αντίστοιχες μελέτες από την Ασία.

| Είδος πολυμορφισμού | Γονιδιακή θέση | rs Number | | Γονοτυπική συχνότητα (%) | |
|---------------------|----------------|------------|----|--------------------------|-----------|
| | | | | Ασιάτες | Καυκάσιοι |
| T786C | Υποκινητής | rs 2070744 | TT | 93 | 33-42 |
| | | | TC | 7 | 40-48 |
| | | | CC | 0 | 14-21 |
| VNTR 4b/4a | Εσόνιο 4 | | bb | 80 | 67-75 |
| | | | ba | 19 | 24-32 |
| | | | aa | 1 | 1 |
| G894T | Εξόνιο 7 | rs 1799983 | GG | 83-91 | 39-48 |
| | | | GT | 9-17 | 37-52 |
| | | | TT | 0-0,2 | 6-20 |

Πίνακας 3. Συχνότητα των τριών κυριότερων πολυμορφισμών που έχουν μελετηθεί για το γονίδιο eNOS στους Καυκάσιους και στην Ασιατική φυλή [218].

G7894T (Glu298Asp), exon 7 (rs 1799983) πολυμορφισμός.

Όταν πρωτομελήθηκε το γονίδιο του eNOS, μια σημαντική αρχική παρατήρηση ήταν ότι συγκρίνοντας την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου με αυτή την γενετικής βιβλιοθήκης (που προκύπτει από το συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, c-DNA) υπήρχαν διαφορές σε δύο νουκλεοτίδια [23, 219]. Το ένα από αυτά είναι η αντικατάσταση C→T στην θέση 744 (C744T), η οποία όμως δεν οδηγεί σε αντικατάσταση αμινοξέος, και η άλλη αλλαγή ήταν η αντικατάσταση G→T στην θέση 894 (G894T) που οδηγεί στην αντικατάσταση γλουταμικού οξέος από ασπαρτικό οξύ στο αμινοξικό κατάλοιπο 298 (Glu298Asp) [23]. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι φορείς της μορφής Asp298, είναι περισσότερο ευαίσθητοι στην πρωτεολυτική διάσπαση από ένζυμα και επομένως τα άτομα αυτά έχουν μειωμένη ικανότητα αναγέννησης του NO [220]. Η πρώτη εργασία όπου μελετήθηκε ο ρόλος του πολυμορφισμού αυτού αναφέρονταν σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, όπου φάνηκε ότι υπήρχε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης του γονοτύπου 894T που οδηγούσε στην αμινοξική αλλαγή 298Asp σε σχέση με τα υγιή άτομα της ομάδας ελέγχου [221]. Σε γενικές γραμμές, φαίνεται ότι η σημειακή αυτή μεταλλαγή εμφανίζεται σε αυξημένη συχνότητα σε μια σειρά από παθολογικές καταστάσεις, στην παθοφυσιολογία των οποίων εμπλέκεται το eNOS [218].

T786C, promoter (rs2070744) πολυμορφισμός.

Ο T786C πολυμορφισμός πρωτομελετήθηκε σε ασθενείς με σπασμό στεφανιαίων αγγείων όπου και διαπιστώθηκε ότι η ύπαρξη του σχετίζεται με εμφάνιση της νόσου [222], σε αντίθεση με μεταγενέστερες έρευνες που δεν επιβεβαιώνουν την παραπάνω παρατήρηση [223]. Ενδιαφέρον επίσης είναι

το γεγονός ότι η ύπαρξη του πολυμορφισμού T786C σχετίζονταν (σχεδόν με 100% ταύτιση) και με άλλους δύο πολυμορφισμούς στην περιοχή του υποκινητή, τον T1468A και τον A922C.

Ο πολυμορφισμός αυτός δεν συμβαίνει σε περιοχή εξονίου (δηλαδή δεν επηρεάζει την αμινοξική αλληλουχία και επομένως την στερεοδιαμόρφωση του ενζύμου). Αντίθετα έχει βρεθεί ότι επηρεάζεται η μεταγραφική ενεργότητα, πιθανώς διότι μπορεί και επηρεάζει την περιοχή επίδρασης του υποκινητή [222]. Σε μια μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε λουσιφεράση για την ανίχνευση της γονιδιακής ενεργότητας, διαπιστώθηκε ότι υπήρχε σημαντική μείωση της μεταγραφής του γονιδίου υπό την ύπαρξη του αλληλίου -786C. Αυτό επιβεβαιώθηκε και με άλλες μελέτες, ενώ ο πιθανότερος μηχανισμός για τον οποίον το αλληλίο 786C έχει χαμηλότερη μεταγραφικότητα από το wild αλληλίο T786, είναι μέσω την μειωμένης ικανότητας πρόσδεσης της πρωτεΐνης RPA1 (replication protein A1), που θεωρείται ως κατασταλτική πρωτεΐνη [224]. Άλλωστε αυτό αποδείχθηκε αργότερα και πειραματικά, κάνοντας αναστολή της RPA1 με antisense ολιγονουκλεοτίδια, όπου αυξάνονταν η μεταγραφή του μεταλλαγμένου αλληλίου 786C [224]. Επιπρόσθετα στην μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα νιτρικών και νιτρωδών στους φορείς του μεταλλαγμένου αλληλίου (ομοζυγώτες CC ή ετεροζυγώτες TC) ήταν μειωμένα σε σχέση με τους ομοζυγώτες αγρίου τύπου (TT) [224]. Αντίθετα μεταγενέστερες μελέτες δεν επιβεβαιώνουν την παρατήρηση αυτή και έτσι ο ακριβής τρόπος επίδρασης της μεταλλάξεως αυτής στην λειτουργικότητα του υποκινητή παραμένει εν πολλοίς αδιευκρίνιστος [225-226]. Πάντως σε πολλά πειραματικά μοντέλα,

άτομα που φέρουν το C αλληλίο έχουν περίπου 50% μειωμένη δραστηριότητα του eNOS σε σχέση με τους φορείς του T αλληλίου [227].

Μια επιπλέον όμως κλινική απόδειξη για τον λειτουργικό ρόλο του πολυμορφισμού αυτού ήταν η παρατήρηση ότι η ύπαρξη του σχετιζόταν με την ενδοθηλιο-εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή, ενώ επιπλέον διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα νιτροτυροσίνης και μειωμένα επίπεδα μυελουπεροξειδάσης στους ομοζυγώτες CC [228].

Intron 4, VNTR, b/a

Το ιντρόνιο VNTR 4 είναι μια άλλη θέση πολυμορφισμού του γονιδίου του eNOS όπου η μεταλλαγή του μπορεί να επηρεάσει την ενεργότητα της πρωτεΐνης. Στον άγριο τύπο a η περιοχή αυτή περιέχει 4 επαναλήψεις μιας αλληλουχίας 27 βάσεων, ενώ στο μεταλλαγμένο στέλεχος υπάρχουν 5 τέτοιες επαναλήψεις [218].

Μια πρόσφατη σημαντική πληροφορία είναι η ανακάλυψη του ρόλου που παίζει αυτή η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία των 27 bp, που φαίνεται ότι χρησιμεύει για την παραγωγή ενός μορίου micro RNA, το οποίο μπορεί να προκαλεί στοχευμένη μεταφραστική καταστολή ορισμένων γονιδίων, μέσω ακετυλίωσης των ιστονών και μεθυλίωσης του DNA, και επιπλέον λειτουργεί ως μόριο αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (negative feedback) της έκφρασης του γονιδίου eNOS, δηλαδή όσο μεγαλύτερα τα επίπεδα του microRNA, τόσο μεγαλύτερη η καταστολή του γονιδίου του eNOS [229-230]. Επομένως όσο μεγαλύτερος αριθμός επαναλήψεων υπάρχει στο ιντρόνιο VNTR τόσο περισσότερο μειώνεται η έκφραση του eNOS [229-230]. Για το λόγο αυτό, άτομα ομόζυγα για 4b/b έχουν μειωμένα επίπεδα eNOS σε σχέση με τα άτομα τύπου 4a/a ή 4a/b [229-230].

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ eNOS και ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Στην συνέχεια θα αναφερθούν οι σημαντικότερες μελέτες που αφορούν την μελέτη πολυμορφισμών του eNOS σε διάφορες κατηγορίες παθήσεων. Επειδή οι αναφορές αυτές είναι αρκετές ανά κατηγορία νοσημάτων και στις περισσότερες περιπτώσεις αντικρουόμενες μεταξύ τους, θα αναφερθούν κυρίως οι σημαντικότερες εργασίες-μετα-αναλύσεις πάνω στον συσχετισμό τους με διάφορους πολυμορφισμούς του γονιδίου.

ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Το NO το οποίο παράγεται από το γονίδιο eNOS, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα είναι σημαντικό βιομόριο για την λειτουργία του αγγειακού συστήματος, διότι ρυθμίζει λειτουργίες όπως η αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων, και της διαφοροποίησης των λείων μυικών ινών του τοιχώματος, συμμετέχοντας έτσι στην ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και την διαδικασία της θρόμβωσης [231]. Επιπρόσθετα, η υπερπαραγωγή του NO μπορεί να αναστείλει τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, κάτι το οποίο φαίνεται τα τελευταία χρόνια ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου (MI) [232-233]. Για όλους τους παραπάνω λόγους, τα καρδιαγγειακά νοσήματα έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης των πολυμορφισμών του γονιδίου του eNOS με πλήθος βιβλιογραφικών αναφορών. Εν συνεχεία θα αναφερθούν περιληπτικά οι κυριότερες μετα-αναλύσεις που αφορούν τα νοσήματα αυτά.

Αρτηριακή Υπέρταση. Μιά πρόσφατη μετα-ανάλυση και για τους τρεις πολυμορφισμούς συμπεριελάμβανε 19284 ασθενείς με πίεση και 26003

άτομα ελέγχου για τον πολυμορφισμό G894T, ενώ για τους πολυμορφισμούς 4a/b και T786C οι αντίστοιχοι ασθενείς/άτομα ελέγχου που μελετήθηκαν ήταν 6890/6858 και 5346/6392 αντίστοιχα [234]. Διαπιστώθηκε ότι για πρώτο πολυμορφισμό υπήρχε συσχέτιση μεταξύ υπέρτασης και G αλληλίου, η οποία ήταν πιο ισχυρή στον Ασιατικό πληθυσμό σε σχέση με τους Καυκάσιους και ακόμα πιο σημαντική στον Κινέζικο πληθυσμό. Ομοίως, το αλληλίο 4a vs 4b σχετιζόταν με εμφάνιση υπέρτασης και ακόμα πιο ισχυρή συσχέτιση παρατηρήθηκε επίσης στον Ασιατικό πληθυσμό [234]. Αντίθετα η μελέτη για τον πολυμορφισμό T896C ανέδειξε μια μικρή μόνο συσχέτιση του αλληλίου C και μόνο με τον Καυκάσιο πληθυσμό [234].

| Models | OR; 95% CI; P; I ² | | |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| | G894T | 4b/a | T-786C |
| All studies | | | |
| m vs. M | 1.16; 1.07–1.27; 0.001; 74.6%* | 1.29; 1.13–1.46; <0.0005; 60.6%* | 1.12; 0.97–1.29; 0.137; 59.4%* |
| mM vs. MM | 1.11; 1.00–1.22; 0.044; 67.1%* | 1.32; 1.16–1.51; <0.0005; 51.7%* | 1.11; 0.94–1.30; 0.224; 52.3%* |
| mm vs. MM | 1.18; 1.01–1.39; 0.041; 37.1%* | 1.34; 1.01–1.79; 0.045; 11.8% | 1.07; 0.82–1.40; 0.610; 21.3% |
| mM plus mm vs. MM | 1.15; 1.04–1.27; 0.005; 71.5%* | 1.33; 1.16–1.52; <0.0005; 57.3%* | 1.14; 0.98–1.36; 0.142; 58.0%* |
| mm vs. mM plus MM | 1.20; 1.04–1.38; 0.015; 30.3%* | 1.28; 0.98–1.67; 0.069; 3.3% | 1.09; 0.87–1.36; 0.457; 6.3% |
| Written-in-English Studies | | | |
| m vs. M | 1.01; 0.93–1.10; 0.748; 64.4%* | 1.21; 1.06–1.36; 0.005; 52.8%* | 1.08; 0.94–1.25; 0.255; 54.2%* |
| mM vs. MM | 0.98; 0.88–1.08; 0.627; 61.7% | 1.19; 1.05–1.36; 0.009; 35.2%* | 1.09; 0.94–1.25; 0.247; 32.7% |
| mm vs. MM | 1.03; 0.88–1.19; 0.742; 21.4% | 1.44; 1.05–1.40; 0.006; 46.4%* | 1.08; 0.77–1.52; 0.656; 40.3%* |
| mM plus mm vs. MM | 1.00; 0.90–1.10; 0.932; 63.5%* | 1.22; 1.05–1.40; 0.006; 46.4%* | 1.10; 0.94–1.30; 0.235; 46.3%* |
| mm vs. mM plus MM | 1.05; 0.95–1.15; 0.345; 0.0% | 1.38; 1.03–1.86; 0.032; 0.0% | 1.07; 0.80–1.43; 0.656; 31.7% |
| Written-in-Chinese Studies | | | |
| m vs. M | 1.52; 1.26–1.83; <0.0005; 70.9%* | 1.47; 1.11–1.96; 0.008; 68.8%* | 1.46; 0.83–2.58; 0.189; 75.4%* |
| mM vs. MM | 1.43; 1.17–1.74; <0.0005; 60.2%* | 1.67; 1.25–2.22; <0.0005; 59.7%* | 1.61; 0.74–3.48; 0.226; 79.2%* |
| mm vs. MM | 1.94; 1.35–2.77; <0.0005; 28.4% | 1.17; 0.60–2.28; 0.649; 25.8% | 0.92; 0.52–1.62; 0.777; 0.0% |
| mM plus mm vs. MM | 1.53; 1.25–1.88; <0.0005; 66.1%* | 1.60; 1.19–2.16; 0.002; 65.7%* | 1.56; 0.78–3.14; 0.207; 78.3%* |
| mm vs. mM plus MM | 1.78; 1.30–2.44; <0.0005; 26.4% | 1.06; 0.57–1.98; 0.853; 18.6% | 1.01; 0.58–1.75; 0.968; 0.0% |

Πίνακας 4. Συσχετισμός των τριών πολυμορφισμών του γονιδίου eNOS με τον κίνδυνο για την ανάπτυξη υπέρτασης. M: κύριο αλληλίο ή αγρίου τύπου, m: υπολειπόμενο ή μεταλλαγμένο αλληλίο. (για τους πολυμορφισμούς G894T, 4a/b και T785C, το m αλληλίο είναι 894t, 4a και 786T αντίστοιχα).

Σε μια άλλη δεύτερη μετα-ανάλυση και μόνο για τον Κινέζικο πληθυσμό (συνολικά 1148 ασθενείς με υπέρταση) επιβεβαιώθηκε η παρατήρηση της συσχέτισης του T αλληλίου με την υπέρταση με την Ασιατική καταγωγή και

επιπρόσθετα η επιμέρους ανάλυση έδειξε έντονο συσχετισμό με την φυλή των Han [235].

Έμφραγμα του μυοκαρδίου (MI). Μια σημαντική πρόσφατη μετα-ανάλυση συμπεριέλαβε 34 άρθρα και εμπεριείχε 8829 ασθενείς με MI και 12839 άτομα ομάδας ελέγχου [236]. Η μετα-ανάλυση αυτή αναφέρονταν μόνο στην μελέτη του πολυμορφισμού G894T και το σημαντικότερο εύρημα είναι ότι στους Ασιάτες υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε οποιαδήποτε σύγκριση και αν γινόταν (ομόζυγο μοντέλο→ TT vs GG, ετερόζυγο μοντέλο→ GT vs GG, επικρατικό→ TT vs GT/GG ή υπολειπόμενο μοντέλο→ TT/GT vs GG) (πίνακας..). Αντίθετα στον μη Ασιατικό πληθυσμό δεν υπήρχε καμιά στατιστικώς σημαντική συσχέτιση σε όποιο συνδυασμό και αν επιχειρήθηκε [236].

| | TT vs. GG | | | GT vs. GG | | | TT vs. GT/GG | | | TT/GT vs. GG | | |
|-----------|-----------------|--------------------|---------|-----------------|--------------------|---------|-----------------|--------------------|---------|-----------------|--------------------|---------|
| | OR (95% CI) | I ² (%) | P-value | OR(95% CI) | I ² (%) | P-value | OR(95% CI) | I ² (%) | P-value | OR(95% CI) | I ² (%) | P-value |
| Overall | 1.41(1.08-1.84) | 67.1 | 0.012 | 1.12(1.00-1.25) | 53.4 | 0.054 | 1.34(1.06-1.70) | 60.9 | 0.014 | 1.18(1.04-1.34) | 65.6 | 0.009 |
| Ethnicity | | | | | | | | | | | | |
| Asian | 3.44(2.15-5.49) | 19.3 | 0.000 | 1.26(1.02-1.57) | 50.1 | 0.032 | 3.41(2.14-5.43) | 14.1 | 0.000 | 1.40(1.13-1.74) | 52.8 | 0.002 |
| Non-Asian | 1.18(0.89-1.55) | 72.8 | 0.250 | 1.05(0.93-1.20) | 54.4 | 0.430 | 1.15(0.91-1.46) | 65.4 | 0.236 | 1.08(0.93-1.25) | 69.1 | 0.322 |

Πίνακας 5. OR και 95% CI των συσχετισμών μεταξύ εμφράγματος του μυοκαρδίου και πολυμορφισμού G894T. όπως φαίνεται και στις τιμές, είναι στατιστικώς σημαντικές (κόκκινα τετράγωνα) για τον Ασιατικό πληθυσμό σε όλους τους συσχετισμούς κάτι το οποίο δεν παρατηρείται στον μη Ασιάτες [236].

Πνευμονικό Οίδημα. Διάφορες μελέτες έχουν γίνει μεταξύ πολυμορφισμών του γονιδίου eNOS και του κινδύνου εμφάνισης πνευμονικού οιδήματος σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια. Παρόλα αυτά, μια πρόσφατη μετα-ανάλυση 5 άρθρων που εμπεριείχε 360 ασθενείς με πνευμονικό οίδημα και 469 άτομα ομάδας ελέγχου, δεν διαπίστωσε καμιά συσχέτιση με τον

κίνδυνο ανάπτυξης πνευμονικού οιδήματος και του πολυμορφισμού G894T [237].

| No | Polymorphisms | Heterogeneity P value | Model | OR | 95% CI | P |
|----|---------------|-----------------------|----------------------|------|-----------|-----|
| 1 | G vs T | <.01 | Random effects model | 0.52 | 0.23–1.14 | .10 |
| 2 | GG vs GT + TT | <.01 | Random effects model | 0.43 | 0.14–1.35 | .15 |
| 3 | GT vs GG | <.01 | Random effects model | 2.46 | 0.71–8.51 | .15 |
| 4 | GG vs TT | .69 | Fixed effects model | 0.61 | 0.26–0.46 | .27 |
| 5 | GG + GT vs TT | .78 | Fixed effects model | 1.34 | 0.58–3.07 | .68 |
| 6 | TT vs GT | .29 | Fixed effects model | 0.88 | 0.38–2.03 | .76 |

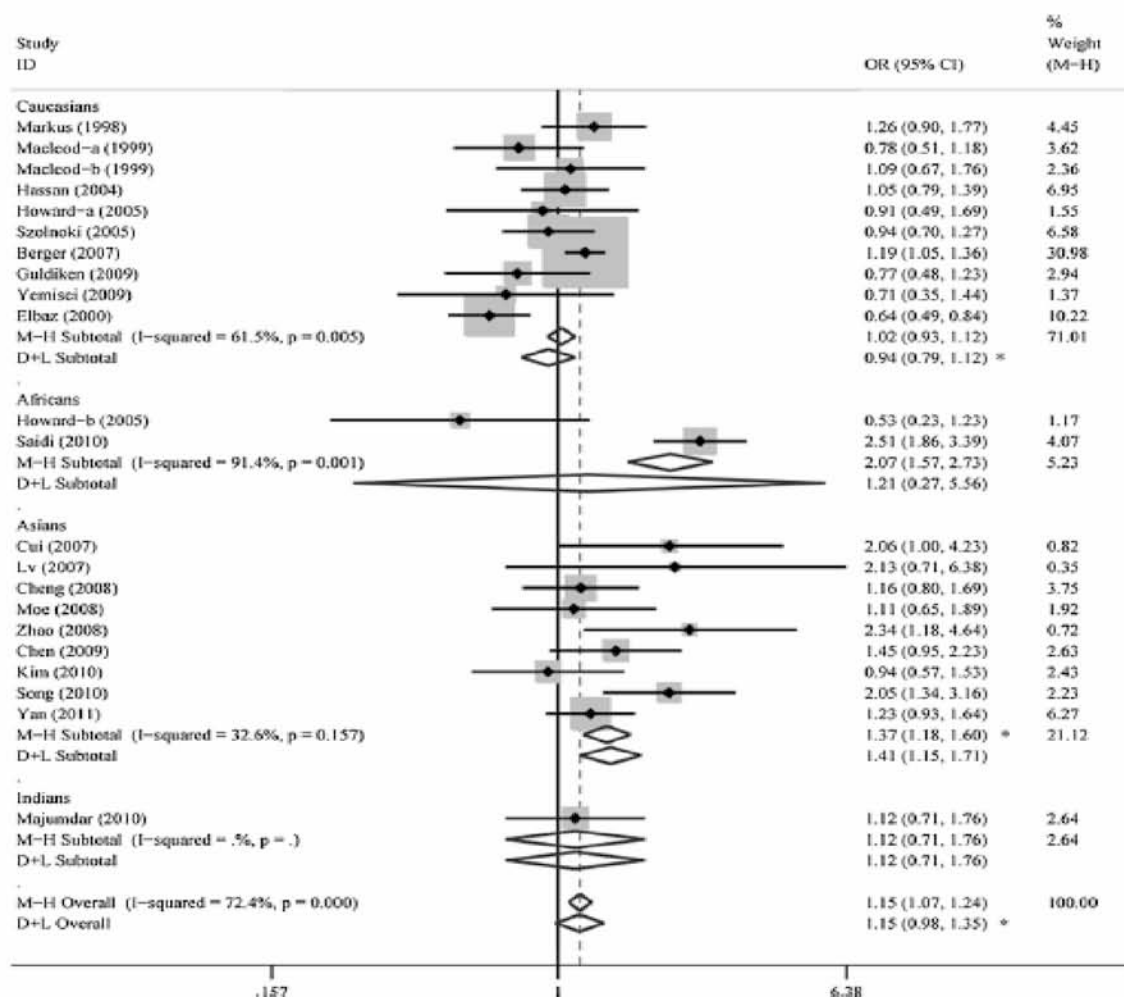
Πίνακας 6. Συσχετίσεις πολυμορφισμού G894T με τον κίνδυνο ανάπτυξης πνευμονικού οιδήματος σε άτομα με καρδιακή ανεπάρκεια.

ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ

Το NO που παράγεται από το eNOS έχει βρεθεί ότι συμμετέχει σε διάφορες λειτουργίες του εγκεφάλου, όπως ρύθμιση της εγκεφαλικής αιματικής ροής, της θερμογένεσης και της ενεργότητας των νευρώνων [238]. Διάφορες εργασίες έχουν δημοσιευθεί με μελέτη πολυμορφισμών του eNOS σε ασθενείς με αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια. μερικές από αυτές αναδεικνύουν κάποιο σχετικό ρίσκο εμφάνισης AEE σε ότι αφορά τους πολυμορφισμούς G894T και 4b/a ενώ άλλες έχουν αντίθετα αποτελέσματα.

Σε μια μεγάλη μετα-ανάλυση σε σύνολο 8547 ασθενών με AEE και 9117 άτομα ελέγχου (από συνολικά 31 άρθρα), διαπιστώθηκε ότι σε ότι αφορά τον πολυμορφισμό G894T υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου TT και του κινδύνου εμφάνισης AEE σε σχέση με την παρουσία G αλληλίου (GT ή GG) [239]. Η σημαντικότητα αυτή ήταν πιο ισχυρή στους Ασιάτες σε σχέση με τους Καυκάσιους. Επίσης ο πολυμορφισμός 4aa σχετίζονταν με ανάπτυξη MI σε σχέση με τον γονότυπο

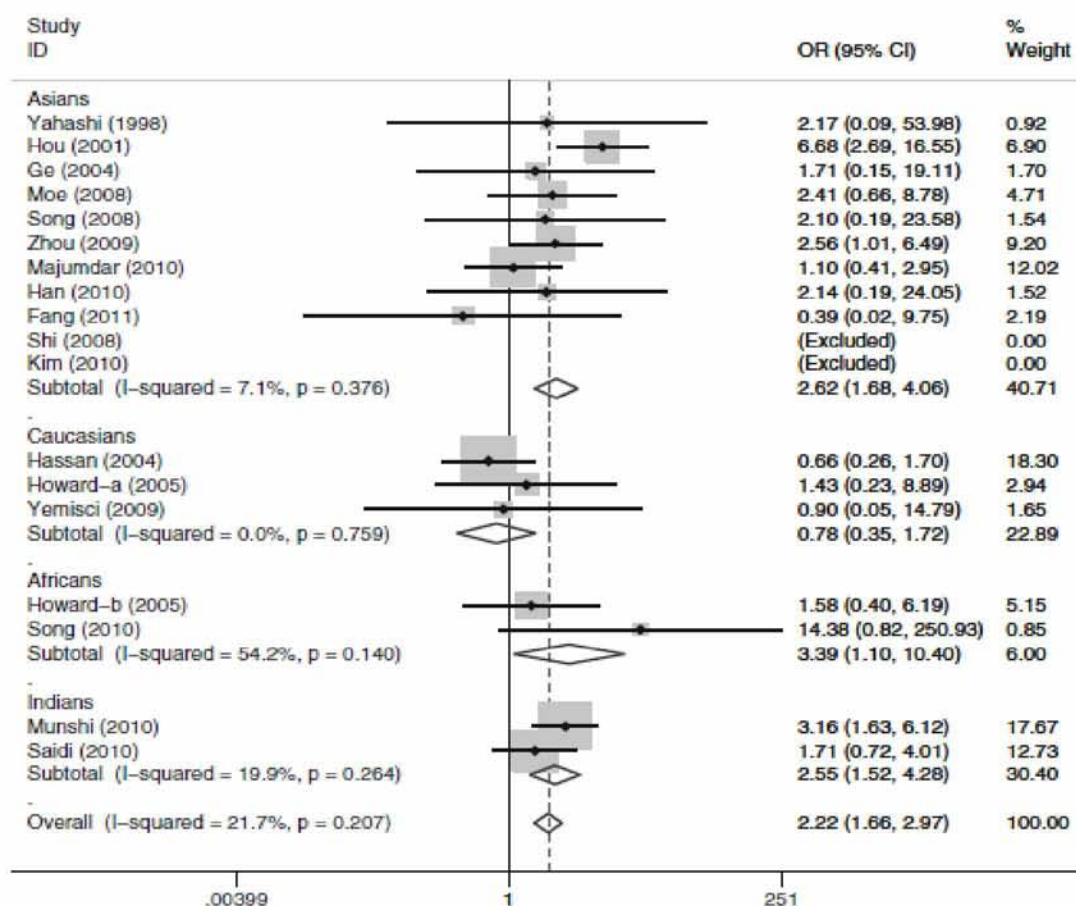
4bb. Ομοίως και εδώ ο συσχετισμός ήταν πιο ισχυρός στατιστικά στους Ασιάτες σε σχέση με τους Καυκάσιους [239].



Πίνακας 7. Ανάλυση του σχετικού κινδύνου εμφάνισης AEE ανάλογα με τον τύπο του πολυμορφισμού G894T (TT vs GT+ GG). Υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση εγκεφαλικού και ιδιαίτερα στον Ασιατικό πληθυσμό.

Σε μια άλλη μεγάλη μετα-ανάλυση σε συνολικά 12 άρθρα, με 2836 ασθενείς με AEE και 3354 άτομα ομάδας ελέγχου που εστιάστηκαν μόνο στο πολυμορφισμό T786C [240] διαπιστώθηκε ένα σχετικά παράδοξο αποτέλεσμα καθώς: μόνο στους Καυκάσιους διαπιστώθηκε χαμηλότερο ρίσκο εμφάνισης AEE και μόνο στο ομόζυγο μοντέλο σύγκρισης CC vs TT, ενώ στους Αφροαμερικανούς και Ασιάτες (και όχι στους Καυκάσιους)

διαπιστώθηκε στατιστική συσχέτιση αλλά μόνο στην σύγκριση αντίθετων αλληλίων (C vs T) (εικόνα...)

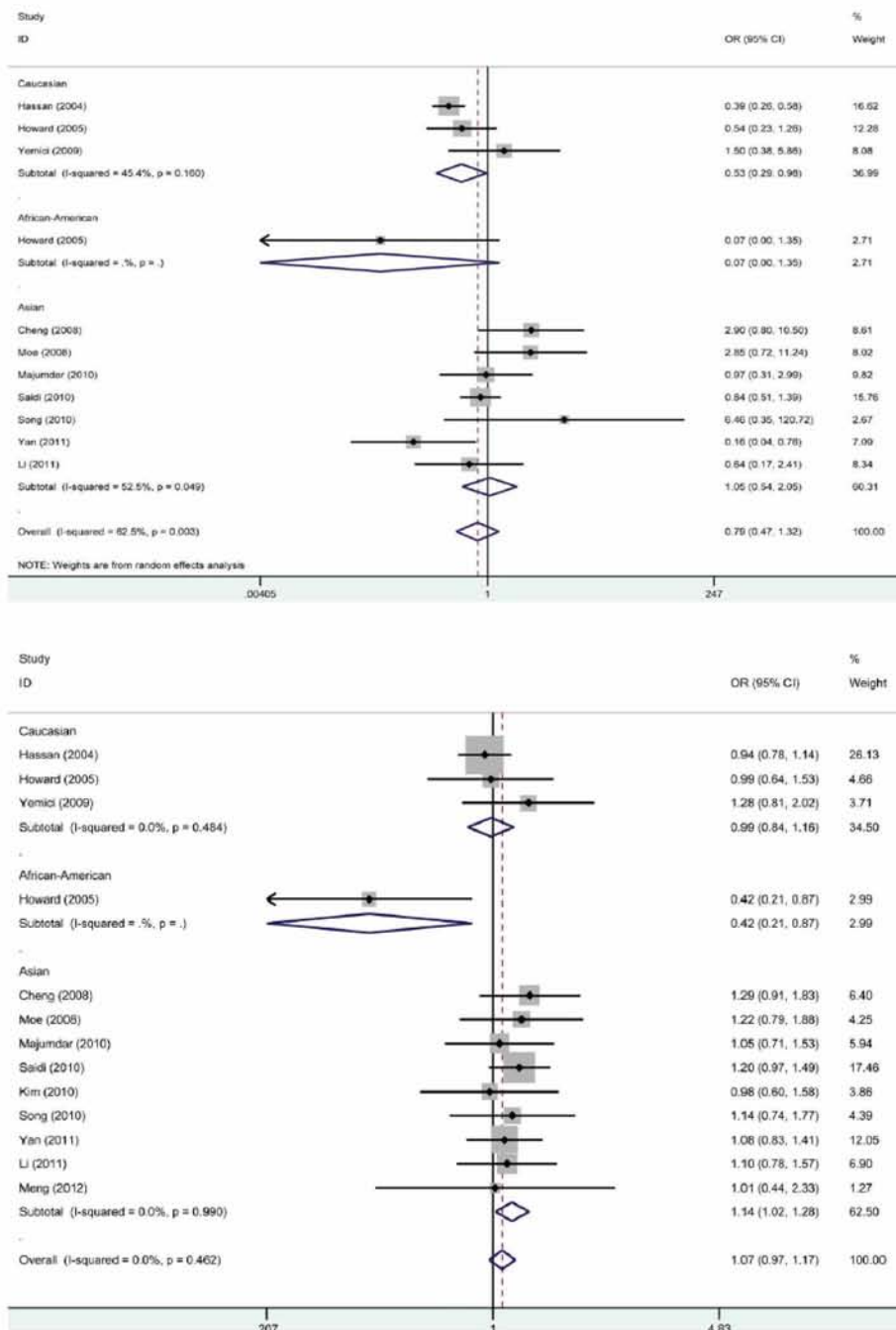


Πίνακας 8. Ανάλυση του σχετικού κινδύνου εμφάνισης ΑΕΕ ανάλογα με τον τύπο του πολυμορφισμού 4a/b (aa vs bb). Υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση εγκεφαλικού και ιδιαίτερα στον Ασιατικό πληθυσμό.

ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΜΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ

Μεγάλη μελέτη έχει γίνει τα τελευταία χρόνια για τον ρόλο που διαδραματίζει το NO στην λειτουργία των νεφρών. Φαίνεται ότι μπορεί να επηρεάζει με ποικίλους μηχανισμούς την νεφρική λειτουργία, όπως με το να ελέγχει την διαστολή των απαγωγών και προσαγωγών αρτηριδίων και των τριχοειδών του σπειράματος (επηρεάζοντας έτσι και τον ρυθμό σπειραματικής διήθησης GFR) καθώς επίσης να ρυθμίζει και το ισοζύγιο Νατρίου [241]. Επιπρόσθετα φαίνεται ότι επηρεάζει και την ενεργότητα του

συμπαθητικού αυτόνομου συστήματος που νευρώνει το νεφρό και να ρυθμίζει την προσαρμογή του νεφρού στις διαιτητικές συνθήκες πρόσληψης άλατος [241-242].



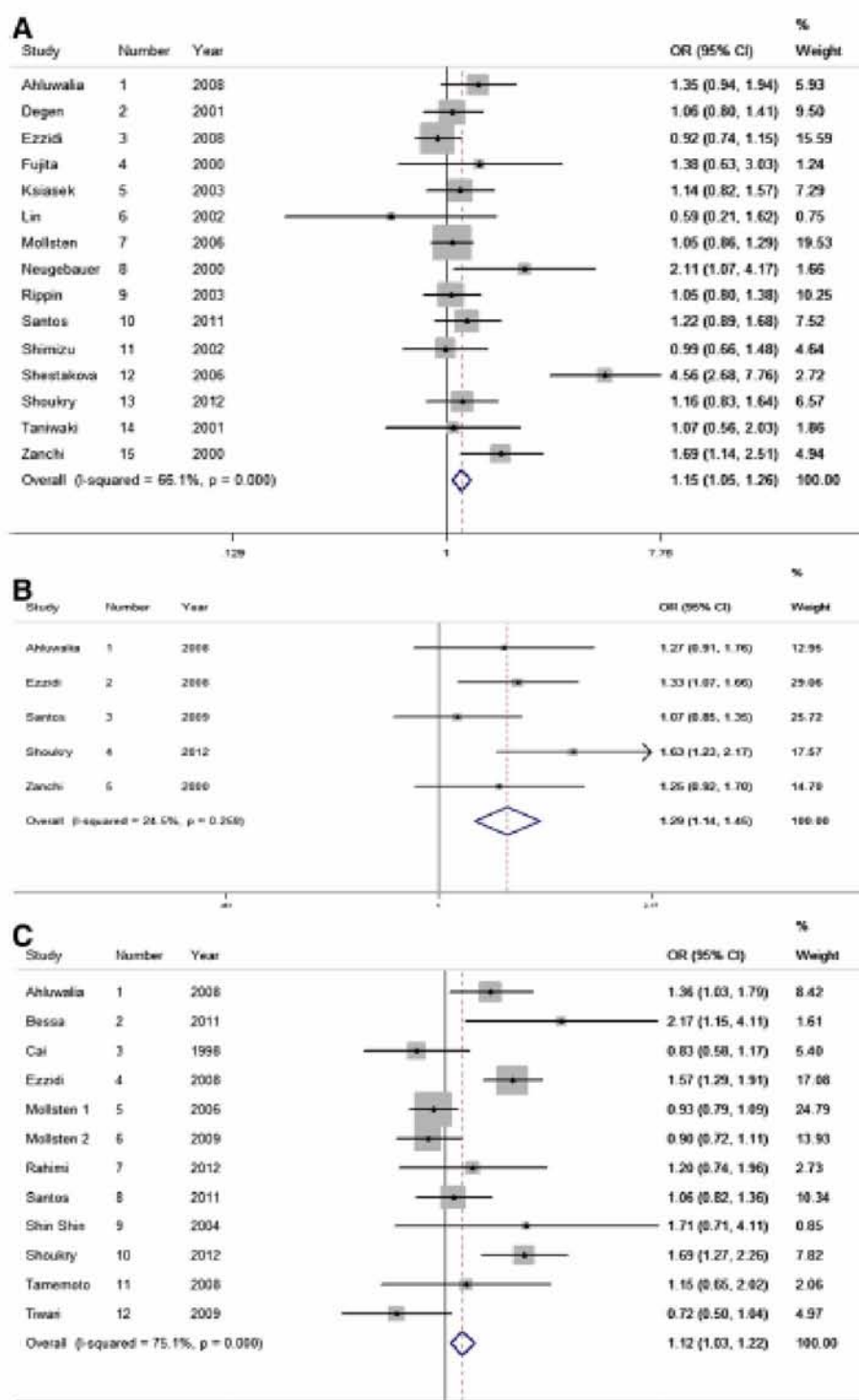
Πίνακας 9. A: Συγκρίνοντας τις μελέτες ως προς το επικρατικό μοντέλο (CC vs TT) διαπιστώνεται μια στατιστικώς σημαντικός συσχετισμός μεταξύ πολυμορφισμού και κινδύνου εμφάνισης MI μόνο στους Καυκάσιους. B: Η συγκριτική μελέτη των απλοτύπων (C vs T) αναδεικνύει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μόνο στους Αφρο-αμερικάνους και στους Ασιάτες και όχι στους Καυκάσιους.

Η διαβητική νεφροπάθεια (ΔΝ) είναι μια σοβαρή επιπλοκή του διαβήτη, οδηγώντας τελικά σε νεφρική ανεπάρκεια. Μελέτες έχουν δείξει ότι στην παθογένεια της ΔΝ εμπλέκονται και μηχανισμοί δυσλειτουργίας του αγγειακού ενδοθηλίου [243], ενώ knock out για eNOS, διαβητικά ποντίκια αναπτύσσουν πρόωρα ΔΝ [244].

Οι μελέτες των πολυμορφισμών του eNOS στην ΔΝ είναι πολλές και μεταξύ τους αντικρουόμενες, όπως επίσης και οι μετα-αναλύσεις. Μια αρχική μετα-ανάλυση σε 28 μελέτες, συμπεριελάμβανε και μελέτησε 3585 άτομα με ΔΝ και 3140 άτομα ελέγχου για τον πολυμορφισμό G894T, ενώ τα άτομα που μελετήθηκαν για τους πολυμορφισμούς 4a/b και T786C ήταν 4465/3805 και 1473/1172 αντίστοιχα [245]. Από την μελέτη αυτή φάνηκε ότι ο πολυμορφισμός T786C δεν παρουσίαζε σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση ΔΝ; Ο πολυμορφισμός 4a/b επίσης δεν εμφάνιζε συσχέτιση με την ανάπτυξη ΔΝ, εκτός αν αφαιρούσαμε τους ασθενείς με μικρο-αλβουμιναιμία. Αντίθετα η μελέτη του πολυμορφισμού G9894T, ανέδειξε το παράδοξο συμπέρασμα ότι ο πολυμορφισμός T, σχετιζόνταν θετικά με την ανάπτυξη ΔΝ στους Ασιάτες και αρνητικά στους Καυκάσιους [245].

Αντίθετα σε μια πιο πρόσφατη μετα-ανάλυση που συμπεριελάμβανε 22 και μελέτησε 3316 άτομα με ΔΝ και 2765 άτομα ελέγχου για τον πολυμορφισμό G894T, ενώ τα άτομα που μελετήθηκαν για τους πολυμορφισμούς 4a/b και T786C ήταν 4054/3405 και 1436/1286 αντίστοιχα, διαπιστώθηκαν διαφορετικά συμπεράσματα, μελετώντας όμως όχι μόνο τους συσχετισμούς αλληλίων αλλά και άλλα μοντέλα [246]. Έτσι βρέθηκε ότι, για τον πολυμορφισμό T894C υπήρχε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μόνο στην σύγκριση αλληλίων και στο συν-επικρατικό μοντέλο (πινακας-σχημα

10). Αντίθετα, ο πολυμορφισμός 4a/b VTR και ο πολυμορφισμός T786C σχετίζεται με την ανάπτυξη ΔΝ, σε όλους σχεδόν τους συσχετισμούς που μελετήθηκαν (ομόζυγος, ετερόζυγος, επικρατικός, υπολειπόμενο μοντέλο) (σχήμα 10) [246].



Σχήμα 10. Ανάλυση συσχετισμού των αντίθετων αλληλίων για τον πολυμορφισμό 4a/b (A), T786C (B) και G894T (C).

ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του eNOS έχουν μελετηθεί σε μια σειρά από αυτοάνοσα νοσήματα τα οποία μπορεί να παρουσιάσουν κλινικές εκδηλώσεις αγγειίτιδας και/ή θρομβώσεων. Οι σημαντικότερες από αυτές τις μελέτες αναφέρονται περιληπτικά παρακάτω.

Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ). Σε μια πρόσφατη εργασία, μελετήθηκε διεξοδικά ο ρόλος του NO σε ασθενείς με ΣΕΛ καθώς φαίνεται ότι μπορεί να ενεργοποιήσει την Th1 κυτταρική απόκριση, να προάγει την δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, την εξάντληση των αποθεμάτων ATP και την προαγωγή απόπτωσης [247]. Ο πολυμορφισμός του γονιδίου eNOS έχει μελετηθεί διεξοδικά σε ασθενείς με ΣΕΛ με διφορούμενα μεταξύ τους αποτελέσματα (πίνακας 11) [248-256].

Μια μεγάλη πρόσφατη μετα-ανάλυση συμπεριέλαβε τις μελέτες συσχέτισης eNOS πολυμορφισμών και ΣΕΛ [257]. Η μετα-ανάλυση αυτή εμπεριείχε συνολικά 1297 ασθενείς με ΣΕΛ και 1214 άτομα ελέγχου [257]. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι ο πολυμορφισμός C786T σχετίζεται με εμφάνιση ΣΕΛ, ενώ αντίθετα ο πολυμορφισμός VNTR 4b/a δεν σχετίζεται με την εμφάνιση ΣΕΛ, αλλά ένα ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι σε ασθενείς με ΣΕΛ, ο πολυμορφισμός αυτός σχετίστηκε με την εμφάνιση νεφρίτιδας του Λύκου [257]. Αντίθετα ο πολυμορφισμός G894T δεν φαίνεται να σχετίζεται με την εμφάνιση του ΣΕΛ [257].

Νόσος Αδαμαντιάδη-Behcet. Παρόμοια με τον ΣΕΛ, σε ασθενείς με νόσο Behcet έχουν επίσης γίνει πολλές μελέτες του πολυμορφισμού του γονιδίου eNOS, πολλές από τις οποίες αναδεικνύουν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα, αν και διφορούμενα μεταξύ τους (πίνακας 12) [258-265]

| Μελέτη | Χώρα προέλευσης | Αριθμός ασθενών/μαρτύρων | πολυμορφισμός | Ευρήματα |
|--------------|-----------------|--------------------------|--------------------|----------------------------------|
| Alfadhni | Κουβέιτ | 152/184 | VNTR, G894T, C786T | Συσχετισμός με VNTR b αλληλίο |
| Li | Κίνα | 225/232 | G894T, C786T | Συσχετισμός με G894T |
| Tang | Κίνα | 90/86 | G894T, C786T | Καμμία συσχέτιση |
| Mucenic | Βραζιλία | 132/91 | G894T | Καμμία συσχέτιση |
| Vazgiourakis | Ελλάδα | 190/145 | VNTR | Συσχετισμός με VNTR b αλληλίο |
| Serrano | Κολομβία | 193/106 | VNTR, G894T, C786T | Συσχετισμός με VNTR b αλληλίο |
| Doughs | Αμερική | 227/275 | VNTR, C786T | Καμμία συσχέτιση |
| Lee | Κορέα | 88/95 | VNTR | Συσχετισμός με VNTR b αλληλίο |
| Zernou | Τουρκία | 158/155 | VNTR | Συσχετισμός με VNTR α αλληλίο |

Πίνακας 11. Οι κυριότερες μελέτες και τα ευρήματα τους σχετικά με την μελέτη πολυμορφισμών του γονιδίου eNOS σε ασθενείς με ΣΕΛ.

Οστόσο σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση που συμπεριέλαβε όλες τις κυριότερες μελέτες πολυμορφισμού του eNOS σε νόσο Behcet (συνολικά 841 ασθενείς και 866 άτομα ελέγχου), δεν διαπιστώθηκε να υπάρχει συσχέτιση της εμφάνισης της νόσου ούτε με τον VNTR, ούτε με τον G894T πολυμορφισμό του γονιδίου [266].

Ρευματοειδή αρθρίτιδα. Λίγες μελέτες αναφέρονται στην μελέτη πολυμορφισμών του γονιδίου του eNOS με την PA (πίνακας 13). Στις

μελέτες από Κίνα και Γερμανία φαίνεται ότι υπάρχει συσχετισμός μεταξύ πολυμορφισμού και RA, αντίθετα άλλες μελέτες δεν επιβεβαιώνουν την παραπάνω παρατήρηση [267-270].

| Μελέτη | Χώρα προέλευσης | Αριθμός ασθενών/μαρτύρων | πολυμορφισμός | Ευρήματα |
|---------------|-----------------|--------------------------|---------------|--------------------------|
| Dursun | Τουρκία | 73/90 | VNTR | Συσχετισμός με a αλληλίο |
| Ben Dhifallah | Τυνησία | 135/157 | G894T | Συσχετισμός με G894T |
| Nakao | Ιαπωνία | 78/107 | VNTR, G894T | Καμμία συσχέτιση |
| Oksel | Τουρκία | 132/91 | G894T | Συσχετισμός με G894T |
| Kara | Τουρκία | 92/100 | G894T | Καμμία συσχέτιση |
| Karasneh | Τουρκία | 193/106 | VNTR, G894T | Συσχετισμός με b αλληλίο |
| Kim | Κορέα | 65/80 | VNTR, G894T | Συσχετισμός με G894T |
| Salvarani | Ιταλία | 73/135 | VNTR, G894T | Συσχετισμός με G894T |

Πίνακας 12. Οι κυριότερες μελέτες και τα ευρήματα τους σχετικά με την μελέτη πολυμορφισμών του γονιδίου eNOS σε ασθενείς με νόσο Αδαμαντιάδη-Bechet .

| Μελέτη | Χώρα προέλευσης | Αριθμός ασθενών/μαρτύρων | πολυμορφισμός | Ευρήματα |
|---------------|-----------------|--------------------------|---------------|---|
| An JD | Κίνα | 196/201 | C786T | Συσχέτιση με το C αλληλίο |
| Inga Melchers | Γερμανία | 596/1160 | C786T | Συσχέτιση με CC |
| Gonzalez | Ισπανία | 170/117 | C786T | Καμμία συσχέτιση |
| Brenol | Βραζιλία | 105/100 | C786T | Καμμία συσχέτιση |
| Melchers | Γερμανία | ??? | C786T | Συσχέτιση με ενδοθηλιακή δυσλειτουργία της RA |
| Vazgiourakis | Ελλάδα | 202/235 | VNTR | Συσχέτιση με CC |

Πίνακας 13. Οι κυριότερες μελέτες και τα ευρήματα τους σχετικά με την μελέτη πολυμορφισμών του γονιδίου eNOS σε ασθενείς με Ρευματοειδή αρθρίτιδα .

Εκτός όμως της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, του ΣΕΛ και της νόσου Αδαμαντιάδη-Becher, βιβλιογραφικές αναφορές μελέτης των πολυμορφισμών του εμς, έχουν δημοσιευθεί και για άλλα αυτοάνοσα νοσήματα όπως:

- **Πρωτοπαθής χολική κίρρωση (PBC).** Έχει προταθεί ότι η αυξημένη σύνθεση NO μπορεί να συσχετισθεί με την εμφάνιση της υπερδυναμικής κυκλοφορίας που χαρακτηρίζει τους κίρρωτικούς ασθενείς, ενώ η μείωση της παραγωγής NO μπορεί να προωθήσει την ιστική κατάστροφη και να οδηγήσει στην δημιουργία πυλαίας υπέρτασης, μέσω αυξημένης αγγειακής ενδο-ηπατικής αντίστασης [271]. Μια αρχική Ιταλική μελέτη σε 109 ασθενείς και 242 άτομα ελέγχου απέτυχε να αναδείξει κάποιο συσχετισμό [272], αντίθετα σε μια πρόσφατη Ελληνική μελέτη με 100 ασθενείς και 118 άτομα ελέγχου), διαπιστώθηκε ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών b vs a του VNTR, όσο και στον πολυμορφισμό G894T με την ανάπτυξη PBC [273].
- **Ψωρίαση.** Σε μια εργασία (109 άτομα με ψωρίαση και 100 υγιή), όπου μελετήθηκε μόνο ο πολυμορφισμός G894T, φάνηκε ότι η παρουσία του T αλληλίου (GT ή TT) ήταν πιο συχνή στα άτομα με ψωρίαση, σε σχέση με τα υγιή, αλλά δεν συσχετιζόνταν με καμιά κλινικοεργαστηριακή παράμετρο της νόσου [274].
- **Συστηματική σκλήρυνση (SSc).** Ομοίως με την ψωρίαση, μελέτη σε άτομα με SSc (73 άτομα, 47 με εντοπισμένο και 26 με διάχυτο σκληρόδερμα, έναντι 112 υγιών), ανέδειξε ότι το αλληλίο T του πολυμορφισμού G894T είναι πιο συχνό στους ασθενείς με SSc

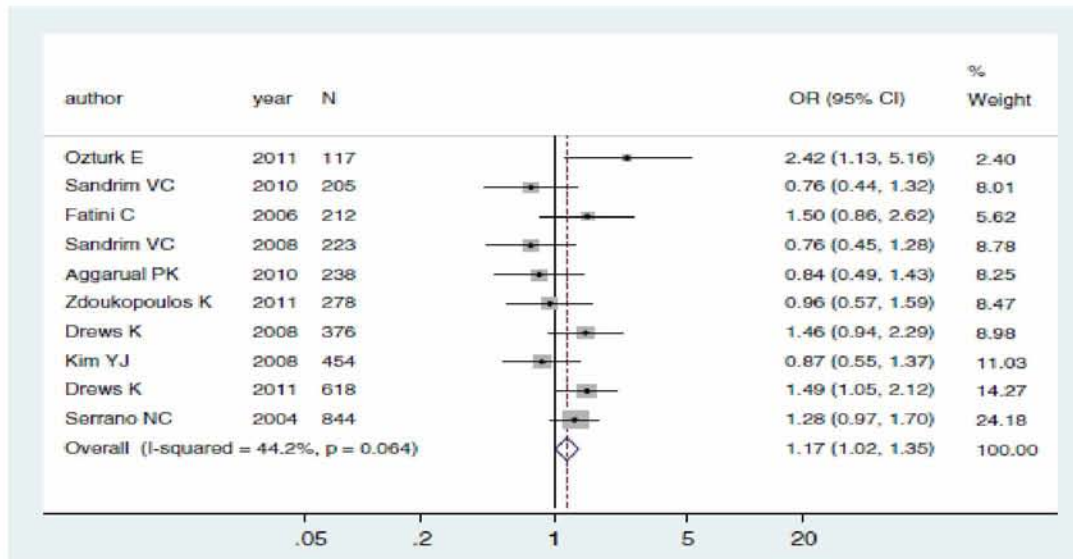
παρά στα άτομα της ομάδας ελέγχου, υποδηλώνοντας ρόλο και στην παθογένεση της νόσου [275].

- **Γυγαντοκυτταρική αρτηρίτιδα (Giant Cell Arteritis, GCA).** Μια μελέτη σε 91 ασθενείς με GCA, έναντι 133 υγιών ατόμων, ανέδειξε επίσης ότι η παρουσία του T αλληλίου του πολυμορφισμού G894T σχετίζεται με την εμφάνιση της νόσου, ενώ αντίθετα δεν βρέθηκε κανένα στατιστικά σημαντικό συμπέρασμα σε ότι αφορά το πολυμορφισμό b/a VTR. Η παρουσία όμως του T αλληλίου δεν σχετίζονταν με την εμφάνιση ή όχι ισχαιμικών επιπλοκών που χαρακτηρίζει την GCA [276].

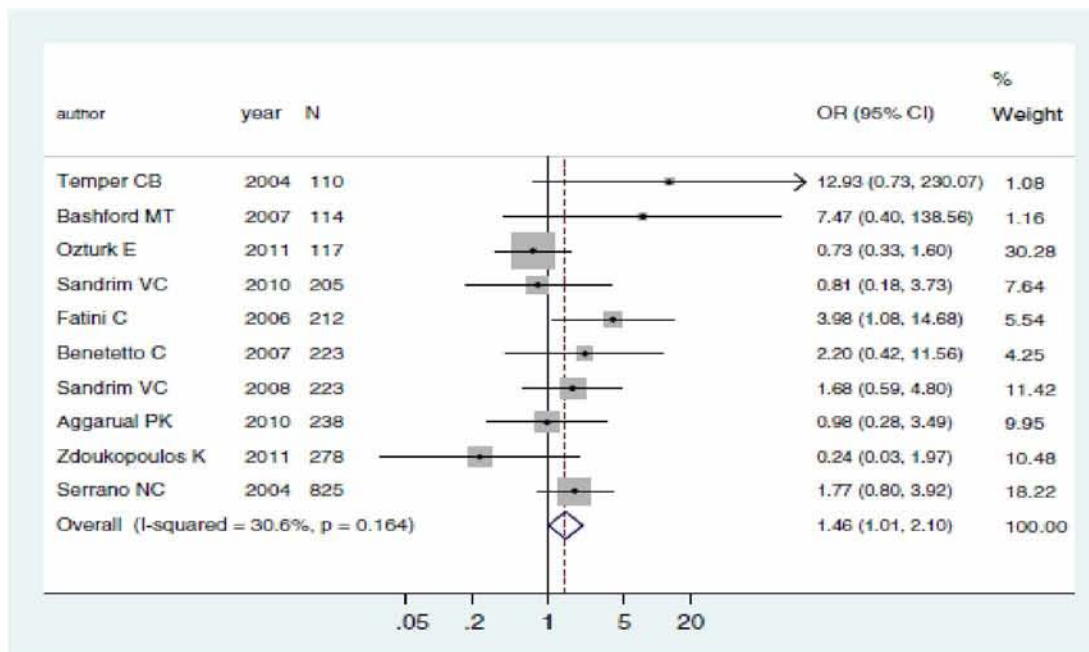
ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.

Λόγω της ιδιότητας NO να ρυθμίζει την αρτηριακή πίεση και την λειτουργία των αιμοπεταλίων, δύο είναι οι σημαντικότερες γυναικολογικές οντότητες στις οποίες έγινε μελέτη των πολυμορφισμών του γονιδίου eNOS: η προεκλαμψία και οι πολλαπλές αποβολές κυήματος.

Προεκλαμψία. Μια σημαντική πρόσφατη μετα-ανάλυση, συμπεριέλαβε 29 άρθρα, και μελέτησε 2265 άτομα με προεκλαμψία/3709 άτομα ελέγχου για τον πολυμορφισμό G894T, ενώ τα άτομα που μελετήθηκαν για τους πολυμορφισμούς 4a/b και T786C ήταν 1543/185 και 1379/1849 αντίστοιχα [277]. Στις μελέτες αυτές δεν διαπιστώθηκε κανενός είδους συσχετισμός με τον πολυμορφισμό G894T. Αντίθετα το αλληλίο T του πολυμορφισμού T786C σχετίζονταν με το ρίσκο εμφάνισης προ-εκλαμψίας και ιδιαίτερα στους Καυκάσιους καθώς και η ομοζυγωτία 4aa (πίνακας 15) [277].



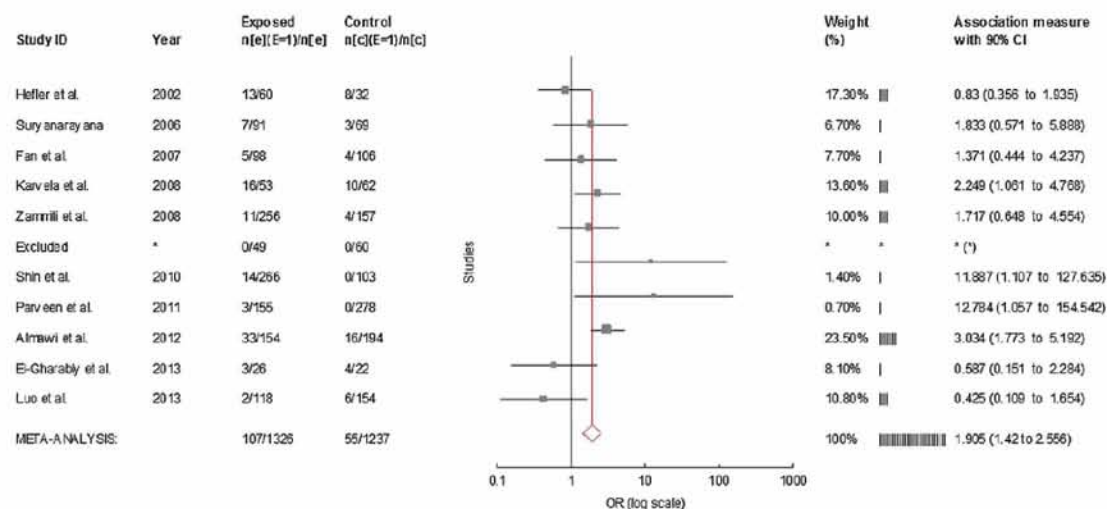
Πίνακας 14. Συσχετισμός του πολυμορφισμού T786C του γονιδίου eNOS με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας (CC vs TT + TC).



Πίνακας 15. Συσχετισμός του πολυμορφισμού 4a/b του γονιδίου eNOS με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας (aa vs ab + bb).

Επαναλαμβανόμενες απώλειες κυήματος. Σε μια μετα-ανάλυση 13 άρθρων με 1769 άτομα με επαναλαμβανόμενες αποβολές και 1376 άτομα ελέγχου για τον πολυμορφισμό T786C, ανέδειξε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αποβολών με την ομοζυγωτία TT (πίνακας 16) [278]. Αντίθετα με

μελέτη 1498 ατόμων με αποβολές και 1123 ατόμων ομάδας ελέγχου για τον πολυμορφισμό 4a/b δεν ανέδειξε στατιστική συσχέτιση [278].



Πίνακας 16. Συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμού T876C και κινδύνου εμφάνισης επαναλαμβανόμενων πολλαπλών αποβολών (TT vs CC).

Πολυκυστικές ωοθήκες. Μια μελέτη σε 210 γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών έναντι 171 άτομα ομάδας ελέγχου, δεν ανέδειξε σημαντική διαφορά σε ότι αφορά την παρουσία πολυμορφισμών 4a/b VTR και G894T με την ανάπτυξη του συνδρόμου [279].

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ eNOS ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Λόγω του σημαντικού ρόλου το οποίο φαίνεται να διαδραματίζει το NO στην διαδικασία της καρκινογένεσης, πολλές μελέτες έχουν εστιάσει στην ανίχνευση πολυμορφισμών του γονιδίου eNOS σε διάφορες μορφές καρκίνου, με αντικρουόμενα μεταξύ τους αποτελέσματα. Στην συνέχεια αναφέρονται περιληπτικά οι βασικότερες μελέτες και συμπεράσματα, σε ασθενείς με διάφορες μορφές καρκίνου.

Καρκίνος του παχέος εντέρου

Στον καρκίνο του παχέος εντέρου (CRC), οι περισσότερες μελέτες του eNOS καταλήγουν ως επί το πλείστον σε περιορισμένης σημαντικότητας συμπεράσματα για τον διαγνωστικό ρόλο των πολυμορφισμών. Σε μια Ισπανική μελέτη, με 360 ασθενείς με CRC και 550 άτομα ελέγχου, ο προσδιορισμός των πολυμορφισμών G894T και 4a/b VTR δεν ανέδειξε διαφορά μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων [280]. Το μόνο συμπέρασμα της μελέτης αυτής ήταν ότι το αλληλίο T της θέσης 894 απαντάται πιο συχνά σε άτομα με CRC και οικογενειακό ιστορικό καρκίνου, σε σχέση με τα άτομα με CRC που δεν είχαν οικογενειακό ιστορικό [280]. Μια δεύτερη Κινέζικη μελέτη σε 727 ασθενείς με CRC και (736 υγιείς ως ομάδα ελέγχου), επίσης δεν ανέδειξε στατιστικά συμπεράσματα στην μελέτη και των τριών θέσεων πολυμορφισμού και το μόνο συμπέρασμα είναι ότι το αλληλίο 4a εμφανίζεται πιο συχνά με άτομα με CRC και νεαρή ηλικία έναρξης σε σχέση με τα πιο ηλικιωμένα άτομα με CRC [281]. Αντίθετα μια Τουρκική μελέτη όπου μελετήθηκε μόνο ο πολυμορφισμός G894T, και σε μικρό αριθμό ασθενών με CRC (84 και 99 υγιή άτομα), διαπιστώθηκε ότι ο γονότυπος GG ήταν πιο

συχνός σε άτομα με CRC, παρά σε άτομα ελέγχου (που είχαν κυρίως τον γονότυπο TT) και επομένως ο πολυμορφισμός αυτός μπορεί να συσχετισθεί με την πιθανότητα εμφάνισης CRC [282]. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζονται και από μια πρόσφατη Κορεάτικη μελέτη και στους τρεις πολυμορφισμούς του γονιδίου eNOS, με ικανό αριθμό ατόμων που μελετήθηκαν (528 άτομα με CRC και 509 υγιείς) [283]. Τα συμπεράσματα είναι ότι ενώ ο πολυμορφισμός 4a/b VTR δεν είναι σημαντικός, ο φαινότυπος TC ή CC (της θέσης T786C) και ο φαινότυπος GT ή TT (της θέσης G894T) εμφανίζονται πιο συχνά σε άτομα με CRC παρά στον υγιή πληθυσμό [283].

Μια άλλη επίσης μελέτη σε ασθενείς με CRC, έδειξε ότι το είδος του πολυμορφισμού στην θέση T786C και G894T δεν επηρεάζει την συνολική επιβίωση ή την επιβίωση ελεύθερης νόσου (OS και PFS αντίστοιχα) [284]. Τέλος, δεδομένου του γεγονότος ότι το κάπνισμα έχει συσχετισθεί με τον κίνδυνο εμφάνισης CRC, φαίνεται ότι ο παράγοντας αυτός δεν σχετίζεται σημαντικά με το είδος του πολυμορφισμού του eNOS στην θέση G894T (πίνακας 17) [285].

Για τον CRC, δεν υπάρχουν μετα-αναλύσεις για την σημαντικότητα των πολυμορφισμών αυτών και έτσι ο ρόλος των πολυμορφισμών του eNOS στην εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου παραμένει αμφιλεγόμενος.

| Genetic polymorphism | Never smokers | | 1-29 pack-years | | ≥30 pack-years | | P* | P† |
|----------------------|---------------|------------------|-----------------|------------------|----------------|------------------|------|------|
| | Ca/Co | OR (95% CI)‡ | Ca/Co | OR (95% CI)‡ | Ca/Co | OR (95% CI)‡ | | |
| eNOS | | | | | | | | |
| G/G | 141/125 | 1 | 102/113 | 1 | 40/29 | 1 | | |
| T carriers | 159/160 | 1.01 (0.71-1.44) | 140/146 | 1.08 (0.73-1.61) | 41/27 | 1.35 (0.53-3.43) | 0.96 | 0.79 |

Πίνακας 17. Σχετικός κίνδυνος εμφάνισης CRC ανάλογα με τον πολυμορφισμό του eNOS στην θέση 894, και με το ιστορικό καπνίσματος των ατόμων. Δεν φαίνεται να υπάρχει καμιά στατιστική διαφορά. p*: τιμή συνολικής σύγκρισης (2 βαθμοί ελευθερίας), p†: σύγκριση του γονοτύπου με την παράμετρο των >30 pack-years (1 βαθμός ελευθερίας).

Καρκίνος του προστάτη

Διάφορες μελέτες έχουν γίνει στον καρκίνο του προστάτη (PCa) και την συσχέτιση του με πολυμορφισμούς του γονιδίου eNOS. Οι μελέτες αυτές δεν φαίνεται να αναδεικνύουν σημαντικό προγνωστικό ρόλο για την εμφάνιση PCa σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό. Η μόνη μελέτη που αναδεικνύει την ύπαρξη ενός πολυμορφισμού του eNOS ως κίνδυνου εμφάνισης PCa αναφέρεται σε μια πολυμορφική θέση που δεν μελετάται συχνά (A26G, rs1007311 του ιντρονίου 7) [217].

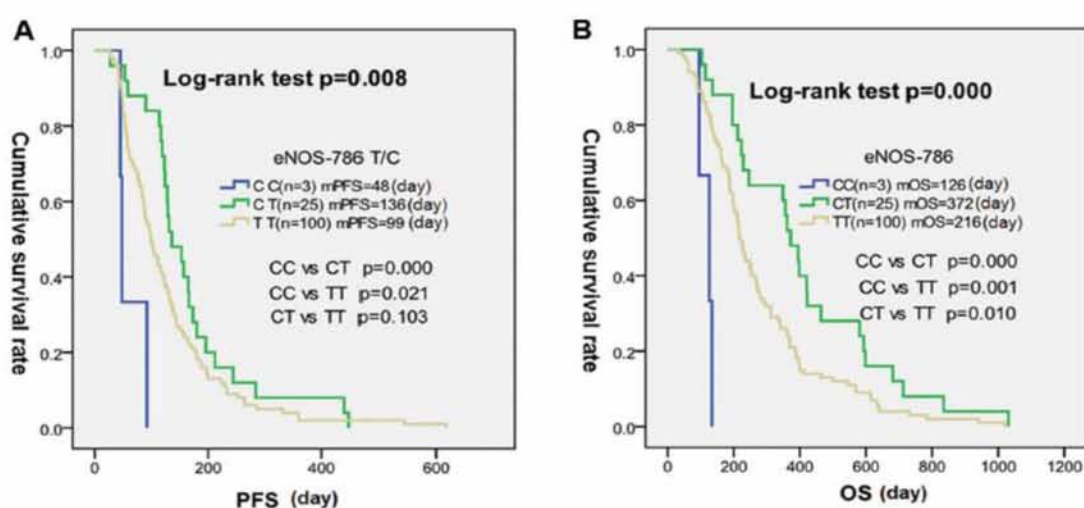
Αντίθετα υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι ο γονότυπος GG της θέσης 894 σχετίζεται με πιο προηγμένο στάδιο καθώς και με την μεταστατικότητα της νόσου [286-288]. Παρομοίως το a αλληλίο του πολυμορφισμού 4a/b VTR (είτε ως ομοζυγωτία aa είτε ως ετεροζυγωτία ab) σχετίζεται με πιο τοπική νόσο και λιγότερο μεταστατική συμπεριφορά έναντι του γονότυπου bb [289].

Η πιο μεγάλη μελέτη που αφορά τον προσδιορισμό και των τριών γνωστών πολυμορφισμών είναι μια πρόσφατη που περιλαμβάνει 170 ασθενείς με PCa και 340 άτομα από την ομάδα ελέγχου [290]. Από την μελέτη αυτή προκύπτει ότι ο πολυμορφισμός G894T επίσης δεν σχετίζεται με την εμφάνιση PCa, ενώ αντίθετα το ο γονότυπος 4a/b της θέσης VTR και ο γονότυπος CC της θέσης 786 σχετίζεται με τον κίνδυνο ανάπτυξης PCa [290]. Επιπρόσθετα, μια άλλη μελέτη που συγκρίνει άτομα με PCa, με άτομα με καλοήγη υπερπλασία προστάτη (και όχι υγιή), δεν αναδεικνύει επίσης στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε ότι αφορά τον πολυμορφισμό G894T [291]. Επομένως και στον καρκίνο του προστάτη τα αποτελέσματα και εδώ είναι διφορούμενα σε ότι αφορά τον προγνωστικό ρόλο των πολυμορφισμών

του eNOS με την ανάπτυξη PCa με τις περισσότερες μελέτες να υποδηλώνουν ότι μάλλον δεν έχει προγνωστική αξία.

Καρκίνος του στομάχου.

Στην βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές προσδιορισμού πολυμορφισμών του γονιδίου του της επαγόμενης συνθάσης (iNOS) με το ρίσκο εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου [292-293]. Αντίθετα υπάρχουν μόνο 2 εργασίες σχετικά με τον προσδιορισμό πολυμορφισμών του eNOS. Η πρώτη από αυτές αναφέρεται στην μελέτη των πολυμορφισμών T786C, G894C και 4a/b VTR σε 50 ασθενείς με γαστρικό καρκίνο και 98 υγιή άτομα [294]. Η μελέτη δείχνει ότι οι πολυμορφισμοί G894T και 4a/b VTR δεν έχουν στατιστική και προγνωστική σημασία σε αντίθεση με την γονιδιακή θέση 786 όπου το αλληλίο C σχετίζεται με αυξημένο ρίσκο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου. Στην δεύτερη μελέτη, φαίνεται μάλιστα ότι η παρουσία του C αλληλίου χαρακτηρίζεται από χειρότερη επιβίωση των ασθενών (OS και PFS) (εικόνα 20) [295].



Εικόνα 20. Επιβίωση ελεύθερης νόσου (PFS) και συνολική επίβιωση (OS) σε ασθενείς με γαστρικό καρκίνο ανάλογα με την παρουσία του C αλληλίου στον πολυμορφισμό θέσης 786. Τα ομοζυγωτικά άτομα CC, έχουν χειρότερο OS και PFS σε σχέση με τα ετεροζυγωτικά ή τα ομοζυγωτικά TT άτομα.

Καρκίνος της ουροδόχου κύστεως.

Τρεις βιβλιογραφικές αναφορές υπάρχουν πάνω στην μελέτη πολυμορφισμών του eNOS και τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (UBC). Στην πρώτη από αυτές μελετάται ο πολυμορφισμός 4a/b της VTR σε 123 άτομα με UBC και 201 άτομα ομάδας ελέγχου και το συμπέρασμα στο οποίο καταλήγει είναι ότι ο γονότυπος aa είναι πιο συχνός στον καρκίνο UBC σε σχέση με τα υγιή άτομα (πίνακας 18) [296]. Στην δεύτερη, μελετάται σε 66 άτομα με UBC και 88 υγιή ο πολυμορφισμός G894T, όπου φαίνεται ότι παρουσία του T αλληλίου απαντάται πιο συχνά στα άτομα με UBC και όχι στα υγιή άτομα και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας κινδύνου εμφάνισης καρκίνου ουροδόχου κύστεως (πίνακας 19) [297]. Τέλος σε μια τρίτη μελέτη με πολύ μεγαλύτερο αριθμό ασθενών (359 με καρκίνο και 164 άτομα από τον γενικό πληθυσμό), δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με τον πολυμορφισμό G894T, αλλά ο πολυμορφισμός T786C που επίσης μελετήθηκε αναδεικνύει την παρουσία του C αλληλίου ως παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης UBC (πίνακας 20) [298].

| eNOS4a/b | No. Controls | No. Pts | aOR (95% CI)* | p Value |
|----------|--------------|------------|------------------|---------|
| bb | 137 (68.2) | 52 (42.3) | Referent | |
| ab | 59 (29.4) | 63 (51.2) | 2.83 (1.67–4.70) | 0.000 |
| aa | 5 (2.5) | 8 (6.5) | 2.12 (1.12–3.99) | 0.019 |
| aa + ab | 64 (31.8) | 71 (57.7) | 3.04 (1.90–4.85) | 0.000 |
| b allele | 333 (82.8) | 167 (67.8) | Referent | |
| a allele | 69 (17.1) | 79 (32.1) | 2.28 (1.57–3.31) | 0.000 |

Πίνακας 18. Enos4a/b γονότυποι και συχνότητα αλληλίων σε ασθενείς με UBC και σε υγιή άτομα. Φαίνεται ότι η παρουσία του a αλληλίου προδιαθέτει για την εμφάνιση UBC.

| | | Patients n (%) | Controls n (%) | OR | 95%CI |
|----------|---------|-------------------|-------------------|------|-----------|
| Genotype | GG | 7 (10.6) | 31 (35.2) | 0.30 | 0.14-0.64 |
| | GT | 49 (74.2) | 44 (50) | 1.48 | 1.15-1.91 |
| | TT | 10 (15.2) | 13 (14.8) | 1.02 | 0.48-2.19 |
| | P Value | P=0.002 | | | |
| Alleles | G | 63 (47.7) | 106 (39.8) | | |
| | T | 69 (52.3) | 70 (39.8) | | |
| | P Value | P=0.029 | | | |

Πίνακας 19. Συχνότητα γονοτύπων και αλληλίων της θέσης G894T σε άτομα με UBC και σε υγιή άτομα. Φαίνεται ότι η παρουσία του T αλληλίου σχετίζεται με αυξημένο ρίσκο εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως.

| Polymorphism | Genotype | Bladder Cancer Cases n (%) | Population Controls n (%) | OR (95% CI) | p-value | *OR adjusted (95% CI) | p-value |
|--------------|------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------|-------------------------|--------------|
| T-786C | TT | 152 (45.5) | 84 (54.2) | 1.00 | | 1.00 | |
| | CT | 142 (42.5) | 63 (40.6) | 1.25 (0.84-1.86) | 0.280 | 1.09 (0.70-1.69) | 0.701 |
| | CC | 40 (12.0) | 8 (5.2) | 2.76 (1.24-6.18) | 0.013 | 2.88 (1.21-6.85) | 0.017 |
| | T (allele) | 446 (66.8) | 231 (74.5) | 1.00 | | 1.00 | |
| | C (allele) | 222 (33.2) | 79 (25.5) | 1.46 (1.08-1.97) | 0.015 | 1.39 (1.00-1.93) | 0.049 |
| Glu298Asp | GG | 128 (48.9) | 75 (50.0) | 1.00 | | 1.00 | |
| | GT | 106 (40.5) | 62 (41.3) | 1.00 (0.66-1.53) | 0.993 | 1.04 (0.65-1.65) | 0.878 |
| | TT | 28 (10.7) | 13 (8.7) | 1.26 (0.62-2.59) | 0.525 | 1.11 (0.51-2.42) | 0.791 |
| | G (allele) | 362 (69.1) | 212 (70.7) | 1.00 | | 1.00 | |
| | T (allele) | 162 (30.9) | 88 (29.3) | 1.08 (0.79-1.47) | 0.635 | 1.05 (0.75-1.48) | 0.780 |

Πίνακας 20. κατανομή συχνοτήτων των γονοτύπων των δύο πολυμορφισμών του eNOS που μελετήθηκαν. Ο πολυμορφισμός G894T δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ υγιών και απόμων με UBC σε αντίθεση με τον πολυμορφισμό στην θέση 786, όπου η παρουσία του C αλληλίου σχετίζεται με αυξημένο ρίσκο εμφάνισης UBC.

Καρκίνος του πνεύμονα

Μια αρχική μελέτη το 2000 είχε αναδείξει ότι τα άτομα με καρκίνο του πνεύμονα, ανεξαρτήτου μορφής είχαν διαφορετική κατανομή γονοτύπων του πολυμορφισμού 4a/b VTR του eNOS σε σχέση με υγιή άτομα ελέγχου, με υπεροχή της εύρεσης του b αλληλίου (πίνακας 21) [299]. Μια νεότερη μελέτη σε 108 άτομα με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα αναδεικνύει επίσης ότι η παρουσία του a αλληλίου αυξάνει σημαντικά την συνολική επιβίωση (OS) σε σχέση με τα άτομα που φέρουν το bb γονότυπο

[300]. Τέλος μια πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι το είδος του πολυμορφισμού του γονιδίου του eNOS δεν σχετίζεται με την ανταπόκριση των ασθενών στην χημειοθεραπεία [301]. Επομένως η χρησιμότητα του προσδιορισμού πολυμορφισμών του eNOS σε άτομα με καρκίνο του πνεύμονα είναι αμφιλεγόμενη.

| | Lung cancer (n = 218) | | | |
|-----------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| | Normal controls (n = 121) | Adenocarcinoma (n = 76) | Squamous cell cancer (n = 54) | Small cell cancer (n = 88) |
| bb | 91 (75%) | 50 (93%) | 78 (89%) | 69 (91%) |
| ba | 29 (24%) | 4 (7%) | 9 (10%) | 6 (8%) |
| aa | 1 (1%) | 0 (0%) | 1 (1%) | 1 (1%) |
| χ^2 value, | | 7.28 | 6.48 | 8.29 |
| p value* | | p = 0.03 | p = 0.04 | p = 0.02 |

Πίνακας 21. Συχνότητα γονοτύπων του πολυμορφισμού VTR σε άτομα με καρκίνο του πνεύμονα και σε υγιή άτομα.

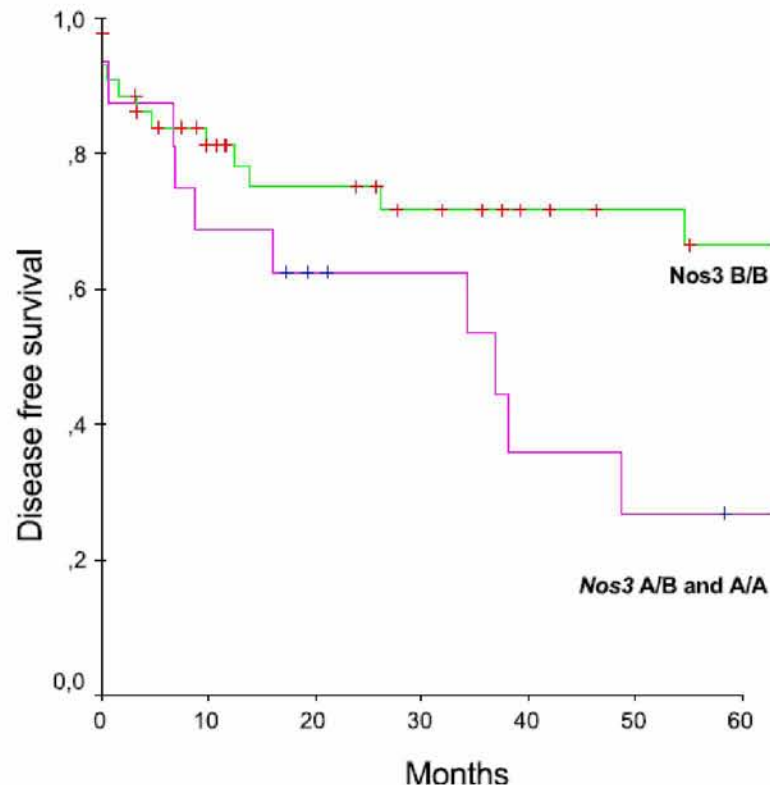
Καρκίνος των ωοθηκών

Σε μια και μοναδική βιβλιογραφική αναφορά που αναφέρεται στην μελέτη των πολυμορφισμών G894T και 4a/b VTR του γονιδίου eNOS σε 130 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών δεν διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα 133 άτομα υγιή άτομα της ομάδας ελέγχου [302]. Αντίθετα η παρουσία του αλληλίου b, στα άτομα με καρκίνο των ωοθηκών σχετίζονταν με πιο προχωρημένο στάδιο νόσου και με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων [302].

Καρκίνος του αιδοίου

Σε μια μοναδική μελέτη που αφορά τον καρκίνο του αιδοίου, σε 68 ασθενείς και 228 υγιείς γυναίκες, ο πολυμορφισμός 4a/b του γονιδίου eNOS δεν

φάνηκε να σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου ούτε τα με κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της νόσου, αλλά αντίθετα φαίνεται ότι επηρεάζει την επιβίωση ελεύθερης νόσου (DFS) των ασθενών (εικόνα 21). Αντίθετα η μελέτη του G894T δεν κατέληξε σε κανένα στατιστικά σημαντικό συμπέρασμα [303].



Εικόνα 21. Επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS) σε ασθενείς με καρκίνο του αιδοίου ανάλογα με την παρουσία b ή a αλληλίων του πολυμορφισμού VTR του γονιδίου Epos.

Ηπατοκυτταρικός καρκίνος

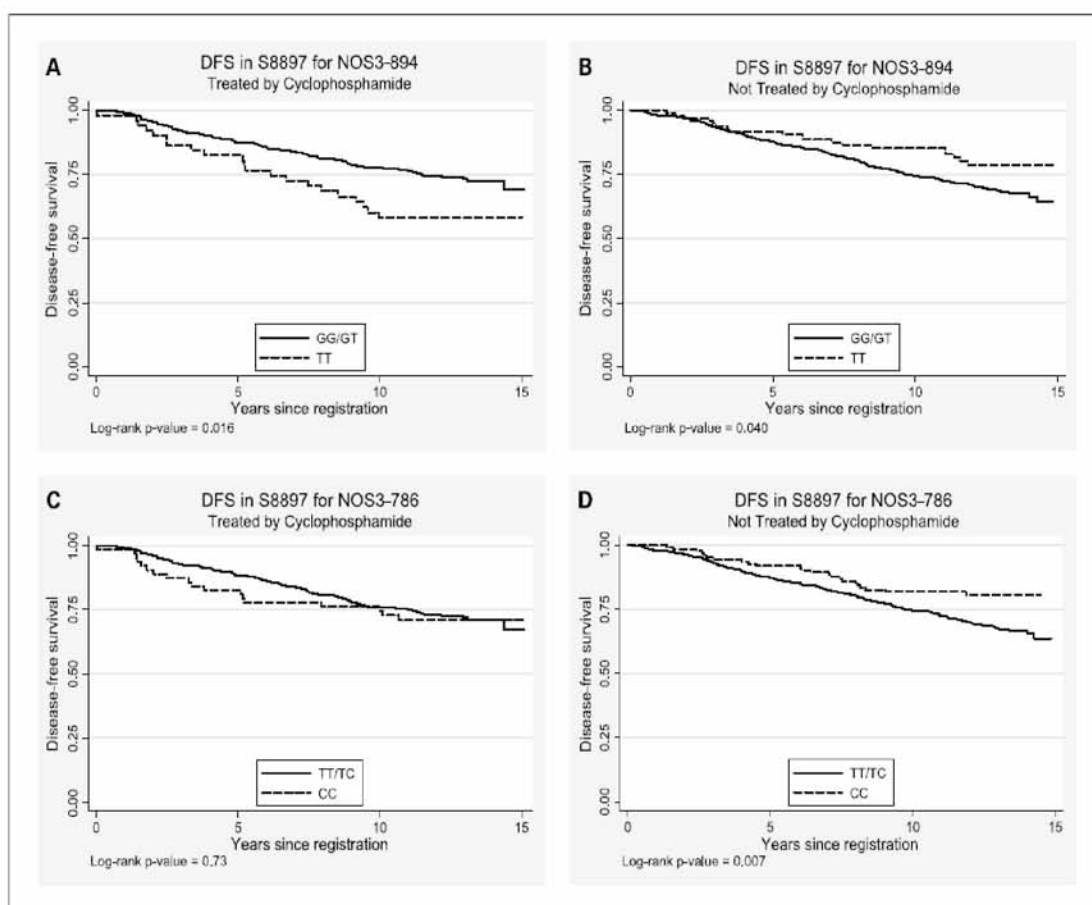
Σε μια μελέτη που δημοσιεύθηκε πρόσφατα και αφορούσε 293 ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνο και 384 άτομα υγιή ως ομάδα ελέγχου, η μελέτη του πολυμορφισμού 4a/b VTR του γονιδίου eNOS δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ως προς τον προγνωστικό του ρόλο [304]

Καρκίνος του μαστού

Υπάρχουν λίγες μόνο βιβλιογραφικές αναφορές που μελετούν τον συσχέτισμό των πολυμορφισμών του eNOS με την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Οι αναφορές αυτές θα αναλυθούν στο ειδικό μέρος της διατριβής αυτής κάνοντας συγχρόνως και σύγκριση με τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης.

Η μελέτη όμως των πολυμορφισμών του eNOS έχει γίνει και σε σχέση με ειδικές παραμέτρους που αφορούν την εξέλιξη της νόσου. Για παράδειγμα σε μια από τις πιο σημαντικές από αυτές τις εργασίες μελετήθηκε σε 1322 γυναίκες κατά πόσο ο πολυμορφισμός του επηρεάζει την DFS (disease free survival- επιβίωση ελεύθερης νόσου) και την ανταπόκριση στην θεραπεία [305]. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι ο πολυμορφισμός T θέσης 894 και στην ομόζυγο του μορφή (TT) δίνει καλύτερη επιβίωση ελεύθερης νόσου σε ασθενείς που δεν έλαβαν adjuvant θεραπεία ενώ οι ομόζυγοι TT, που έλαβαν θεραπεία με κυκλοφωσφαμίδη είχαν χειρότερη επιβίωση σε σχέση με τον γονότυπο GG/GT [305]. Αντίθετα η μελέτη για τον πολυμορφισμό 786 T->C έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά (καλύτερη DFS) μόνο στις γυναίκες που δεν έλαβαν θεραπεία [305] (εικόνα 22). Με βάση αυτές τις πληροφορίες οι συγγραφείς προχώρησαν σε συνδυαστική ανάλυση των δύο πολυμορφισμών από τις οποίες προέκυψε ότι τα άτομα που είναι διπλά ομόζυγα- TT για τη θέση πολυμορφισμού 894 και CC για την θέση πολυμορφισμού 786 είχαν σημαντικά μικρότερο σχετικό κίνδυνο εμφάνισης υποτροπής (άρα και μεγαλύτερη DFS) σε σχέση με τον υπόλοιπο συνδυασμό γονοτύπων (εικόνα 23) [305]. Με βάση λοιπόν την μελέτη αυτή

ο προσδιορισμός των πολυμορφισμών του eNOS μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός παράγοντας αντήπκρισης στην θεραπεία.



Εικόνα 22. Ο πολυμορφισμός της θέσης 894 του γονιδίου eNOS επηρεάζει την DFS των ασθενών ανεξάρτητα εάν λαμβάνουν ή όχι χημειοθεραπεία με την ομοζυγωτία TT να σχετίζεται με καλύτερη DFS στους ασθενείς που λαμβάνουν αγωγή με κυκλοφωσφαμίδη (A και B). Αντίθετα η μελέτη της θέσης πολυμορφισμού 786 ανέδειξε πιο ασθενή αποτελέσματα καθώς η ομοζυγωτία επηρεάζει μόνο τους ασθενείς που δεν έλαβαν κυκλοφωσφαμίδη και δεν χρησιμεύει ως προγνωστικός δείκτης για τους ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία (C και D).

| Genotype | | Treated | | | Untreated | | |
|--------------------------|----------|------------|-----------|------------------|------------|------------|------------------|
| NOS3-786 | NOS3 894 | Censored | Failures | aHR (95% CI) | Censored | Failures | aHR (95% CI) |
| TT + TC | GG + GT | 253 (80.6) | 93 (78.2) | 1.0 | 467 (76.8) | 215 (85.7) | 1.0 |
| TT + TC | TT | 18 (5.7) | 8 (6.7) | 1.19 (0.57-2.47) | 39 (6.4) | 13 (5.2) | 0.84 (0.48-1.48) |
| CC | GG + GT | 30 (9.6) | 6 (5.0) | 0.63 (0.27-1.44) | 62 (10.2) | 17 (6.8) | 0.67 (0.41-1.10) |
| CC | TT | 13 (4.1) | 12 (10.1) | 2.32 (1.26-4.25) | 40 (6.6) | 6 (2.4) | 0.42 (0.19-0.95) |
| <i>P for interaction</i> | | | | | | | 0.008 |

Εικόνα 23. Η συνδυαστική ανάλυση των δύο πολυμορφισμών που μελετήθηκαν οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η διπλή ομοζυγωτία TT894,CC786 σχείζεται με σημαντικά μικρότερο κίνδυνο υποτροπής στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού (HR 0,42),

Σε μια προηγούμενη άλλωστε μελέτη που αφορούσε 873 γυναίκες με καρκίνου του μαστού, παρατηρήθηκε ότι τα άτομα με ομοζυγωτία 786CC είχαν χειρότερο προσδόκιμο επιβίωσης (όπως εκφράζεται με την συνολική επιβίωση OS) σε σύγκριση με τους άλλους συνδυασμούς (HR 2,1), σε αντίθεση με την θέση του 894 του γονιδίου eNOS, όπου δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την OS [306].

Ενδιαφέρουσα είναι επίσης η παρατήρηση (αν και δεν αναφέρεται στην μελέτη των συνηθισμένων τριών πολυμορφισμών που συνήθως προσδιορίζονται) ότι ο πολυμορφισμός του eNOS, μπορεί να συσχετισθεί με το κίνδυνο ανάπτυξης επιπλοκών από την ακτινοθεραπεία [307]. Πιο συγκεκριμένα, η μεταλλαγή στην θέση 63 (εξόνιο 8 rs no 1799983) από G σε T φαίνεται ότι σχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης τηλεαγγειακτασιών και σημαντικής υποδόριας ίνωσης μετά από την ακτινοθεραπεία, γεγονός που ερμηνεύεται σαν αποτέλεσμα μικρότερης βιοδιαθεσιμότητας του NO ανάλογα με τον πολυμορφισμό [307]. Παρόμοια, μια πιο πρόσφατη μελέτη σε 286 ασθενείς με καρκίνο του μαστού, που αφορά την θέση 894 του γονιδίου eNOS δείχνει ότι οι ομοζυγώτες TT για την

θέση G894T σε σχέση με τους φορείς G (GT ή GG) είχαν πάνω διπλάσιο κίνδυνο τοξικότητας από την ακτινοθεραπεία (HR 2,473) [308].

Μια παρόμοια μελέτη αφορούσε την ίδια θέση πολυμορφισμού (θέση 63, εξόνιο 8) του eNOS, σχετικά με τον τρόπο που το lifestyle (διατροφή, παχυσαρκία, κάπνισμα, κατανάλωση αλκοόλ και χρήση ορμονικών σκευασμάτων) μπορεί να επηρεάσει τον βαθμό τοξικότητας της ακτινοθεραπείας σε ασθενή με καρκίνο του μαστού [309]. Το βασικό συμπέρασμα αυτής της μελέτης ήταν ότι τα παχύσαρκα άτομα (BMI>25) με πολυμορφισμό GG63 είχαν πάνω από 6 φορές αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη τοξικότητας (HR 6,39) [309]. Ανάλογη μελέτη πάνω στον πολυμορφισμό της θέσης T894G και το κάπνισμα, έδειξε ότι άτομα με γονότυπο GG και TT είχαν δυο φορές αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε σχέση με τον γονότυπο 894GG [310].

Μια εξίσου ενδιαφέρουσα παρατήρηση όμως προέκυψε σε μια πρόσφατη μελέτη [311]. Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν οι δύο πιο κοινοί πολυμορφισμοί στις θέσεις 894 και 786. Παρόλο που στην μελέτη αυτή (που αφορούσε 512 άτομα με καρκίνο του μαστού και άλλους 512 ως ομάδα ελέγχου), δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σχετικά με τον ρίσκο εμφάνισης καρκίνου, η σημαντική παρατήρηση είναι ότι η προσθήκη στην διατροφή αντιοξειδωτικών μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα [311]. Συγκεκριμένα η χορήγηση βιταμίνης E ενισχύει την προστατευτική δράση της μεταλλαγής 786 T→C ενώ η χορήγηση φολικού οξέος ενισχύει την προστατευτική δράση της μεταλλαγής 894G→T (εικόνα 24) [311].

Combined effect between NOS3 genetic polymorphisms and antioxidant vitamins on the risk of breast cancer.

| Vitamins | NOS3 786 T > C | | | NOS3 894 G > T | | | Diplotype | | |
|------------|-------------------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|
| | TT | TT + CC | P _{int} | GG | GT + TT | P _{int} | TC:TC | Others | P _{int} |
| Vitamin A | 0.75 (0.54–1.05) [†] | 0.92 (0.47–1.81) | 0.61 | 0.79 (0.57–1.09) | 0.59 (0.26–1.31) | 0.34 | 0.75 (0.52–1.09) | 0.81 (0.49–1.36) | 0.41 |
| Retinol | 0.92 (0.65–1.30) | 0.81 (0.40–1.04) | 0.50 | 0.95 (0.68–1.32) | 0.61 (0.26–1.42) | 0.21 | 1.03 (0.70–1.51) | 0.70 (0.40–1.20) | 0.30 |
| β-carotene | 0.73 (0.53–1.01) | 1.04 (0.55–1.98) | 0.38 | 0.75 (0.55–1.02) | 0.85 (0.39–1.84) | 0.47 | 0.68 (0.47–0.96) | 0.99 (0.60–1.63) | 0.25 |
| Vitamin E | 0.68 (0.46–1.01) | 0.41 (0.17–0.98) | 0.48 | 0.67 (0.45–0.99) | 0.58 (0.25–1.39) | 0.51 | 0.75 (0.48–1.18) | 0.43 (0.23–0.81) | 0.25 |
| Vitamin C | 1.00 (0.74–1.37) | 0.40 (0.76–2.56) | 0.28 | 1.23 (0.91–1.66) | 0.54 (0.26–1.11) | 0.30 | 1.23 (0.87–1.74) | 0.86 (0.54–1.36) | 0.31 |
| Folic acid | 0.66 (0.47–0.93) | 1.19 (0.60–2.39) | 0.19 | 0.80 (0.57–1.13) | 0.44 (0.19–1.00) | 0.22 | 0.70 (0.48–1.03) | 0.82 (0.49–1.39) | 0.74 |

Εικόνα 24. Η προσθήκη βιταμίνης E στην διατροφή φαίνεται ότι ενισχύει την προστατευτική δράση της μετάλλαξης C στην θέση 786 του γονιδίου eNOS για την εμφάνιση καρκίνου μαστού. Επίσης η προσθήκη φολικού οξέος φαίνεται ότι ενισχύει την προστατευτική δράση της μεταλλαγής T στην θέση 894. Η χορήγηση β καροτενίων τέλος φαίνεται ότι επηρεάζει προσδίδει μικρότερο ρίσκ εμφάνισης καρκίνου του μαστού μόνο στα άτομο με συνδυασμό πολυμορφισμών T786G/T894G για τις δύο θέσεις του γονιδίου eNOS που μελετήθηκαν.

Τέλος σε μια μελέτη σε 1721 άτομα με καρκίνο του μαστού όπου μελετήθηκαν και εδώ οι δύο πιο κοινοί πολυμορφισμοί οι T894G και C786T σε σύγκριση με 1211 άτομα ομάδας ελέγχου, δεν παρατηρήθηκε και εδώ καμιά σημαντική επίδραση των πολυμορφισμών στο ρίσκο εμφάνισης καρκίνου [312]. Αντίθετα, μελετώντας τους ασθενείς με καρκίνο μαστού, διαπίστωσαν ότι το αλληλίο -786C σχετίζονταν με μια πιο επιθετική νόσο (αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης λεμφαδενικών μεταστάσεων) [312].

Φαίνεται επομένως ότι οι πολυμορφισμοί του γονιδίου eNOS, λόγω μεταβολής της βιοδιαθεσιμότητας του NO και επομένως της οξειδωτικής κατάστασης των κυττάρων, μπορούν να επηρεάσουν ποικιλοτρόπως την εμφάνιση και την πορεία εξέλιξης του καρκίνου του μαστού καθώς και την ανταπόκριση στην θεραπεία.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες μόνο αναφορές για την μελέτη πολυμορφισμών του γονιδίου του eNOS σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και σε διάφορες θέσεις, με αντικρουόμενα μεταξύ τους αποτελέσματα. Για την διατριβή αυτή επιλέχθηκαν να μελετηθούν πολυμορφισμοί σε τρεις θέσεις του γονιδίου, οι οποίοι δεν έχουν μελετηθεί πολύ στον καρκίνο του μαστού, αλλά αντίθετα έχουν μελετηθεί σε μια σειρά από άλλες παθολογικές καταστάσεις. Επιπρόσθετα, έγινε μέλετη της σημασίας όχι μόνο των πολυμορφισμών αλλά και της ύπαρξης απλοτύπων, η οποία μπορεί να δώσει επιπλέον πληροφορίες. Για παράδειγμα υπάρχουν διάφορες εργασίες σε ασθενείς με υπέρταση, όπου η απλή μελέτη των πολυμορφισμών του eNOS δεν σχετίστηκε με αυξημένο ρίσκο ανάπτυξης υπέρτασης, αλλά αντίθετα η μελέτη των απλοτύπων του eNOS, ανέδειξε την σημαντική συσχέτιση τους με την ανάπτυξη υπέρτασης. Τέλος έγινε μεσω μετα-ανάλυσης σύγκριση των δικών μας αποτελεσμάτων με αυτά που υπάρχουν στην διεθνή βιβλιογραφία σε ότι αφορά την χρησιμότητα μελέτης των πολυμορφισμών του eNOS σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Μελετήθηκαν συνολικά 306 ασθενείς με καρκίνο του μαστού που προσήλθαν στην Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Όλοι οι ασθενείς ήταν γυναίκες και είχαν υποβληθεί σε χημειοθεραπεία (συνδυασμός με 5-φθορο-ουρακίλη, ανθρακυκλίνες, ταξάνες και κυκλοφωσφαμίδη). Ως ομάδα ελέγχου (controls) μελετήθηκαν 106 άτομα τα οποία ήταν ελεύθερα συμπτωμάτων για κάποια χρόνια παθολογική κατάσταση (νεφρική, καρδιαγγειακή, ηπατική, ενδοκρινολογική

ή ψυχιατρική νόσο ή οποιασδήποτε μορφής κακοήθειας) και δεν είχαν εξ' αίματος συγγένεια πρώτου βαθμού με κάποιο από τα άτομα της ομάδας των ασθενών. Από κάθε άτομο (ασθενείς και ομάδα ελέγχου) ελήφθη ποσότητα αίματος που χρησιμοποιήθηκε για βασικό βιοχημικό έλεγχο και για εξαγωγή DNA. Όλα τα άτομα συνένεσαν γραπτώς στην συμμετοχή τους στην εργασία αυτή, η οποία και ενεκρίθη από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου.

Η μέση ηλικία των ασθενών με ΚΜ ήταν $60,9 \pm 11,9$ μήνες, ενώ η μέση ηλικία των ατόμων της ομάδας ελέγχου ήταν $40,7 \pm 16,9$ μήνες. 34 ασθενείς με ΚΜ ήταν σταδίου I (11%), 98 ασθενείς (32%) ήταν σταδίου II, 73 ασθενείς με ΚΜ ήταν σταδίου III (24%) και οι υπόλοιποι 101 ασθενείς (33%) ήταν σταδίου IV. Η αντίστοιχη ταξινόμηση τους σε grade ήταν 28 ασθενείς (9%) grade I, 171 ασθενείς (56%) grade II και οι υπόλοιποι 107 ασθενείς με ΚΜ (35%) ήταν grade III. Σε ότι αφορά την έκφραση υποδοχέων οιστρογόνων (ER, estrogen reseptor) και προγεστερόνης (PR, progesteron reseptor), το 84% (257/306) των ασθενών με ΚΜ ήταν θετικοί για την έκφραση του ER και το υπόλοιπο 16% (49/306) ήταν δεν εξέφραζαν τον υποδοχέα, ενώ τα ποσοστά για τον PR ήταν 60% (184/306) και 40% (133/306) για τους θετικούς στην έκφραση και τους αρνητικούς αντίστοιχα. 190 ασθενείς είχαν τουλάχιστον ένα θετικό λεμφαδένα για μετάσταση (62%) ενώ στους υπόλοιπους 106 (38%), δεν ανιχνεύθηκε κανέναν μεταστατικός λεμφαδένας. Τέλος από πλευράς ιστολογικής διαφοροποίησης του καρκίνου του μαστού, η πλειονότητα των ασθενών με ΚΜ; 84% (257/306) ήταν ductal, και ακολούθως το 9% (28/306) ήταν lobular. 9 ασθενείς (3%) ήταν μεικτού τύπου (mixed) ενώ οι υπόλοιποι 12 ασθενείς με ΚΜ είχαν ιστολογία

διαφόρων άλλων σπανιότερων τύπων. Τα βασικότερα χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο του μαστού φαίνονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 1.

| Παράμετρος | % |
|---------------------|----|
| Στάδιο | |
| I | 11 |
| II | 32 |
| III | 24 |
| IV | 33 |
| Grade | |
| I | 9 |
| II | 56 |
| III | 35 |
| ER status | |
| Θετικοί | 84 |
| Αρνητικοί | 16 |
| PR status | |
| Θετικοί | 60 |
| Αρνητικοί | 40 |
| LN συμμετοχή | |
| N>0 | 62 |
| N<0 | 38 |
| Ιστολογία | |
| Ductal | 84 |
| Lobulal | 9 |
| Μεικτά | 3 |
| άλλα | 4 |

Πίνακας 1. Βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο του μαστού που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη. ER; estrogen receptor, PR; progesterone receptor, LN; lymph node.

ΜΕΘΟΔΟΣ

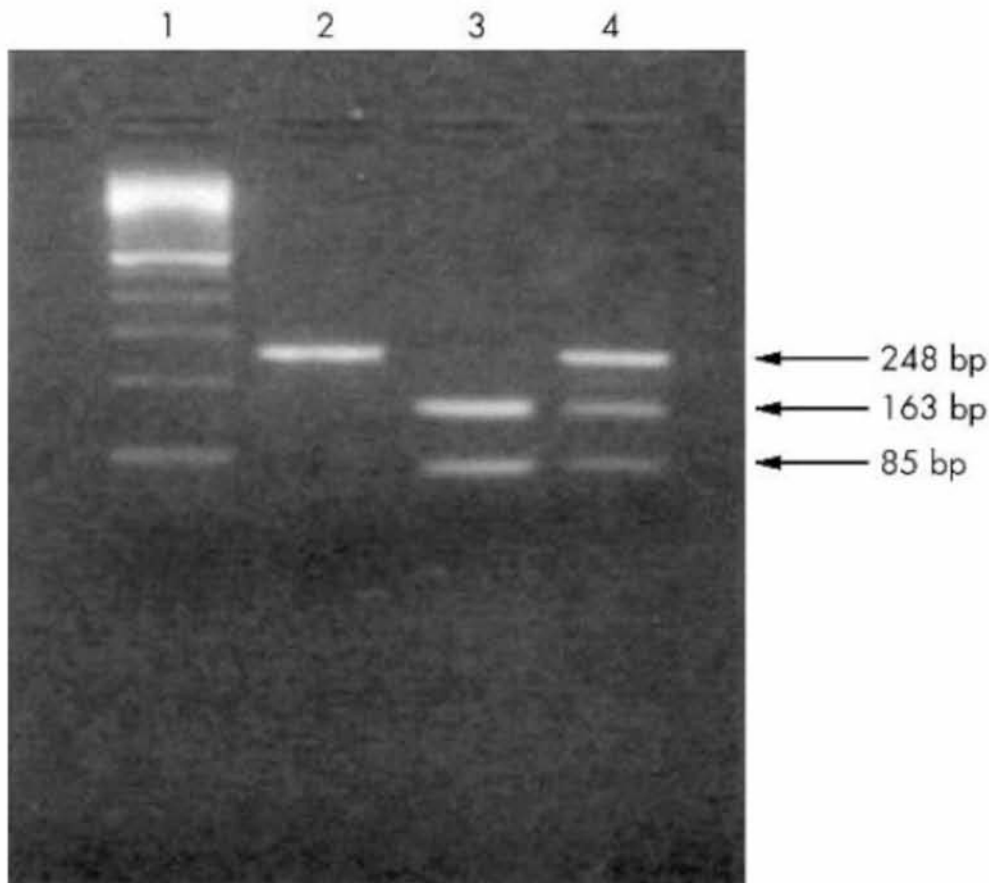
Για κάθε ασθενή και άτομο της ομάδας ελέγχου, έγινε εξαγωγή του γενωμικού DNA από δείγμα ολικού αίματος χρησιμοποιώντας εμπορικό kit (QIAamp DNA blood kit, QIAGEN, Valencia, CA, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Η γονοτύπωση για κάθε πολυμορφισμό έγινε κάνοντας ενίσχυση ενός δείγματος 50 έως 100 ng από το απομονωθέν γενωμικό DNA. Η γονοτύπωση έγινε στο εργαστήριο από άτομο, το οποίο εργαζόταν «τυφλά», δηλαδή δεν είχε γνώση της κλινικής κατάστασης του ατόμου όπου ανήκε το δείγμα (δηλαδή εάν επρόκειτο για ασθενή με ΚΜ ή αν ανήκε στην ομάδα ελέγχου).

G7894T (Glu298Asp) πολυμορφισμός

Ο παραπάνω πολυμορφισμός μελετήθηκε με PCR-RFLP ανάλυση (PCR-restriction fragment polymorphism analysis, δηλαδή ανάλυση μετά από ενίσχυση, χρωμοσωμικών θραυσμάτων που προκύπτουν από την χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών). Ως εκκινήτες (primers) της PCR χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες 5'-TGGCCTGAAGTGCCTGGAGAGT-3' (forward αλληλουχία) και 5'-AAGTGGGGGACACAAAAGAGCA-3' (reverse αλληλουχία) [313]. Η περιοριστική ενδονουκλεάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η BanII (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) [313]. Μετά από πέψη με την ενδονουκλεάση, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν χρησιμοποιώντας πηκτή αгарόζης σε συγκέντρωση 4%, ενώ η οπτικοποίηση (χρωματισμός) των θραυμάτων έγινε με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Άτομα που έχουν το άγριο στέλεχος του γονιδίου (T στην νουκλεοτιδική αλληλουχία και glu στην πεπτιδική αλληλουχία) εμφανίζουν στην ηλεκτοφόρηση δυο μπάντες 83 και 165 bp ενώ το μεταλλαγμένο στέλεχος (C στην νουκλεοτιδική αλληλουχία, Asp στην αμινοξική αλληλουχία) εμφανίζουν στην ηλεκτοφόρηση μια μπάντα 248 bp (εικόνα 2). Πρακτικά η περιοριστική ενδονουκλεάση BanII, στο άγριο στέλεχος μπορεί να κόβει ένα χρωμοσωμικό θραύσμα 248 bp σε δύο επιμέρους θραύσματα (83 + 165 bp=248) ενώ στο μεταλλαγμένο στέλεχος το ένζυμο δεν δρα και έτσι παραμένει ανέπαφο το θραύσμα αυτό [264, 313].



Εικόνα 1. Αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση BanII, το σημείο τομής αυτής και τα τελικά προϊόντα. Στο άγριο στέλεχος το ένζυμο μπορεί να αναγνωρίσει αλληλουχία δράσης, σε αντίθεση με το μεταλλαγμένο όπου η αλληλουχία δράσης του ενζύμου καταργείται.

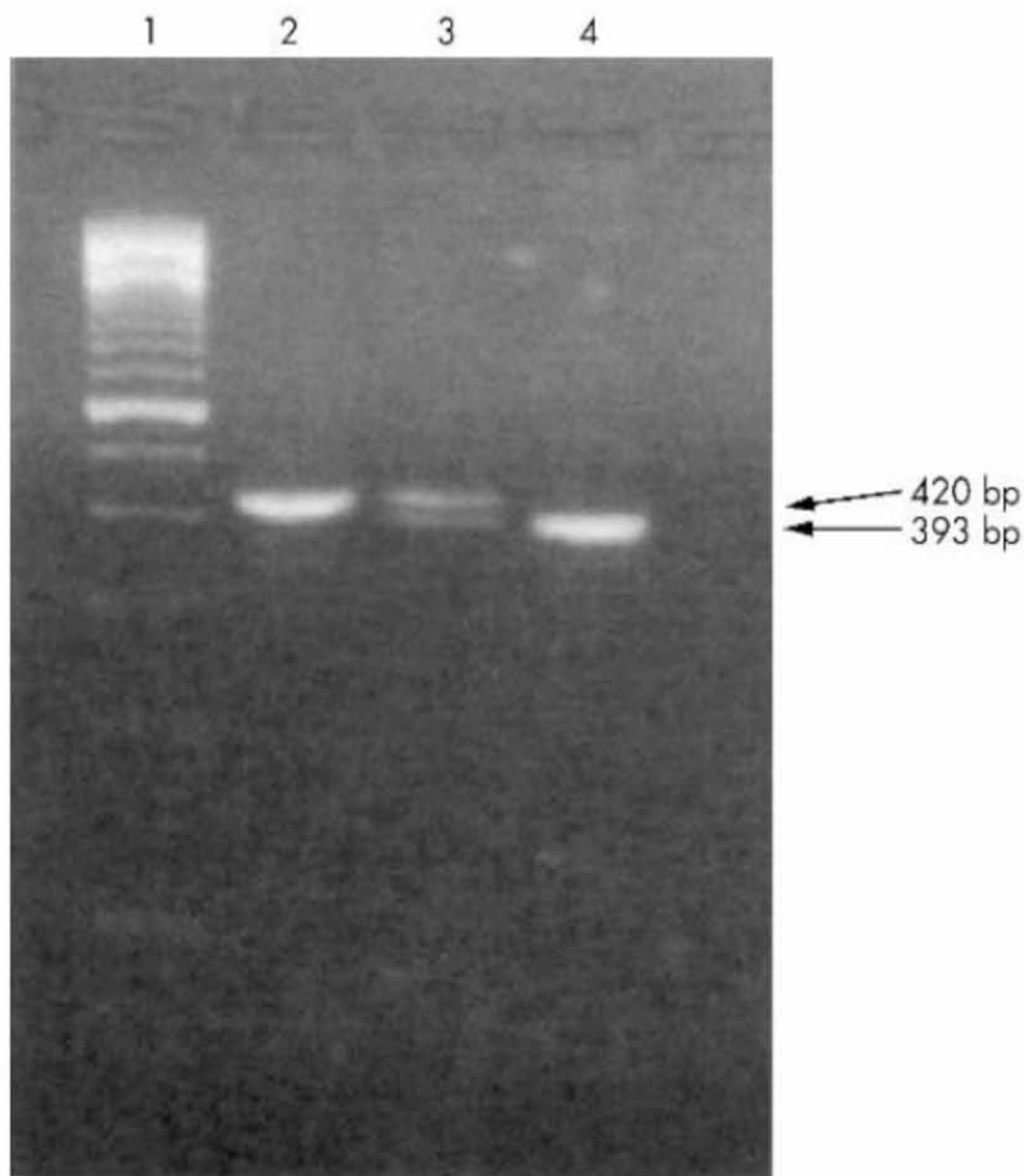


Εικόνα 2. Ανάλυση του T894C (Glu298Asp) πολυμορφισμού στο εξόνιο 7 του γονιδίου του eNOS. Τριών ειδών θραύσματα μπορούν να παρατηρηθούν μετά από επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση BanII. Σειρά 1: μάρτυρας μεγέθους, σειρά 2: άτομο με ομοζυγωτία Asp/Asp, σειρά 3: άτομο με ομοζυγωτία Glu/Glu, σειρά 4: άτομο με ετεροζυγωτία Glu/Asp.

Intron 4, VNTR, b/a πολυμορφισμός

Η ανίχνευση του πολυμορφισμού στο ιντρόνιο 4 έγινε με παρόμοια τεχνική (PCR-RFLP) χρησιμοποιώντας ως εκκινητές (primers) τις παρακάτω νουκλεοτιδικές αλληλουχίες: 5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTT-3' (forward) και 3'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-5' που είναι οι πλευρικές (αρχική ή τελική) αλληλουχίες για το ιντρόνιο 4 [264]. Ο διαχωρισμός γίνεται κα εδώ με ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιώντας πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 2,5%. Έτσι το άγριο στέλεχος (b) που έχει 5 επαναλήψεις της αλληλουχίας των 27 bp θα δώσει στην ηλεκτροφόρηση μια μπάντα 420 bp ενώ το μεταλλαγμένο

στέλεχος (a) που έχει 4 επαναλήψεις θα δώσει μια μικρότερη μπάντα 393 bp (μικρότερη κατά 27bp όσο το μήκος δηλαδή της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας) (εικόνα 3).



Εικόνα 3. Ανάλυση του VNTR πολυμορφισμού στο εσόνιο 4 του γονιδίου του eNOS. Η μπάντα των 420 bp αντιπροσωπεύει 5 επαναλήψεις της αμινοξικής ακολουθίας των 27 bp (που χαρακτηρίζεται ως μορφή b), ενώ η μπάντα των 393 bp αντιπροσωπεύει 4 επαναλήψεις της ακολουθίας (που χαρακτηρίζεται ως μορφή a). Σειρά 1: μάρτυρας μεγέθους, σειρά 2: ασθενής με αγρίου τύπου (5 επαναλήψεις) ομοζυγωτία 4b/b, σειρά 3: ασθενής με ετεροζυγωτία 4b/a, σειρά 4: ασθενής με ομοζυγωτία 4a/a.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η γονοτυπική κατανομή στα άτομα της ομάδας ελέγχου προσδιορίσθηκε με χρήση της στατιστικής φόρμουλας HWE (συμμόρφωση με την ισοροπία Hardy-Weinberg), ενώ η ύπαρξη ανισσοροπίας σύνδεσης (linkage disequilibrium-LD) μεταξύ των δυο πολυμορφισμών στους ασθενείς και στα άτομα της ομάδας ελέγχου μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας Weir exact test. Η συχνότητα των απλοτύπων εκτιμήθηκε με χρήση χ^2 test. Η γονοτυπική διαστρωμάτωση και στις δύο μελέτες τόσο στα αντίστροφα αλληλία (allele contrast) όσο και σε υπολειπόμενο (recessive model) ή σε κυρίαρχο-επικρατούν μοντέλο (dominant model), έγινε με την χρήση λογιστικών μοντέλων. Η συσχέτιση του γονοτύπου σε ασθενείς και ομάδα ελέγχου έγινε με την χρήση του χ^2 test ενώ η σημαντικότητα των γενετικών αντιθέσεων εκτιμήθηκε επίσης και με Fischer exact test. Όλες οι συγκρίσεις είναι εκφρασμένες σε αναλογία πιθανοτήτων (Odds Ratio- OD), με διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Οι μετρήσεις αυτές του OD για κάθε σύγκριση, έγιναν τόσο χωρίς διόρθωση (unadjusted) όσο και διορθωμένες με βάση τη ηλικία (adjusted for age).

ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ

Παράλληλα με την δικιά μας μελέτη, έγινε αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων (PubMed) μέχρι το τέλος του 2009, για άρθρα που αφορούσαν τους πολυμορφισμούς που μελετήσαμε χρησιμοποιώντας σε συνδυασμό τους ακόλουθους όρους: « γονίδιο ή πολυμορφισμός ή παραλλαγή ή αλληλόμορφο ή μετάλλαξη- gene or polymorphism or variant or allele or

mutation» και «ενδοθηλιακή συνθάση του νιτρικού οξέος- eNOS or OS3» και «καρκίνος του μαστού-breast neoplasm or BC». Μετά από προσεκτική ανάγνωση των δημοσιεύσεων αυτών, μόνο μελέτες που χρησιμοποιούσαν πιστοποιημένες μεθόδους γονοτύπωσης συμπεριλήφθηκαν, ενώ αποκλείστηκαν παρουσιάσεις περιστατικών (case report), editorials και άρθρα ανασκόπησης. Εξαιρέθηκαν επίσης άρθρα που δεν ήταν γραμμένα στην Αγγλική Γλώσσα. Όταν υπήρχαν μελέτες με επικαλυπτόμενους ασθενείς, χρησιμοποιήθηκε μόνο η νεότερη ή αυτή που είχε το μεγαλύτερο μέγεθος-αριθμό ασθενών που μελετήθηκαν. Επιπρόσθετα, λόγω του σχεδιασμού της μετα-ανάλυσης δεν συμπεριλήφθησαν μελέτες που αφορούσαν συσχετίσεις ανάμεσα σε μέλη της οικογένειας (family-based association).

ΕΞΑΓΩΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Από κάθε μελέτη που επιλήχθηκε καταγράφηκαν οι ακόλουθες πληροφορίες: Πρώτος Συγγραφέας, Περιοδικό δημοσίευσης, έτος δημοσίευσης, εθνικότητα του πληθυσμού της μελέτης, δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών, η γονοτυπική μέθοδος και ο αριθμός των ασθενών και των ατόμων ομάδας ελέγχου που μελετήθηκαν για κάθε πολυμορφισμό του eNOS. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων και οι γονοτυπικές κατανομές εξάχθησαν ή υπολογίσθηκαν ενώ ελήφθη υπόψη εάν η γονοτύπωση γινόταν τυφλά ή όχι. Σε μελέτες που προσδιορίστηκαν περισσότεροι του ενός πολυμορφισμοί του eNOS, έγινε εκτίμηση του απλότυπου βάσει του ποσοστού ανισσοροπίας σύνδεσης LD.

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η μετα-ανάλυση που πραγματοποιήθηκε εξέτασε την σχέση μεταξύ κάθε πολυμορφισμού και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού συγκρίνοντας

- Αντίθετα αλληλία (αγρίου τύπου vs μεταλλαγμένου τύπου)
- Υπολειπόμενο μοντέλο και:
- Κυρίαρχο μοντέλο του μεταλλαγμένου αλληλίου

Οι συσχετίσεις εκφράστηκαν ως OR με διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Η ετερογένεια μεταξύ των μελετών ελέγχθηκε με στατιστική τύπου Q, το οποίο στην ουσία είναι ένα σταθμισμένο άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων της OR της κάθε μελέτης από την συνολική προβλεπόμενη OR. (διάβασε βιβλίο 29). Όταν η κατανομή των OR των μελετών είναι ομοιογενής, τότε το Q ακολουθεί μια χ^2 -κατανομή, με συνολικά $r-1$ βαθμούς ελευθερίας (d.f.-degrees of freedom) (όπου r είναι ο αριθμός των μελετών). Εάν το p ήταν $<0,10$ τότε η ετερογένεια εθεωρούνταν στατιστικά σημαντική. Εν συνεχεία η ετερογένεια ποσοτικοποιήθηκε με βάση την φόρμουλα του I^2 , όπου $I^2=(Q-d.f./Q)$, η οποία και θεωρείται η πιο αντιπροσωπευτική διότι είναι ανεξάρτητη από τον αριθμό των μελετών που συμπεριλήφθηκαν στην μετα-ανάλυση. Η παράμετρος I^2 παίρνει τιμές από 0 έως 100% και όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή τόσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός ετερογένειας της μελέτης. Σε γενικές γραμμές αυτό μπορεί να ημιποσοτικοποιηθεί ως εξής, I^2 : 0-25%: όχι ετερογένεια, 25-50%: ενδιάμεση ετερογένεια, 50-75%: σημαντική ετερογένεια και 75-100% έντονα υψηλή ετερογένεια. Η συνολική-συγκεντρωτική OR των μελετών προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας μαθηματικά μοντέλα τυχαίων επιδράσεων (DerSimonian και Laird)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η συχνότητα των πολυμορφισμών G894T και των γονοτύπων 4a/b που μελετήθηκαν τόσο στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού όσο και στα άτομα της ομάδας ελέγχου φαίνονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 2.

| SNP | γονότυπος | Ασθενείς N=301 | Ομάδα ελέγχου N=131 | p |
|-------|-----------|-------------------|---------------------------|------|
| G894T | TT | 39 | 38 | 0,79 |
| | GT | 46 | 50 | |
| | GG | 15 | 12 | |
| 4a/b | aa | 3 | 4 | 0,26 |
| | ab | 27 | 37 | |
| | bb | 70 | 59 | |

Πίνακας 2. Κατανομή (%) των G894T και 4a/b γονοτύπων του γονιδίου του eNOS στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού και στα άτομα από την ομάδα ελέγχου.

Στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού δεν υπήρχε καμιά στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας των πολυμορφισμών και των δημογραφικών και άλλων χαρακτηριστικών του πίνακα 1. Επιπρόσθετα η γονοτυπική κατανομή HWE έδειξε έλλειψη διαστρωμάτωσης ή γονοτυπικού λάθους και στους δύο μελετώμενους πολυμορφισμούς ($p=0,56$ για τον G894T και $p=0,62$ για τον 4a/b).

Οι αναλογίες πιθανοτήτων (OD) για κάθε πολυμορφισμό που μελετήθηκε τόσο ως προς τα αντίστροφα αλληλία (allele contrast) όσο και ως προς το υπολειπόμενο (recessive model) ή σε κυρίαρχο-επικρατούν μοντέλο (dominant model), φαίνονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 3. Στον πίνακα αυτό επίσης φαίνονται και οι αντίστοιχες αναλογίες πιθανοτήτων προσαρμοσμένες με βάση την ηλικία. Όπως φαίνεται και στον πίνακα, σε ότι αφορά τον πολυμορφισμό G894T δεν διαπιστώθηκε καμιά στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε κανένα μοντέλο μελέτης. Αντίθετα η μελέτη του πολυμορφισμού 4b/a έδειξε ότι το υπολειπόμενο μοντέλο παρουσιάζει μια

οριακή συσχέτιση με την εμφάνιση καρκίνου του μαστού (OR 1,56 με CI: 1,02-2,38) αλλά στο προσαρμοσμένο μοντέλο με βάση την ηλικία η συσχέτιση αυτή δεν επιβεβαιώθηκε καθώς βρέθηκε μη στατιστικώς σημαντική (OR 0,98 με CI: 0,34-2,81) (πίνακας 3).

| Πολυμορφισμός | Γενετική αντίθεση | OR (95%CI) | P | Προσαρμοσμένο OR (95%CI) |
|---------------|----------------------|------------------|------|--------------------------|
| G894T | Αλληλία αντίθεσης | 0,94 (0,69-1,26) | 0,66 | |
| | Υπολειπόμενο μοντέλο | 1,03 (0,68-1,57) | 0,89 | 1,00 (0,36-2,77) |
| | Κυρίαρχο μοντέλο | 0,72 (0,39-1,34) | 0,30 | 0,73 (0,18-2,91) |
| 4a/b | Αλληλία αντίθεσης | 1,39 (0,97-1,99) | 0,07 | |
| | Υπολειπόμενο μοντέλο | 1,56 (1,02-2,38) | 0,04 | 0,98 (0,34-2,81) |
| | Κυρίαρχο μοντέλο | 1,06 (0,36-3,13) | 0,91 | 0,57 (0,03-11,62) |

Πίνακας 3. Αναλογία πιθανοτήτων (OR) συσχετισμού μεταξύ των πολυμορφισμών του γονιδίου του eNOS. CI: διάστημα εμπιστοσύνης, προσαρμοσμένο OR: προσαρμογή με βάση την ηλικία.

Διαιρώντας τον πληθυσμό της μελέτης μας σε δυο επιμέρους κατηγορίες με βάση το status της ωοθυλακιορρηξίας, δηλαδή σε προεμμηνοπαυσιακές και σε μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες, οι αντίστοιχες αναλογίες πιθανοτήτων των πολυμορφισμών (και οι αντίστοιχες προσαρμοσμένες με βάση την ηλικία) που μελετήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 4. Και στις δύο επιμέρους κατηγορίες, δεν παρατηρήθηκε καμιά στατιστικά σημαντική συσχέτιση, σε κανένα μοντέλο μελέτης και σε κανέναν από τους δύο πολυμορφισμούς. Έλλειψη στατιστικής σημαντικότητας διαπιστώθηκε επίσης ακόμα και εάν γινόταν προσαρμογή της κάθε OR με βάση την ηλικία (πίνακας 4).

Ο προσδιορισμός της LD (linkage disequilibrium) έδειξε ότι υπάρχει ανισοροπία σύνδεσης των δύο πολυμορφισμών στους ασθενείς με καρκίνο

του μαστού ($p=0,02$), ενώ τέτοια ανισοροπία δεν διαπιστώθηκε στα άτομα της ομάδας ελέγχου ($p=0,22$). Η συχνότητα της εκτιμώμενης κατανομής απλοτύπων των δυο πολυμορφισμών του γονιδίου eNOS σε άτομα με καρκίνο του μαστού και στην ομάδα ελέγχου φαίνεται στον πίνακα 5. Η συνολική συσχέτιση των κατανομών δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p=0,26$).

| Πολυμορφισμός | Γενετική αντίθεση | OR (95%CI) | P | Προσαρμοσμένο OR (95%CI) |
|---|----------------------|------------------|------|--------------------------|
| α. Προεμμηνόπαυσιαικές γυναίκες. | | | | |
| G894T | Αλληλία αντίθεσης | 0,88 (0,63-1,24) | 0,48 | |
| | Υπολειπόμενο μοντέλο | 0,98 (0,61-1,58) | 0,98 | 0,64 (0,09-4,47) |
| | Κυρίαρχο μοντέλο | 0,64 (0,39-1,28) | 0,23 | 0,63 (0,07-5,97) |
| 4a/b | Αλληλία αντίθεσης | 1,24 (0,82-1,86) | 0,31 | |
| | Υπολειπόμενο μοντέλο | 1,37 (0,85-2,23) | 0,22 | 1,54 (0,21-11,41) |
| | Κυρίαρχο μοντέλο | 0,90 (0,28-2,92) | 0,98 | 0,26 (0,01-1,02) |
| β. Μετα-εμμηνόπαυσιαικές γυναίκες. | | | | |
| G894T | Αλληλία αντίθεσης | 0,91 (0,57-1,47) | 0,71 | |
| | Υπολειπόμενο μοντέλο | 0,93 (0,48-1,83) | 0,87 | 1,02 (0,37-2,78) |
| | Κυρίαρχο μοντέλο | 0,79 (0,30-2,08) | 0,62 | 0,73 (0,18-2,92) |
| 4a/b | Αλληλία αντίθεσης | 1,16 (0,66-2,03) | 0,61 | |
| | Υπολειπόμενο μοντέλο | 1,22 (0,63-2,37) | 0,62 | 0,98 (0,35-2,79) |
| | Κυρίαρχο μοντέλο | 1,05 (0,20-5,61) | 0,93 | 0,59 (0,03-10,83) |

Πίνακας 4. Αναλογία πιθανοτήτων (OR) συσχέτισμού μεταξύ των πολυμορφισμών του γονιδίου του eNOS ανάλογα με το status της εμμηνόπαυσης. CI: διάστημα εμπιστοσύνης, προσαρμοσμένο OR: προσαρμογή με βάση την ηλικία.

Αντίθετα, στην επιμέρους ανάλυση, οι εκτιμώμενες συχνότητες των απλοτύπων bT και aT ήταν στατιστικώς διαφορετικές ($p=0,04$ και $p<0,01$) αντίστοιχα (πίνακας 5). Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται είτε στην μεγάλη ανισοροπία σύνδεσης (LD-linkage disequilibrium με στατιστικώς

σημαντική τιμή p), είτε σε μια αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πολυμορφισμών, δεδομένου ότι η μελέτη των επιμέρους πολυμορφισμών ξεχωριστά (και το απόλυτο αθροισμά τους) δεν έδινε στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.

| 4b/a-G894T απλότυποι | Συχνότητα απλοτύπων | | | Συνολική p |
|-------------------------|---------------------|------------------|-------|--------------|
| | Ασθενείς | Ομάδα ελέγχου | p | |
| bT | 0,476 | 0,448 | 0,04 | 0,26 |
| bG | 0,352 | 0,330 | 0,10 | |
| aT | 0,140 | 0,185 | <0,01 | |
| aG | 0,033 | 0,036 | 0,80 | |

Πίνακας 5. Εκτιμώμενη συχνότητα απλοτύπων για τους δύο πολυμορφισμούς του γονιδίου του eNOS.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας στο PubMed συγκεντρώθηκαν συνολικά 49 δημοσιεύσεις που πληρούσαν τα κριτήρια που είχαν τεθεί. Τα άρθρα αυτά διαβάστηκαν προκειμένου να αξιολογηθεί η καταλληλότητα τους για ένταξη στην μετα-ανάλυση. Έτσι συνολικά 9 μόνο άρθρα πληρούσαν τα κριτήρια για να χρησιμοποιηθούν για στατιστική επεξεργασία [310, 312, 314-320]. Σε μια από τις μελέτες αυτές [310] υπήρχαν δεδομένα, τα οποία επικαλύπτονταν από τα δεδομένα μιας πιο πρόσφατης και μεγαλύτερης μελέτης [314] και έτσι η πρώτη αποκλείστηκε. Επίσης, μια άλλη δεύτερη μελέτη αποκλείστηκε διότι τα δεδομένα δεν μπορούσαν να εξαχθούν [320]. Έτσι συνολικά η μετα-ανάλυση έγινε σε συνολικά 8 άρθρα (τα 7 άρθρα που απέμειναν από την βιβλιογραφία, ενώ όγδοη μελέτη αποτελούσαν τα στατιστικά συμπεράσματα της δικής μας μελέτης).

Από τις μελέτες αυτές, στις 8 έγινε προσδιορισμός των πολυμορφισμών G894T [312, 314-319], σε δυο έγινε μελέτη του πολυμορφισμού 4a/b [315-

316] ενώ σε άλλες τρεις έγινε προσδιορισμός του πολυμορφισμού T786C [312, 315, 317]. Οι μελέτες που προσδιόριζαν τους πολυμορφισμούς T786C ή 4b/a μελετούσαν επίσης και τους πολυμορφισμούς G894T. Μόνο σε δυο μελέτες έγινε μελέτη και των τριών πολυμορφισμών (G894T, 4b/a και T786C) [312, 315]. Όλες οι μελέτες χρησιμοποιούσαν αναγνωρισμένες μεθόδους γονοτύπωσης. Σε τρεις από αυτές τις μελέτες, τα άτομα της ομάδας ελέγχου ήταν ταυτισμένα (matched) με βάση την ηλικία [315, 317-318]. Με βάση την φυλετική διαφοροποίηση υπήρχαν συνολικά 5 μελέτες (4 στο PubMed και μια η δικιά μας) που αναφέρονταν σε Λευκούς-Καυκάσιους [315-317, 319], μια αναφέρονταν σε Ασιάτες [312], ενώ δύο εμπεριείχαν μεικτό πληθυσμό [314, 318].

Έτσι συνολικά για την μετα-ανάλυση ο συνολικός αριθμός ασθενών με καρκίνο του μαστού (KM) και των ατόμων της ομάδας ελέγχου που μελετήθηκαν ήταν:

- 3828 άτομα με KM και 3124 άτομα ομάδας ελέγχου για τον πολυμορφισμό G894T.
- 996 άτομα με KM και 824 άτομα ομάδας ελέγχου για τον πολυμορφισμό 4b/a.
- 1856 άτομα με KM και 1470 άτομα ομάδας ελέγχου για τον πολυμορφισμό T786C.

Η κατανομή των γονοτύπων από την ομάδα ελέγχου παρέκκλιε από την HWE μόνο σε μια μελέτη, για τον πολυμορφισμό G894T [312]. Η έλλειψη της HWE δείχνει πιθανό γονοτυπικό σφάλμα και/ή πληθυσμιακή διαστρωμάτωση και για το λόγο αυτό έγινε και νέα στατιστική επεξεργασία και χωρίς να συμπεριληφθεί η μελέτη αυτή (συνολικά δηλαδή όχι σε 8 αλλά

σε 7 μελέτες), προκειμένου να παρατηρηθούν τυχόν διαφοροποιήσεις από την αρχική επεξεργασία. Τέλος έγινε και μια τρίτη στατιστική επεξεργασία στις πέντε μελέτες που αφορούσαν τους Καυκάσιους μόνο πληθυσμούς.

Σε 3 μόνο από τις μελέτες (2 στην βιβλιογραφία και μια η δικιά μας), αχολήθηκε με τον προσδιορισμό απλοτύπων [312, 315]. Στην μια από αυτές διαπιστώθηκε σημαντική ανισορροπία σύνδεσης (LD-linkage disequilibrium) μεταξύ G894T, 4b/a και T786C πολυμορφισμού [312], ενώ αντίθετα η δεύτερη μελέτη δεν διαπίστωσε ύπαρξη σημαντικής LD μεταξύ των τριών πολυμορφισμών [315]. Η δική μας εργασία (ως τρίτη), παρουσιάζει ενδιάμεσα αποτελέσματα καθώς: δεν ανέδειξε ύπαρξη LD μεταξύ G894T και 4b/a στα άτομα της ομάδας ελέγχου, αλλά ανέδειξε ύπαρξη LD στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον πίνακα 6 φαίνονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των συσχετισμών μεταξύ των διαφόρων πολυμορφισμών και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού.

Για τον πολυμορφισμό **G894T**, στη σύγκριση των αντίθετων αλληλίων, T vs G δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική ετερογένεια μεταξύ των μελετών ($p=0,76$ με $I^2=0\%$) ενώ και η συνολική OR, επίσης δεν ήταν στατιστικά σημαντική (OR=1,06 με όρια 0,98-1,15) (εικόνα. 4). Στην μελέτη με βάση το υπολειπόμενο μοντέλο, η ύπαρξη του αλληλίου T, προσδίδει μια οριακή συσχέτιση με την εμφάνιση καρκίνου του μαστού (OR=1,22 με όρια 1,00-1,49), ενώ εάν η μελέτη γίνει ως προς το κυρίαρχο μοντέλο δεν υπήρχαν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.

Στην επεξεργασία των 7 μελετών (χωρίς έλλειψη ετερογένειας HWE) δεν διαπιστώθηκε διαφοροποίηση ως προς την στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων.

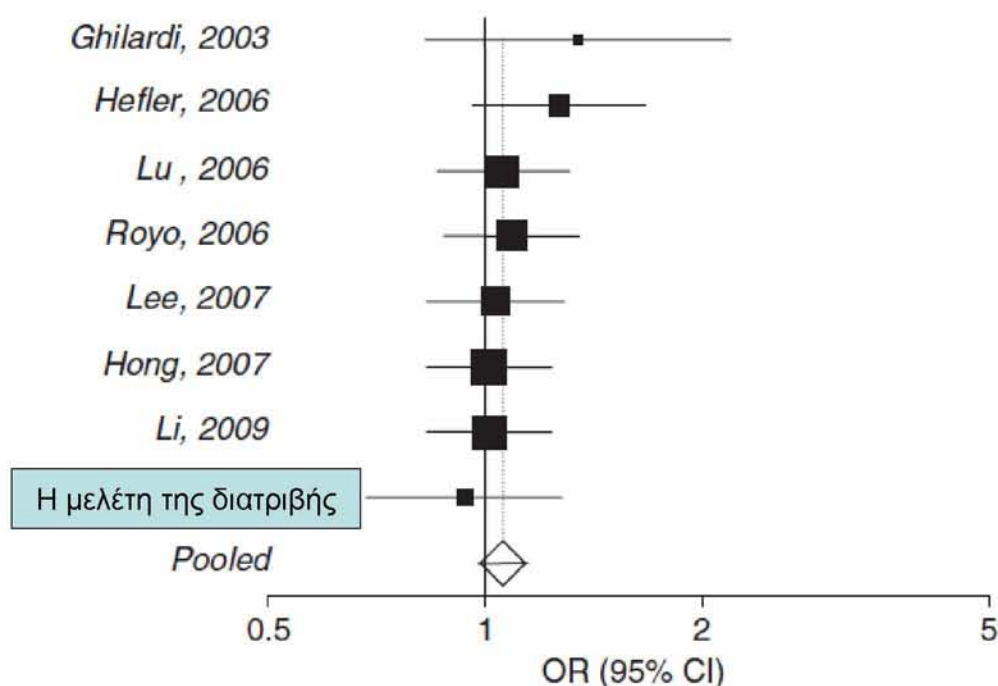
Αντίθετα στην επιμέρους ανάλυση των 5 μελετών που αφορούσαν μόνο Καυκάσιους, δεν διαπιστώθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών με KM και ατόμων της ομάδας ελέγχου.

| Πολυμορφισμός | Γενετική μελέτη | Πληθυσμός μελετών | Αριθμός μελετών | OR (95% CI) | I ² p τιμή |
|---------------|----------------------|----------------------|-----------------|------------------|-----------------------|
| G894T | T vs G | Όλες | 8 | 1,06 (0,98-1,15) | 0 (0,79) |
| | | Όλες με HWE | 7 | 1,06 (0,97-1,16) | 0 (0,69) |
| | | Καυκάσιος | 5 | 1,10 (0,98-1,23) | 0 (0,55) |
| | Υπολειπόμενο μοντέλο | Όλες | 8 | 1,22 (1,00-1,49) | 14 (0,32) |
| | | Όλες με HWE | 7 | 1,19 (0,99-1,43) | 0 (0,55) |
| | | Καυκάσιος | 5 | 1,21 (0,94-1,57) | 19 (0,30) |
| | Κυρίαρχο μοντέλο | Όλες | 8 | 1,03 (0,92-1,14) | 0 (0,82) |
| | | Όλες με HWE | 7 | 1,04 (0,92-1,17) | 0 (0,75) |
| | | Καυκάσιος | 5 | 1,10 (0,94-1,29) | 0 (0,68) |
| 4b/a | b vs a | Καυκάσιος | 3 | 1,07 (0,85-1,34) | 36 (0,21) |
| | Υπολειπόμενο μοντέλο | Καυκάσιος | 3 | 1,13 (0,85-1,49) | 46 (0,16) |
| | Κυρίαρχο μοντέλο | Καυκάσιος | 3 | 0,83 (0,47-1,48) | 0 (0,61) |
| T786C | C vs T | Όλες | 3 | 1,20 (0,97-1,49) | 54 (0,11) |
| | | Υπολειπόμενο μοντέλο | 3 | 1,51 (1,07-2,12) | 0 (0,74) |
| | | Κυρίαρχο μοντέλο | 3 | 1,21 (0,92-1,60) | 55 (0,11) |

Πίνακας 6. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης των τριών πολυμορφισμών σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού έναντι ατόμων ομάδας ελέγχου. Στον πίνακα παρουσιάζεται σχετικός παράγοντας κινδύνου (OR), το διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI) και ο βαθμός ετερογένειας I². Ειδικά για τον πολυμορφισμό G894T, η μετα-ανάλυση έγινε σε τρεις μορφές: στον συνολικό αριθμό των μελετών (n=8), σε αυτές που δεν είχαν έλλειψη HWE (n=7) και σε αυτές που αφορούσαν Καυκάσιο πληθυσμό (n=5).

Για το πολυμορφισμό 4b/a, συνολικά δεν διαπιστώθηκε σημαντική ετερογένεια μεταξύ των μελετών (στατιστικά μη σημαντική) (p=0,21 με I²=36%) (πίνακας 6), ενώ το αλληλίο b δεν σχετίζονταν με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου μαστού (OR=1,07 με όρια 0,85-1,34) (εικόνα 4). Η

μελέτη με το υπολειπόμενο και με το κυριαρχικό μοντέλο επίσης δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.



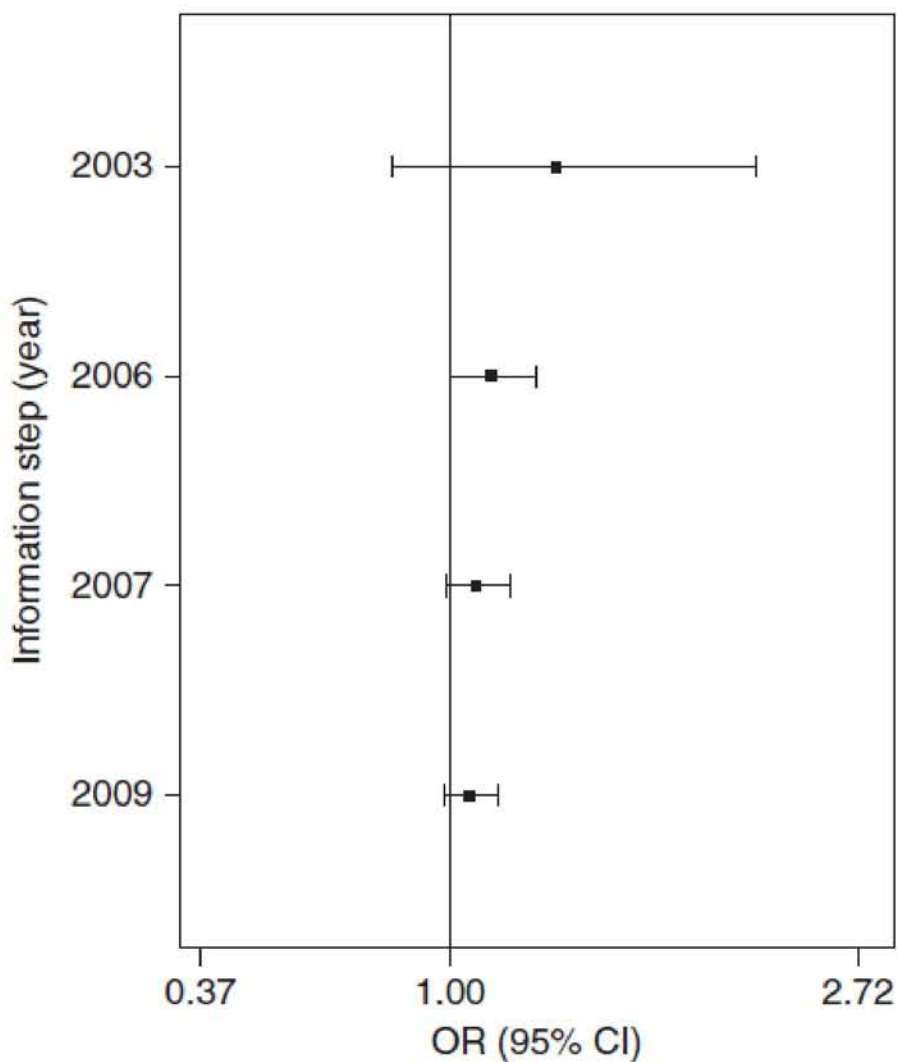
Εικόνα 4. Συγκριτική μελέτη των σχετικών κινδύνων OR (μαυρισμένο τετράγωνο) και των διαστημάτων εμπιστοσύνης (95% CI) (οριζόντιες γραμμές που επεκτείνονται εκατέρωθεν από το μαύρο τετράγωνο) των αντίθετων αλληλίων του πολυμορφισμού G894T στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Το μέγεθος του μαύρου τετραγώνου αντικατοπτρίζει και την βαρύτητα με την οποία συμμετέχει η κάθε εργασία στην μετα-ανάλυση. Το διαμάντι αντιπροσωπεύει τα συνολικά αποτελέσματα των μελετών. Ο οριζόντιος άξονας (OR) εκφράζεται σε λογαριθμική κλίμακα.

Για τον πολυμορφισμό T786C, βρέθηκε μια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του υπολειπόμενου μοντέλου και του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού (OR=1,51 με όρια 1,07-2,12) (πίνακας 6). Να σημειωθεί όμως ότι η μετα-ανάλυση αυτή βασίστηκε μόνο σε τρεις μελέτες με μικρό αριθμό ατόμων που μελετήθηκαν και επομένως τα αποτελέσματα πρέπει να ερμηνευθούν πολύ προσεχτικά.

Πιθανά bias. Μερικές από τις μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν στην μετα-ανάλυση δεν διενεργήθηκαν τυφλά ως προς την κλινική κατάσταση (δηλαδή γνώριζαν εκ των προτέρων για το κάθε δείγμα που ανέλυαν αν πρόκειται για

ασθενή με καρκίνο ή για άτομο ομάδας ελέγχου). Επιπρόσθετα, η ήδη υπάρχουσα γνώση της βιβλιογραφίας είναι σημαντικός παράγοντας που πάντα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη. Αν επιχειρήσουμε να κάνουμε μια αθροιστική μετα-ανάλυση με βάση τις μελέτες που είναι διαθέσιμες αθροιστικά ανά έτος, διαπιστώνουμε ότι πχ για τον αλληλίο T του πολυμορφισμού G894T υπάρχει μια πτωτική τάση στην σημαντικότητα του αποτελέσματος (δηλαδή την τιμή του OR), παρόλο που παραμένει συνεχώς στατιστικά μη σημαντική (εικόνα.5). Ένα τρίτο και σημαντικό bias (που ισχύει γενικά σε όλες τις μετα-αναλύσεις) είναι ότι πιθανώς να υπάρχουν μελέτες άλλων ερευνητών που δεν έχουν σταλεί για δημοσίευση, ακριβώς επειδή το στατιστικό αποτέλεσμα τους να μην είναι σημαντικό (δηλαδή να μην αναδεικνύει κανένα σημαντικό συμπέρασμα).

Επίσης δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι είναι σχετικά στατιστικά δύσκολο να αποδείξει κανείς συσχέτιση με κάποια νόσο όταν μελετάει πολυμορφισμούς που είναι γενικά όχι σπάνιοι στο γενικό πληθυσμό (5-10% συχνότητα). Έτσι, δουλεύονταν με ανάλυση ισχύος 80% ($power > 80\%$), προκειμένου να αποδείξει κανείς την ύπαρξη ενός σχετικά μέτριου ρίσκου ανάπτυξης μιας νόσου (δηλαδή $OR = 1,2$), για ένα πολυμορφισμό που υπάρχει στο 10% του γενικού πληθυσμού, τότε με βάση μαθηματικά μοντέλα μπορεί να υπολογισθεί ότι χρειάζεται ένα δείγμα περίπου 10.000 ατόμων.



Εικόνα . Αθροιστική μετα-ανάλυση για το αλληλίο T του πολυμορφισμού G894T και του ρίσκου εμφάνισης καρκίνου του μαστού, ανάλογα με το έτος.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην διατριβή αυτή μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των πιο κοινών γενετικών παραλλαγών (και των απλοτύπων) των δυο συχνότερων σημείων πολυμορφισμού του γονιδίου του eNOS (της θέσης G894T και της θέσης 4a/b VNTR). Δεν έγινε μελέτη του πολυμορφισμού T786C καθώς η πλειονότητα των βιβλιογραφικών αναφορών πάνω στον πολυμορφισμό

αυτό συμφωνούν μεταξύ τους ότι η ύπαρξη του αλληλίου T σχετίζεται περίπου με διπλάσιο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Αντίθετα για τους δυο άλλους πολυμορφισμούς, οι λίγες μελέτες που υπάρχουν δίνουν αντικρουόμενα μεταξύ τους αποτελέσματα.

Τα βασικά συμπεράσματα της μελέτης μας είναι ότι υπήρχε σημαντική συσχέτιση με τον καρκίνο του μαστού μόνο για τον πολυμορφισμό 4b/a και όχι για τον πολυμορφισμό G894T. Η συσχέτιση όμως αυτή εξασθένησε σημαντικά όταν γινόταν προσαρμογή των ασθενών με βάση την ηλικία. Αντίθετη η ανάλυση των απλοτύπων αναδुकνύει την ύπαρξη στατιστικής σημαντικότητας σε απλότυπους που αφορούν το αλληλίο 894T.

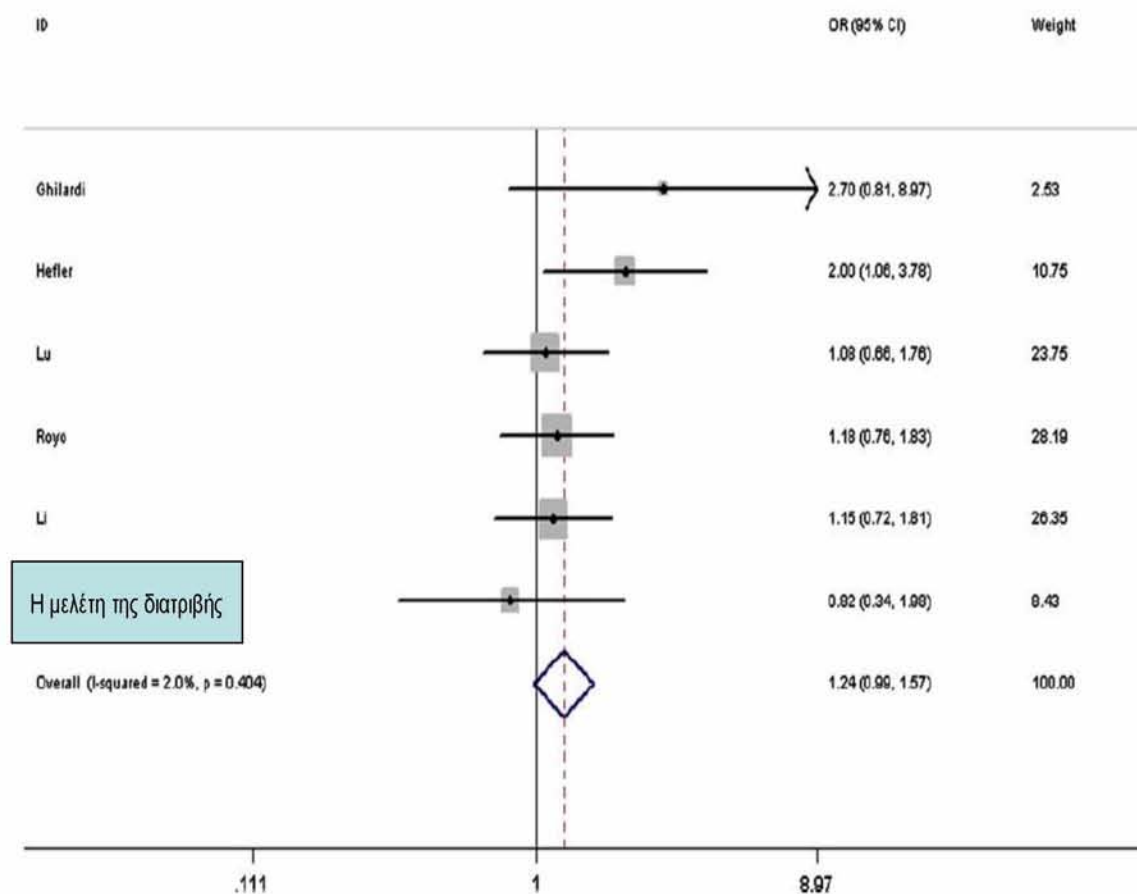
ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ

Εκτός από την δική μας μελέτη και σε ότι αφορά μόνο τον πολυμορφισμό G894T υπάρχουν άλλες 5 μελέτες οι οποίες αναφέρονται σε ένα σημαντικό αριθμό ασθενών και ατόμων της ομάδας ελέγχου [314-317, 319]. Σε γενικές γραμμές φαίνεται ότι σχεδόν όλες οι μελέτες συμφωνούν με τα δικά μας αποτελέσματα, δηλαδή ότι ο πολυμορφισμός G894T δεν σχετίζεται με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Μόνο μια μελέτη υπάρχει, που υποστηρίζει τον συσχετισμό με την εμφάνιση καρκίνου του μαστού, αλλά ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης (OR) φαίνεται να είναι σχετικά μικρός (1,9 με διάστημα εμπιστοσύνης 1,1-3,6) ενώ το συμπέρασμα ανακύπτει και από μικρότερο αριθμό ασθενών σε σχέση με την δικιά μας μελέτη [316].

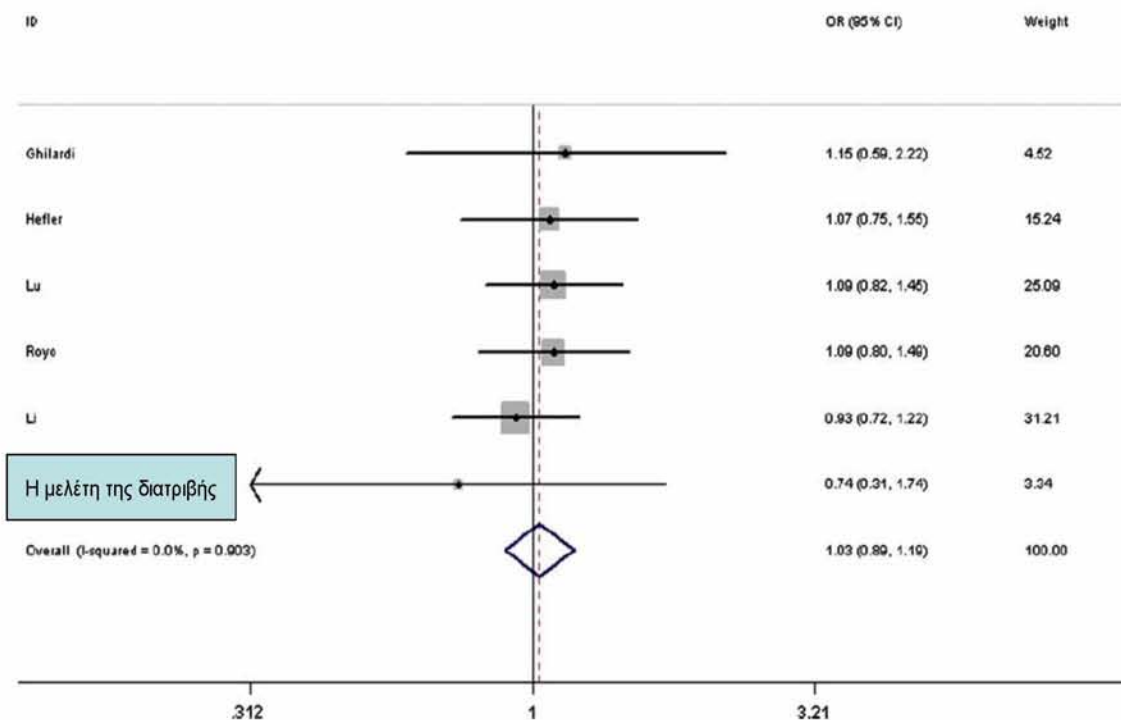
Προηγουμένως αναφέραμε ότι κάνοντας σύγκριση αντίθετων αλληλίων (δηλαδή T vs G) δεν υπήρχε καμιά σημαντική συσχέτιση. Φαίνεται όμως ότι με οποιοδήποτε μοντέλο και αν γίνει η στατιστική μελέτη (υπολειπόμενο μοντέλο, κυριαρχικό μοντέλο, ομόζυγο ή ετερόζυγο), το αποτέλεσμα είναι

πάντα το ίδιο, δηλαδή ο πολυμορφισμός G894T δεν φαίνεται να σχετίζεται με κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Δηλαδή και στις τέσσερεις παρακάτω συσχετίσεις το αποτέλεσμα είναι μη στατιστικά σημαντικό:

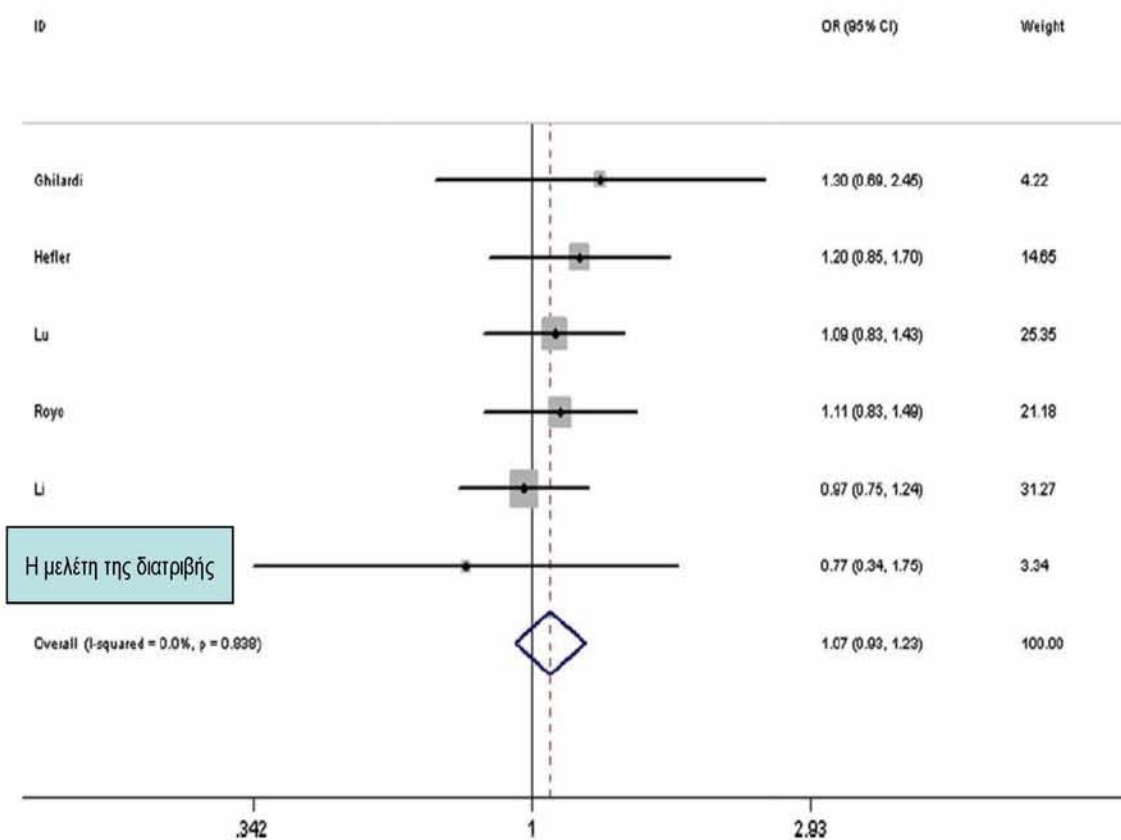
- Ομόζυγο επικρατικό μοντέλο (TT vs GG) (εικόνα 6)
- Ετερόζυγο επικρατικό μοντέλο (TG vs GG) (εικόνα 7)
- Αθροιστικό επικρατικό μοντέλο (TT + TG vs GG) (εικόνα 8)
- Αθροιστικό υπολειπόμενο μοντέλο (TT vs TG + GG) (εικόνα 9)



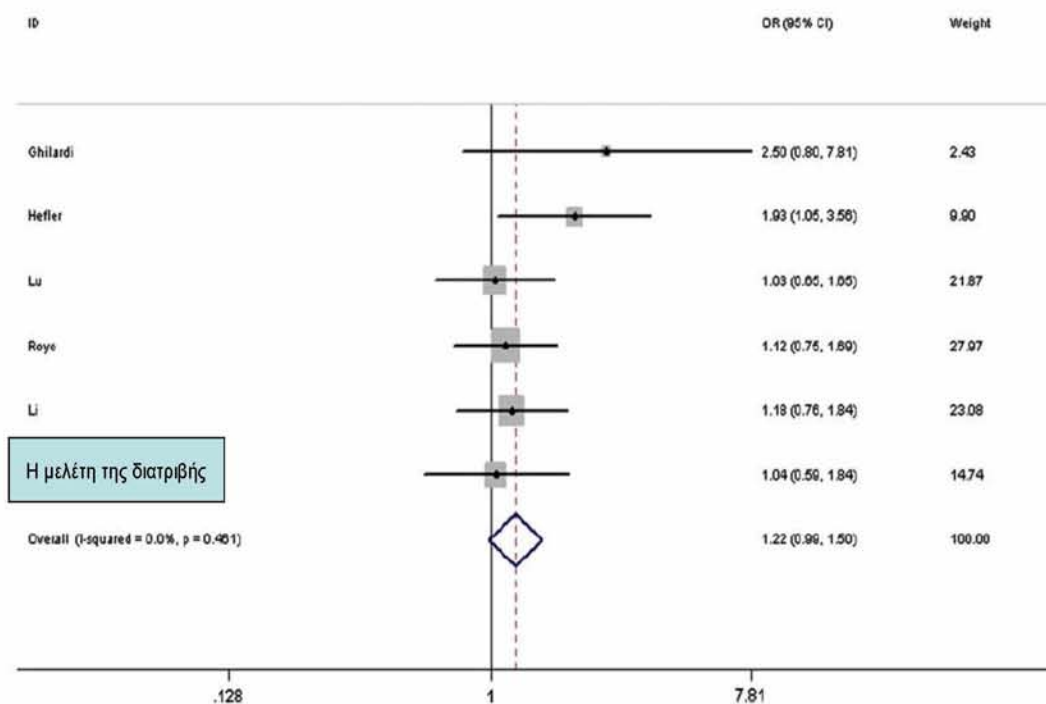
Εικόνα 6. Μετα-ανάλυση και σύγκριση της δικής μας μελέτης με τις άλλες σε ότι αφορά τον πολυμορφισμό G894T του γονιδίου του eNOS σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού ως προς το ομόζυγο μοντέλο (TT vs GG).



Εικόνα 7. Μετα-ανάλυση και σύγκριση της δικής μας μελέτης με τις άλλες σε ότι αφορά τον πολυμορφισμό G894T του γονιδίου του eNOS σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού ως προς το ετερόζυγο επικρατικό μοντέλο (TG vs GG).



Εικόνα 8. Μετα-ανάλυση και σύγκριση της δικής μας μελέτης με τις άλλες σε ότι αφορά τον πολυμορφισμό G894T του γονιδίου του eNOS σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού ως προς το αθροιστικό επικρατικό μοντέλο (TT vs TG + GG).



Εικόνα 9. Μετα-ανάλυση και σύγκριση της δικής μας μελέτης με τις άλλες σε ότι αφορά τον πολυμορφισμό G894T του γονιδίου του eNOS σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού ως προς το αθροιστικό υπολειπόμενο μοντέλο (TT + TG vs GG).

Την ίδια χρονική περίοδο με την δικιά μας μελέτη, μια άλλη μετα-ανάλυση ανέδειξε την ύπαρξη στατιστικής συσχέτισης μεταξύ G894T πολυμορφισμού και του καρκίνου του μαστού [321]. Κατά την αποψη μας, πιστεύουμε ότι υπάρχουν μερικά κρίσιμα μεθοδολογικά σημεία που διαφοροποιούν τα αποτελέσματά τους από την δικιά μας μετα-ανάλυση. (άλλωστε και ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης στην δικιά τους μετα-ανάλυση είναι εντελώς οριακά θετικός OR: 1,22, CI 95% : 1,02-1,44 για τα αντίθετα αλληλία-TT vs GG, και OR: 1,21, CI 95% : 1,02-1,44 για το υπολειπόμενο μοντέλο).

Πρώτα από όλα, συμπεριέλαβαν στην ανάλυση τρεις εργασίες, οι οποίες και έπρεπε να εξαιρεθούν καθώς στην πραγματικότητα δεν μελετούν τον συσχετισμό μεταξύ G894T πολυμορφισμού και καρκίνου του μαστού [305-306, 309]. Πιο συγκεκριμένα, οι δυο μελέτες αναφέρονται στην μελέτη

πολυμορφισμών του eNOS σε σχέση με το outcome των ατόμων με καρκίνο του μαστού (υποτροπή ή θάνατος) [305-306], ενώ η τρίτη μελέτη συσχέτισε τη ύπαρξη των πολυμορφισμών με το κίνδυνο εμφάνισης τοξικότητας από την ακτινοθεραπεία [309].

Δεύτερον, συμπεριέλαβαν δυο μελέτες οι οποίες εμπειρεύσαν αλληλοεπικαλυπτόμενα δεδομένα [310, 314]. Μία από αυτές τις μελέτες έπρεπε να αποκλεισθεί [310] και να διατηρηθεί μόνο η δεύτερη (πιο πρόσφατη και με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών) [314].

Παρόμοια με τα δικά μας ευρήματα, μια πιο πρόσφατη τρίτη μελέτη-μετα-ανάλυση, επίσης δεν παρατήρησε την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής συσχέτισης μεταξύ G894T πολυμορφισμού του eNOS και κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού [322].

Σε ότι αφορά τον δεύτερο πολυμορφισμό που μελετήθηκε, τον 4a/b VNTR υπάρχουν στην βιβλιογραφία τρεις μόνο αναφορές. Στις δυο αυτές εργασίες, δεν φάνηκε ο πολυμορφισμός αυτός να σχετίζεται με κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, αλλά γενικά ο αριθμός είναι πολύ μικρός προκειμένου να γίνει αξιόπιστη συγκριτική μετα-ανάλυση. Αντίθετα στην τρίτη και πιο πρόσφατη, που αφορά μόνο την περιοχή του Μεξικού, η παρουσία του γονότυπου a/a και a/b σχετίζονταν με μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού [323]

Συμπερασματικά επομένως μπορούμε να πούμε ότι οι διάφορες θέσεις πολυμορφισμού του γονιδίου eNOS μπορούν να συσχετιστούν με σχετικά αυξημένο ρίσκο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα αυτά είναι γενικά διφορούμενα και συγκρουόμενα μεταξύ τους στις διάφορες μελέτες, με εξαίρεση ίσως την

θεση 786 όπου οι περισσότεροι συμφωνούν ότι έχει κάποια προγνωστική αξία. Επίσης έχουμε αναφέρει ότι οι διάφορες αυτές θέσεις, σε διάφορες άλλες μελέτες φαίνεται ότι μπορούν να επηρεάζουν την συνολική επιβίωση, την επιβίωση ελεύθερη νόσου, την μεταστατικότητα του καρκίνου, την ανταπόκριση στην θεραπεία και τον βαθμό τοξικότητας της ακτινοθεραπείας. Τέλος σημαντική είναι και η συμβολή των συνηθειών (παχισσαρκία, διατροφή, κάπνισμα) στις παραπάνω παραμέτρους. Όλα αυτά πιθανότερα να γίνονται μέσω της επίδρασης που έχει ο κάθε πολυμορφισμός του γονιδίου του eNOS στο οξειδωτικό status που δημιουργείται στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου. Φαίνεται λοιπόν ότι χρειάζονται να σχεδιαστούν μελέτες πάνω σε συσχετισμούς και αλληλεπιδράσεις μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων προκειμένου να κατανοηθεί καλύτερα ο μηχανισμός με τον οποίο η ύπαρξη ενός πολυμορφισμού του γονιδίου eNOS μπορεί να επηρεάσει την πορεία εμφάνισης ή/και εξέλιξης του καρκίνου του μαστού.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Schmidt, H.H. and U. Walter, *NO at work*. Cell, 1994. 78(6): p. 919-25.
2. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. 288(5789): p. 373-6.
3. Feng, C., *Mechanism of Nitric Oxide Synthase Regulation: Electron Transfer and Interdomain Interactions*. Coord Chem Rev, 2012. 256(3-4): p. 393-411.
4. Stuehr, D.J., et al., *Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide*. J Exp Med, 1989. 169(3): p. 1011-20.
5. Drapier, J.C., C. Pellat, and Y. Henry, *Generation of EPR-detectable nitrosyl-iron complexes in tumor target cells cocultured with activated macrophages*. J Biol Chem, 1991. 266(16): p. 10162-7.
6. Lundberg, J.O., et al., *Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease*. Cardiovasc Res, 2011. 89(3): p. 525-32.
7. Zuckerbraun, B.S., P. George, and M.T. Gladwin, *Nitrite in pulmonary arterial hypertension: therapeutic avenues in the setting of dysregulated arginine/nitric oxide synthase signalling*. Cardiovasc Res, 2011. 89(3): p. 542-52.
8. Lancaster, J.R., Jr. and K. Xie, *Tumors face NO problems?* Cancer Res, 2006. 66(13): p. 6459-62.
9. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. 357(Pt 3): p. 593-615.
10. Zhu, Y. and R.B. Silverman, *Revisiting heme mechanisms. A perspective on the mechanisms of nitric oxide synthase (NOS), Heme oxygenase (HO), and cytochrome P450s (CYP450s)*. Biochemistry, 2008. 47(8): p. 2231-43.
11. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. 33(7): p. 829-37, 837a-837d.
12. Warner, E.E. and J.L. Mulshine, *Surgical considerations with lung cancer screening*. J Surg Oncol, 2003. 84(1): p. 1-6.
13. Klatt, P., et al., *Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin*. J Biol Chem, 1996. 271(13): p. 7336-42.
14. Kotsonis, P., et al., *Allosteric regulation of neuronal nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin and suppression of auto-damaging superoxide*. Biochem J, 2000. 346 Pt 3: p. 767-76.
15. Abu-Soud, H.M. and D.J. Stuehr, *Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(22): p. 10769-72.
16. List, B.M., et al., *Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization*. Biochem J, 1997. 323 (Pt 1): p. 159-65.
17. Brunner, K., et al., *Sensitivity of flavin fluorescence dynamics in neuronal nitric oxide synthase to cofactor-induced conformational changes and dimerization*. Biochemistry, 1998. 37(50): p. 17545-53.

18. Bredt, D.S., et al., *Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase*. *Nature*, 1991. 351(6329): p. 714-8.
19. Lowenstein, C.J., et al., *Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(15): p. 6711-5.
20. Lamas, S., et al., *Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(14): p. 6348-52.
21. Janssens, S.P., et al., *Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase*. *J Biol Chem*, 1992. 267(21): p. 14519-22.
22. Sessa, W.C., et al., *Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase*. *J Biol Chem*, 1992. 267(22): p. 15274-6.
23. Marsden, P.A., et al., *Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene*. *J Biol Chem*, 1993. 268(23): p. 17478-88.
24. Nadaud, S., et al., *Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. 198(3): p. 1027-33.
25. Miyahara, K., et al., *Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene*. *Eur J Biochem*, 1994. 223(3): p. 719-26.
26. Jin, R.C. and J. Loscalzo, *Vascular Nitric Oxide: Formation and Function*. *J Blood Med*, 2010. 2010(1): p. 147-162.
27. Villanueva, C. and C. Giulivi, *Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease*. *Free Radic Biol Med*, 2010. 49(3): p. 307-16.
28. O'Dell, T.J., et al., *Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(24): p. 11285-9.
29. Schuman, E.M. and D.V. Madison, *A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation*. *Science*, 1991. 254(5037): p. 1503-6.
30. Rapoport, R.M., M.B. Draznin, and F. Murad, *Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation*. *Nature*, 1983. 306(5939): p. 174-6.
31. Khan, B.V., et al., *Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(17): p. 9114-9.
32. Gudi, T., et al., *Nitric oxide and cGMP regulate gene expression in neuronal and glial cells by activating type II cGMP-dependent protein kinase*. *FASEB J*, 1999. 13(15): p. 2143-52.
33. Pantopoulos, K. and M.W. Hentze, *Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(5): p. 1267-71.

34. Liu, X.B., P. Hill, and D.J. Haile, *Role of the ferroportin iron-responsive element in iron and nitric oxide dependent gene regulation*. *Blood Cells Mol Dis*, 2002. 29(3): p. 315-26.
35. Pozdnyakov, N., et al., *Nitric oxide-regulated endogenous ADP-ribosylation of rod outer segment proteins*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. 192(2): p. 610-5.
36. Brune, B., et al., *Nitric oxide: a signal for ADP-ribosylation of proteins*. *Life Sci*, 1994. 54(2): p. 61-70.
37. Mikkelsen, R.B. and P. Wardman, *Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms*. *Oncogene*, 2003. 22(37): p. 5734-54.
38. Lee, J.H., E.S. Yang, and J.W. Park, *Inactivation of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase by peroxynitrite. Implications for cytotoxicity and alcohol-induced liver injury*. *J Biol Chem*, 2003. 278(51): p. 51360-71.
39. Ridnour, L.A., et al., *The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations*. *Biol Chem*, 2004. 385(1): p. 1-10.
40. Zhou, L. and D.Y. Zhu, *Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications*. *Nitric Oxide*, 2009. 20(4): p. 223-30.
41. Forstermann, U., et al., *Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions*. *Hypertension*, 1994. 23(6 Pt 2): p. 1121-31.
42. Nakane, M., et al., *Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle*. *FEBS Lett*, 1993. 316(2): p. 175-80.
43. Izumi, Y., D.B. Clifford, and C.F. Zorumski, *Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release*. *Science*, 1992. 257(5074): p. 1273-6.
44. Izumi, Y. and C.F. Zorumski, *Nitric oxide and long-term synaptic depression in the rat hippocampus*. *Neuroreport*, 1993. 4(9): p. 1131-4.
45. Bohme, G.A., et al., *Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(19): p. 9191-4.
46. Togashi, H., et al., *A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992. 262(1): p. 343-7.
47. Sakuma, I., et al., *NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo. A role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone?* *Circ Res*, 1992. 70(3): p. 607-11.
48. el Karib, A.O., et al., *The central effects of a nitric oxide synthase inhibitor (N omega-nitro-L-arginine) on blood pressure and plasma renin*. *Clin Exp Hypertens*, 1993. 15(5): p. 819-32.
49. Toda, N., K. Ayajiki, and T. Okamura, *Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase*. *J Hypertens*, 2009. 27(10): p. 1929-40.
50. Melikian, N., et al., *Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation*. *Trends Cardiovasc Med*, 2009. 19(8): p. 256-62.
51. Schwarz, P.M., H. Kleinert, and U. Forstermann, *Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I*

- expressed in adventitia and media of rat aorta. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(11): p. 2584-90.
52. Steinert, J.R., T. Chernova, and I.D. Forsythe, *Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. Neuroscientist*, 2010. 16(4): p. 435-52.
 53. Lipton, S.A., et al., *A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. Nature*, 1993. 364(6438): p. 626-32.
 54. Brown, G.C., *Nitric oxide and neuronal death. Nitric Oxide*, 2010. 23(3): p. 153-65.
 55. Tottrup, A., D. Svane, and A. Forman, *Nitric oxide mediating NANC inhibition in opossum lower esophageal sphincter. Am J Physiol*, 1991. 260(3 Pt 1): p. G385-9.
 56. Lefebvre, R.A., *Pharmacological characterization of the nitrergic innervation of the stomach. Verh K Acad Geneesk Belg*, 2002. 64(3): p. 151-66.
 57. Nathan, C.F. and J.B. Hibbs, Jr., *Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Curr Opin Immunol*, 1991. 3(1): p. 65-70.
 58. Wink, D.A., et al., *DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. Science*, 1991. 254(5034): p. 1001-3.
 59. Fehsel, K., et al., *Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide. Diabetes*, 1993. 42(3): p. 496-500.
 60. Li, L.M., et al., *Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. Cancer Res*, 1991. 51(10): p. 2531-5.
 61. Green, S.J., et al., *Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. Immunol Lett*, 1990. 25(1-3): p. 15-9.
 62. Kroncke, K.D., et al., *Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. Biochem Biophys Res Commun*, 1991. 175(3): p. 752-8.
 63. Langrehr, J.M., et al., *Nitric oxide synthesis in the in vivo allograft response: a possible regulatory mechanism. Surgery*, 1991. 110(2): p. 335-42.
 64. Kanwar, J.R., et al., *Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. Curr Med Chem*, 2009. 16(19): p. 2373-94.
 65. Brown, G.C. and J.J. Neher, *Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. Mol Neurobiol*, 2010. 41(2-3): p. 242-7.
 66. Lange, M., et al., *Role of nitric oxide in shock: the large animal perspective. Front Biosci (Landmark Ed)*, 2009. 14: p. 1979-89.
 67. MacMicking, J.D., et al., *Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. Cell*, 1995. 81(4): p. 641-50.
 68. Garcia-Cardena, G., et al., *Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. Nature*, 1998. 392(6678): p. 821-4.

69. Pritchard, K.A., Jr., et al., *Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2001. 276(21): p. 17621-4.
70. Song, Y., et al., *Inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase by heat shock protein 90: implications in NOS regulation*. Biochemistry, 2002. 41(34): p. 10616-22.
71. Sowa, G., M. Pypaert, and W.C. Sessa, *Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(24): p. 14072-7.
72. Drab, M., et al., *Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice*. Science, 2001. 293(5539): p. 2449-52.
73. Gratton, J.P., et al., *Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1*. J Biol Chem, 2000. 275(29): p. 22268-72.
74. Fulton, D., et al., *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*. Nature, 1999. 399(6736): p. 597-601.
75. Fleming, I. and R. Busse, *Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. 284(1): p. R1-12.
76. McCabe, T.J., et al., *Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation*. J Biol Chem, 2000. 275(9): p. 6123-8.
77. Schleicher, M., et al., *The Akt1-eNOS axis illustrates the specificity of kinase-substrate relationships in vivo*. Sci Signal, 2009. 2(82): p. ra41.
78. Lin, M.I., et al., *Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production*. J Biol Chem, 2003. 278(45): p. 44719-26.
79. Fleming, I., *Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS*. Pflugers Arch, 2010. 459(6): p. 793-806.
80. Kolluru, G.K., J.H. Siamwala, and S. Chatterjee, *eNOS phosphorylation in health and disease*. Biochimie, 2010. 92(9): p. 1186-98.
81. Rocks, O., et al., *An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms*. Science, 2005. 307(5716): p. 1746-52.
82. Sowa, G., et al., *Trafficking of endothelial nitric-oxide synthase in living cells. Quantitative evidence supporting the role of palmitoylation as a kinetic trapping mechanism limiting membrane diffusion*. J Biol Chem, 1999. 274(32): p. 22524-31.
83. Sakoda, T., et al., *Myristoylation of endothelial cell nitric oxide synthase is important for extracellular release of nitric oxide*. Mol Cell Biochem, 1995. 152(2): p. 143-8.
84. Robinson, L.J. and T. Michel, *Mutagenesis of palmitoylation sites in endothelial nitric oxide synthase identifies a novel motif for dual acylation and subcellular targeting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(25): p. 11776-80.
85. Robinson, L.J., L. Busconi, and T. Michel, *Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase*. J Biol Chem, 1995. 270(3): p. 995-8.

86. Duckles, S.P. and V.M. Miller, *Hormonal modulation of endothelial NO production*. Pflugers Arch, 2010. 459(6): p. 841-51.
87. Ignarro, L.J., et al., *Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid*. J Pharmacol Exp Ther, 1986. 237(3): p. 893-900.
88. Shesely, E.G., et al., *Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(23): p. 13176-81.
89. Huang, P.L., et al., *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase*. Nature, 1995. 377(6546): p. 239-42.
90. Alheid, U., J.C. Frolich, and U. Forstermann, *Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets*. Thromb Res, 1987. 47(5): p. 561-71.
91. Busse, R., A. Luckhoff, and E. Bassenge, *Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1987. 336(5): p. 566-71.
92. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide*. Br J Pharmacol, 1987. 92(3): p. 639-46.
93. Rudic, R.D., et al., *Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling*. J Clin Invest, 1998. 101(4): p. 731-6.
94. Zeiher, A.M., et al., *Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells*. Circ Res, 1995. 76(6): p. 980-6.
95. Arndt, H., C.W. Smith, and D.N. Granger, *Leukocyte-endothelial cell adhesion in spontaneously hypertensive and normotensive rats*. Hypertension, 1993. 21(5): p. 667-73.
96. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(11): p. 4651-5.
97. Dimmeler, S. and A.M. Zeiher, *Nitric oxide-an endothelial cell survival factor*. Cell Death Differ, 1999. 6(10): p. 964-8.
98. Garg, U.C. and A. Hassid, *Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1989. 83(5): p. 1774-7.
99. Nakaki, T., M. Nakayama, and R. Kato, *Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells*. Eur J Pharmacol, 1990. 189(6): p. 347-53.
100. Nunokawa, Y. and S. Tanaka, *Interferon-gamma inhibits proliferation of rat vascular smooth muscle cells by nitric oxide generation*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. 188(1): p. 409-15.
101. Hogan, M., A. Cerami, and R. Bucala, *Advanced glycosylation endproducts block the antiproliferative effect of nitric oxide. Role in the vascular and renal complications of diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1992. 90(3): p. 1110-5.

102. Southgate, K. and A.C. Newby, *Serum-induced proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells from the contractile state is inhibited by 8-Br-cAMP but not 8-Br-cGMP*. *Atherosclerosis*, 1990. 82(1-2): p. 113-23.
103. Forstermann, U., *Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2008. 5(6): p. 338-49.
104. Han, R.N. and D.J. Stewart, *Defective lung vascular development in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice*. *Trends Cardiovasc Med*, 2006. 16(1): p. 29-34.
105. Murohara, T., et al., *Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia*. *J Clin Invest*, 1998. 101(11): p. 2567-78.
106. Aicher, A., et al., *Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells*. *Nat Med*, 2003. 9(11): p. 1370-6.
107. Wohlfart, P., et al., *Antiatherosclerotic effects of small-molecular-weight compounds enhancing endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. 325(2): p. 370-9.
108. Sasaki, K., et al., *Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(39): p. 14537-41.
109. Landmesser, U., et al., *Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase*. *Circulation*, 2004. 110(14): p. 1933-9.
110. Chen, A.F., J. Ren, and C.Y. Miao, *Nitric oxide synthase gene therapy for cardiovascular disease*. *Jpn J Pharmacol*, 2002. 89(4): p. 327-36.
111. O'Connor, D.M. and T. O'Brien, *Nitric oxide synthase gene therapy: progress and prospects*. *Expert Opin Biol Ther*, 2009. 9(7): p. 867-78.
112. Kietadisorn, R., R.P. Juni, and A.L. Moens, *Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012. 302(5): p. E481-95.
113. De Caterina, R., et al., *Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines*. *J Clin Invest*, 1995. 96(1): p. 60-8.
114. Takaya, T., et al., *A specific role for eNOS-derived reactive oxygen species in atherosclerosis progression*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(7): p. 1632-7.
115. Wilcox, J.N., et al., *Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. 17(11): p. 2479-88.
116. Maas, R., et al., *Simultaneous assessment of endothelial function, nitric oxide synthase activity, nitric oxide-mediated signaling, and oxidative stress in individuals with and without hypercholesterolemia*. *Clin Chem*, 2008. 54(2): p. 292-300.

117. Hayashi, T., et al., *l-Citrulline and l-arginine supplementation retards the progression of high-cholesterol-diet-induced atherosclerosis in rabbits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(38): p. 13681-6.
118. Nematbakhsh, M., et al., *The prevention of endothelial dysfunction through endothelial cell apoptosis inhibition in a hypercholesterolemic rabbit model: the effect of L-arginine supplementation*. Lipids Health Dis, 2008. 7: p. 27.
119. Freedman, J.E., et al., *Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene*. Circ Res, 1999. 84(12): p. 1416-21.
120. Freedman, J.E., et al., *Decreased platelet inhibition by nitric oxide in two brothers with a history of arterial thrombosis*. J Clin Invest, 1996. 97(4): p. 979-87.
121. Bakdash, N. and M.S. Williams, *Spatially distinct production of reactive oxygen species regulates platelet activation*. Free Radic Biol Med, 2008. 45(2): p. 158-66.
122. Voetsch, B., et al., *Promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene: a novel risk factor for arterial ischemic stroke among young adults and children*. Stroke, 2007. 38(1): p. 41-9.
123. Voetsch, B., et al., *Role of promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene as a risk factor for cerebral venous thrombosis*. Stroke, 2008. 39(2): p. 303-7.
124. Panza, J.A., et al., *Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension*. Circulation, 1993. 87(5): p. 1468-74.
125. Panza, J.A., et al., *Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway*. Circulation, 1995. 91(6): p. 1732-8.
126. Perticone, F., et al., *Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients*. Circulation, 2001. 104(2): p. 191-6.
127. Guzik, T.J., et al., *Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase*. Circulation, 2002. 105(14): p. 1656-62.
128. Hink, U., et al., *Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus*. Circ Res, 2001. 88(2): p. E14-22.
129. Vasquez-Vivar, J., et al., *Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(16): p. 9220-5.
130. Vasquez-Vivar, J., et al., *The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study*. Biochem J, 2002. 362(Pt 3): p. 733-9.
131. Cooke, J.P., J. Dzau, and A. Creager, *Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is corrected by L-arginine*. Basic Res Cardiol, 1991. 86 Suppl 2: p. 173-81.
132. Boger, R.H., et al., *Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin*. Circulation, 1997. 96(4): p. 1282-90.

133. Boucher, J.L., C. Moali, and J.P. Tenu, *Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization*. *Cell Mol Life Sci*, 1999. 55(8-9): p. 1015-28.
134. Kajiya, M., et al., *Impaired NO-mediated vasodilation with increased superoxide but robust EDHF function in right ventricular arterial microvessels of pulmonary hypertensive rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. 292(6): p. H2737-44.
135. Fortunato, A., et al., *Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension*. *J Hypertens*, 2004. 22(11): p. 2169-75.
136. Morcos, M., et al., *Effect of alpha-lipoic acid on the progression of endothelial cell damage and albuminuria in patients with diabetes mellitus: an exploratory study*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2001. 52(3): p. 175-83.
137. Schalkwijk, C.G. and C.D. Stehouwer, *Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction*. *Clin Sci (Lond)*, 2005. 109(2): p. 143-59.
138. Sartoretto, J.L., et al., *Constrictor responses to noradrenaline, hemodynamic profile, and superoxide levels measured by hydroethidine oxidation in diabetic rats*. *Biol Pharm Bull*, 2007. 30(10): p. 1938-42.
139. Biswas, S.K., et al., *Hypertension increases pro-oxidant generation and decreases antioxidant defense in the kidney in early diabetes*. *Am J Nephrol*, 2008. 28(1): p. 133-42.
140. Dixon, L.J., et al., *Increased superoxide production in hypertensive patients with diabetes mellitus: role of nitric oxide synthase*. *Am J Hypertens*, 2005. 18(6): p. 839-43.
141. Hattori, Y., et al., *Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta*. *Am J Physiol*, 1991. 261(4 Pt 2): p. H1086-94.
142. Inoguchi, T., et al., *High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells*. *Diabetes*, 2000. 49(11): p. 1939-45.
143. Serpillon, S., et al., *Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. 297(1): p. H153-62.
144. Xia, L., et al., *High glucose activates PKC-zeta and NADPH oxidase through autocrine TGF-beta1 signaling in mesangial cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. 295(6): p. F1705-14.
145. Yeop Han, C., et al., *Differential effect of saturated and unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes: dissociation of adipocyte hypertrophy from inflammation*. *Diabetes*, 2010. 59(2): p. 386-96.
146. Du, Y., C.M. Miller, and T.S. Kern, *Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells*. *Free Radic Biol Med*, 2003. 35(11): p. 1491-9.
147. Gupte, R.S., et al., *Synergistic activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NAD(P)H oxidase by Src kinase elevates superoxide in*

- type 2 diabetic, Zucker fa/fa, rat liver. Free Radic Biol Med, 2009. 47(3): p. 219-28.*
148. Pearson, J.D., *Normal endothelial cell function. Lupus, 2000. 9(3): p. 183-8.*
 149. Clancy, R.M. and S.B. Abramson, *Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. Proc Soc Exp Biol Med, 1995. 210(2): p. 93-101.*
 150. Oates, J.C., et al., *Prospective measure of serum 3-nitrotyrosine levels in systemic lupus erythematosus: correlation with disease activity. Proc Assoc Am Physicians, 1999. 111(6): p. 611-21.*
 151. Gilkeson, G., et al., *Correlation of serum measures of nitric oxide production with lupus disease activity. J Rheumatol, 1999. 26(2): p. 318-24.*
 152. Brundin, L., et al., *Central nervous system nitric oxide formation in cerebral systemic lupus erythematosus. Ann Neurol, 1998. 44(4): p. 704-6.*
 153. Rolla, G., et al., *Increased nitric oxide in exhaled air of patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol, 1997. 24(6): p. 1066-71.*
 154. Clancy, R.M., A.R. Amin, and S.B. Abramson, *The role of nitric oxide in inflammation and immunity. Arthritis Rheum, 1998. 41(7): p. 1141-51.*
 155. van't Hof, R.J., et al., *Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint. Rheumatology (Oxford), 2000. 39(9): p. 1004-8.*
 156. Vural, P., et al., *The relationship between transforming growth factor-beta1, vascular endothelial growth factor, nitric oxide and Hashimoto's thyroiditis. Int Immunopharmacol, 2009. 9(2): p. 212-5.*
 157. Hassan, S.Z., et al., *Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity. Int J Rheum Dis, 2011. 14(4): p. 325-31.*
 158. McCartney-Francis, N., et al., *Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. J Exp Med, 1993. 178(2): p. 749-54.*
 159. Fenster, B.E., P.S. Tsao, and S.G. Rockson, *Endothelial dysfunction: clinical strategies for treating oxidant stress. Am Heart J, 2003. 146(2): p. 218-26.*
 160. Manson, J.J. and D.A. Isenberg, *The pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Neth J Med, 2003. 61(11): p. 343-6.*
 161. Gaffney, P.M., et al., *Genome screening in human systemic lupus erythematosus: results from a second Minnesota cohort and combined analyses of 187 sib-pair families. Am J Hum Genet, 2000. 66(2): p. 547-56.*
 162. AlFadhli, S., *Influence of endothelial nitric oxide synthase gene intron-4 27bp repeat polymorphism on its expression in autoimmune diseases. Dis Markers, 2013. 34(5): p. 349-56.*
 163. Ying, L. and L.J. Hofseth, *An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. Cancer Res, 2007. 67(4): p. 1407-10.*
 164. deRojas-Walker, T., et al., *Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. Chem Res Toxicol, 1995. 8(3): p. 473-7.*
 165. Gal, A. and G.N. Wogan, *Mutagenesis associated with nitric oxide production in transgenic SJL mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(26): p. 15102-7.*

166. Wink, D.A., et al., *The multifaceted roles of nitric oxide in cancer*. *Carcinogenesis*, 1998. 19(5): p. 711-21.
167. Sun, Y., *Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis*. *Free Radic Biol Med*, 1990. 8(6): p. 583-99.
168. Choudhari, S.K., et al., *Nitric oxide and cancer: a review*. *World J Surg Oncol*, 2013. 11: p. 118.
169. Choi, B.M., et al., *Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator*. *J Biochem Mol Biol*, 2002. 35(1): p. 116-26.
170. von Knethen, A. and B. Brune, *Cyclooxygenase-2: an essential regulator of NO-mediated apoptosis*. *FASEB J*, 1997. 11(11): p. 887-95.
171. Ziche, M. and L. Morbidelli, *Nitric oxide and angiogenesis*. *J Neurooncol*, 2000. 50(1-2): p. 139-48.
172. Lala, P.K. and A. Orucevic, *Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors*. *Cancer Metastasis Rev*, 1998. 17(1): p. 91-106.
173. Zhang, J., et al., *Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity*. *Science*, 1994. 263(5147): p. 687-9.
174. Xu, W., et al., *Nitric oxide upregulates expression of DNA-PKcs to protect cells from DNA-damaging anti-tumour agents*. *Nat Cell Biol*, 2000. 2(6): p. 339-45.
175. Thomsen, L.L., et al., *Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer*. *Cancer Res*, 1994. 54(5): p. 1352-4.
176. Taysi, S., et al., *Malondialdehyde and nitric oxide levels in the plasma of patients with advanced laryngeal cancer*. *Surg Today*, 2003. 33(9): p. 651-4.
177. Cobbs, C.S., et al., *Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors*. *Cancer Res*, 1995. 55(4): p. 727-30.
178. Reveneau, S., et al., *Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade, proliferation rate, and expression of progesterone receptors*. *Lab Invest*, 1999. 79(10): p. 1215-25.
179. zur Hausen, H., *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(5): p. 342-50.
180. Benencia, F., et al., *Nitric oxide and HSV vaginal infection in BALB/c mice*. *Virology*, 2003. 309(1): p. 75-84.
181. Carratelli, C.R., et al., *Effect of nitric oxide on the growth of Chlamydomyxa pneumoniae*. *Can J Microbiol*, 2005. 51(11): p. 941-7.
182. Chang, K. and Z. Lubo, *Review article: steroid hormones and uterine vascular adaptation to pregnancy*. *Reprod Sci*, 2008. 15(4): p. 336-48.
183. Naidu, M.S., et al., *Oxidative stress and antioxidant status in cervical cancer patients*. *Indian J Clin Biochem*, 2007. 22(2): p. 140-4.
184. Beevi, S.S., M.H. Rasheed, and A. Geetha, *Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma*. *Clin Chim Acta*, 2007. 375(1-2): p. 119-23.
185. Hiraku, Y., et al., *Nitrative and oxidative DNA damage in cervical intraepithelial neoplasia associated with human papilloma virus infection*. *Cancer Sci*, 2007. 98(7): p. 964-72.
186. Tavares-Murta, B.M., et al., *Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2008. 138(1): p. 93-9.

187. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 1999. 189(1): p. 12-9.
188. Wei, L., et al., *Nitric oxide induces early viral transcription coincident with increased DNA damage and mutation rates in human papillomavirus-infected cells*. Cancer Res, 2009. 69(11): p. 4878-84.
189. Bilello, K.S., S. Murin, and R.A. Matthay, *Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer*. Clin Chest Med, 2002. 23(1): p. 1-25.
190. Masri, F.A., et al., *Abnormalities in nitric oxide and its derivatives in lung cancer*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. 172(5): p. 597-605.
191. Wei, X.M., et al., *[Relationship between nitric oxide in cervical microenvironment and different HPV types and effect on cervical cancer cells]*. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2011. 46(4): p. 260-5.
192. Chen, G.G., et al., *Increased inducible nitric oxide synthase in lung carcinoma of smokers*. Cancer, 2008. 112(2): p. 372-81.
193. Puhakka, A.R., et al., *Nitric oxide synthases are associated with bronchial dysplasia*. Lung Cancer, 2006. 51(3): p. 275-82.
194. Masri, F., *Role of nitric oxide and its metabolites as potential markers in lung cancer*. Ann Thorac Med, 2010. 5(3): p. 123-7.
195. Beckman, J.S., et al., *Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxyxynitrite*. Arch Biochem Biophys, 1992. 298(2): p. 438-45.
196. Haddad, I.Y., et al., *Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury*. J Clin Invest, 1994. 94(6): p. 2407-13.
197. MacMillan-Crow, L.A., et al., *Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(21): p. 11853-8.
198. Cobbs, C.S., et al., *Inactivation of wild-type p53 protein function by reactive oxygen and nitrogen species in malignant glioma cells*. Cancer Res, 2003. 63(24): p. 8670-3.
199. Correa, P., M.B. Piazuelo, and M.C. Camargo, *The future of gastric cancer prevention*. Gastric Cancer, 2004. 7(1): p. 9-16.
200. Calatayud, S., D. Barrachina, and J.V. Esplugues, *Nitric oxide: relation to integrity, injury, and healing of the gastric mucosa*. Microsc Res Tech, 2001. 53(5): p. 325-35.
201. Yagihashi, N., et al., *Increased in situ expression of nitric oxide synthase in human colorectal cancer*. Virchows Arch, 2000. 436(2): p. 109-14.
202. Correa, P., *Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention*. Cancer Res, 1992. 52(24): p. 6735-40.
203. Nardone, G., *Review article: molecular basis of gastric carcinogenesis*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. 17 Suppl 2: p. 75-81.
204. Parsonnet, J., et al., *Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection*. Gut, 1997. 40(3): p. 297-301.
205. Nam, K.T., et al., *Decreased Helicobacter pylori associated gastric carcinogenesis in mice lacking inducible nitric oxide synthase*. Gut, 2004. 53(9): p. 1250-5.
206. Fenoglio-Preiser, C.M., et al., *TP53 and gastric carcinoma: a review*. Hum Mutat, 2003. 21(3): p. 258-70.

207. Nagpal, J.K. and B.R. Das, *Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management*. *Oral Oncol*, 2003. 39(3): p. 213-21.
208. Cooper, R.G. and T. Magwere, *Nitric oxide-mediated pathogenesis during nicotine and alcohol consumption*. *Indian J Physiol Pharmacol*, 2008. 52(1): p. 11-8.
209. Thomsen, L.L., et al., *Nitric oxide synthase activity in human breast cancer*. *Br J Cancer*, 1995. 72(1): p. 41-4.
210. Carvalho, S.M., et al., *Is the expression of inducible (iNOS) and endothelial (eNOS) nitric oxide synthases an early event in breast carcinogenesis?* *Breast J*, 2010. 16(4): p. 440-1.
211. Switzer, C.H., et al., *Ets-1 is a transcriptional mediator of oncogenic nitric oxide signaling in estrogen receptor-negative breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2012. 14(5): p. R125.
212. Zeillinger, R., et al., *Simultaneous expression of nitric oxide synthase and estrogen receptor in human breast cancer cell lines*. *Breast Cancer Res Treat*, 1996. 40(2): p. 205-7.
213. Pance, A., *Nitric oxide and hormones in breast cancer: allies or enemies?* *Future Oncol*, 2006. 2(2): p. 275-88.
214. Aranda, E., et al., *Nitric oxide and cancer: the emerging role of S-nitrosylation*. *Curr Mol Med*, 2012. 12(1): p. 50-67.
215. Zhao, S.F., X.Y. Tong, and F.D. Zhu, *Nitric oxide induces oral squamous cell carcinoma cells apoptosis with p53 accumulation*. *Oral Oncol*, 2005. 41(8): p. 785-90.
216. Korde Choudhari, S., et al., *Nitric oxide and oral cancer: a review*. *Oral Oncol*, 2012. 48(6): p. 475-83.
217. Lee, K.M., et al., *Nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk*. *Carcinogenesis*, 2009. 30(4): p. 621-5.
218. Cooke, G.E., A. Doshi, and P.F. Binkley, *Endothelial nitric oxide synthase gene: prospects for treatment of heart disease*. *Pharmacogenomics*, 2007. 8(12): p. 1723-34.
219. Marsden, P.A., et al., *Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase*. *FEBS Lett*, 1992. 307(3): p. 287-93.
220. Tesauro, M., et al., *Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(6): p. 2832-5.
221. Yoshimura, M., et al., *A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese*. *Hum Genet*, 1998. 103(1): p. 65-9.
222. Nakayama, M., et al., *T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm*. *Circulation*, 1999. 99(22): p. 2864-70.
223. French, J.K., et al., *Potential thrombophilic mutations/polymorphisms in patients with no flow-limiting stenosis after myocardial infarction*. *Am Heart J*, 2003. 145(1): p. 118-24.
224. Miyamoto, Y., et al., *Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation*

- associated with coronary spastic angina. Hum Mol Genet, 2000. 9(18): p. 2629-37.*
225. Jeerooburkhan, N., et al., *Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. Hypertension, 2001. 38(5): p. 1054-61.*
 226. Nagassaki, S., et al., *eNOS genotype is without effect on circulating nitrite/nitrate level in healthy male population. Thromb Res, 2005. 115(5): p. 375-9.*
 227. Tsukada, T., et al., *Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. Biochem Biophys Res Commun, 1998. 245(1): p. 190-3.*
 228. Rossi, G.P., et al., *The T(-786)C endothelial nitric oxide synthase genotype predicts cardiovascular mortality in high-risk patients. J Am Coll Cardiol, 2006. 48(6): p. 1166-74.*
 229. Zhang, M.X., et al., *Regulation of endothelial nitric oxide synthase by small RNA. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(47): p. 16967-72.*
 230. Zhang, M.X., et al., *Effect of 27nt small RNA on endothelial nitric-oxide synthase expression. Mol Biol Cell, 2008. 19(9): p. 3997-4005.*
 231. Forstermann, U. and T. Munzel, *Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. Circulation, 2006. 113(13): p. 1708-14.*
 232. Gong, L.L., et al., *Association of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor polymorphism with myocardial infarction: a meta-analysis. Thromb Res, 2012. 130(3): p. e43-51.*
 233. Chien, Y.H., D.T. Bau, and K.Y. Jan, *Nitric oxide inhibits DNA-adduct excision in nucleotide excision repair. Free Radic Biol Med, 2004. 36(8): p. 1011-7.*
 234. Niu, W. and Y. Qi, *An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension. PLoS One, 2011. 6(9): p. e24266.*
 235. Li, Y.Y., *Endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism and essential hypertension in the Chinese population: a meta-analysis involving 11,248 subjects. Intern Med, 2011. 50(19): p. 2099-106.*
 236. Luo, J.Q., et al., *Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene G894T Polymorphism and Myocardial Infarction: A Meta-Analysis of 34 Studies Involving 21068 Subjects. PLoS One, 2014. 9(1): p. e87196.*
 237. Luo, Y., et al., *Association of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) G894T polymorphism with high altitude pulmonary edema susceptibility: a meta-analysis. Wilderness Environ Med, 2012. 23(3): p. 270-4.*
 238. Faraci, F.M. and J.E. Brian, Jr., *Nitric oxide and the cerebral circulation. Stroke, 1994. 25(3): p. 692-703.*
 239. Guo, X., *Endothelial nitric oxide (eNOS) gene G894T and VNTR polymorphisms are closely associated with the risk of ischemic stroke development for Asians: meta-analysis of epidemiological studies. Mol Biol Rep, 2014.*
 240. Liu, R., et al., *Association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (T-786C) and ischemic stroke susceptibility: a meta-analysis. Int J Neurosci, 2014.*
 241. Mount, P.F. and D.A. Power, *Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. Acta Physiol (Oxf), 2006. 187(4): p. 433-46.*

242. Shultz, P.J. and J.P. Tolins, *Adaptation to increased dietary salt intake in the rat. Role of endogenous nitric oxide.* J Clin Invest, 1993. 91(2): p. 642-50.
243. Palm, F., T. Teerlink, and P. Hansell, *Nitric oxide and kidney oxygenation.* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2009. 18(1): p. 68-73.
244. Mohan, S., et al., *Diabetic eNOS knockout mice develop distinct macro- and microvascular complications.* Lab Invest, 2008. 88(5): p. 515-28.
245. Zeng, Z., et al., *A meta-analysis of three polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) and their effect on the risk of diabetic nephropathy.* Hum Genet, 2010. 127(4): p. 373-81.
246. Dellamea, B.S., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of diabetic nephropathy: a systematic review and meta-analysis.* BMC Med Genet, 2014. 15: p. 9.
247. Nagy, G., et al., *Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.* Arthritis Res Ther, 2010. 12(3): p. 210.
248. Alfadhli, S., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene haplotype association with systemic lupus erythematosus.* Lupus, 2011. 20(7): p. 700-8.
249. Li, X., et al., *Association of the genetic polymorphisms of the ACE gene and the eNOS gene with lupus nephropathy in northern Chinese population.* BMC Med Genet, 2010. 11: p. 94.
250. Tang, F.Y., et al., *Endothelial nitric oxide synthase and nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate oxidase p22phox gene (C242T) polymorphisms and systemic lupus erythematosus in a Chinese Population.* Lupus, 2010. 19(2): p. 192-6.
251. Mucenic, T., et al., *Glu298Asp eNOS polymorphism is not associated with SLE.* Lupus, 2009. 18(5): p. 448-51.
252. Vazgiourakis, V., et al., *Association of the nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphism with increased risk for both lupus glomerulonephritis and rheumatoid arthritis in a single genetically homogeneous population.* Lupus, 2007. 16(11): p. 867-74.
253. Serrano, N.C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus.* J Rheumatol, 2004. 31(11): p. 2163-8.
254. Douglas, G., et al., *Angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion) and endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus.* J Rheumatol, 2004. 31(9): p. 1756-62.
255. Lee, Y.H., et al., *Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with the development of lupus nephritis.* Lupus, 2004. 13(3): p. 188-91.
256. Zervou, M.I., et al., *TRAF1/C5, eNOS, C1q, but not STAT4 and PTPN22 gene polymorphisms are associated with genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in Turkey.* Hum Immunol, 2011. 72(12): p. 1210-3.
257. Lee, Y.H., et al., *Associations between eNOS polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis.* Inflamm Res, 2012. 61(2): p. 135-41.
258. Dursun, A., et al., *Angiotensin-converting enzyme gene and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease with or without ocular involvement.* Inflamm Res, 2009. 58(7): p. 401-5.

259. Ben Dhifallah, I., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with Behcet's disease in Tunisian population*. Hum Immunol, 2008. 69(10): p. 661-5.
260. Nakao, K., et al., *Nitric oxide synthase and superoxide dismutase gene polymorphisms in Behcet disease*. Arch Ophthalmol, 2007. 125(2): p. 246-51.
261. Oksel, F., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism is associated with Behcet's disease*. Clin Exp Rheumatol, 2006. 24(5 Suppl 42): p. S79-82.
262. Kara, N., et al., *Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (glu298asp) with Behcet's disease in the Turkish population*. Arch Dermatol Res, 2006. 297(10): p. 468-71.
263. Karasneh, J.A., et al., *Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene are associated with Behcet's disease*. Rheumatology (Oxford), 2005. 44(5): p. 614-7.
264. Kim, J.U., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis*. Ann Rheum Dis, 2003. 62(11): p. 1083-7.
265. Salvarani, C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease*. J Rheumatol, 2002. 29(3): p. 535-40.
266. Lee, Y.H. and G.G. Song, *Associations between eNOS polymorphisms and susceptibility to Behcet's disease: a meta-analysis*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2012. 26(10): p. 1266-71.
267. Melchers, I., et al., *The -786C/T single-nucleotide polymorphism in the promoter of the gene for endothelial nitric oxide synthase: insensitivity to physiologic stimuli as a risk factor for rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2006. 54(10): p. 3144-51.
268. Melchers, I. and M. Cattaruzza, *[A gene defect in the promoter of the endothelial NO synthase as a risk factor for rheumatoid arthritis]*. Z Rheumatol, 2007. 66(4): p. 326-7.
269. Brenol, C.V., et al., *Endothelial nitric oxide synthase T-786C polymorphism in rheumatoid arthritis: association with extraarticular manifestations*. Clin Rheumatol, 2009. 28(2): p. 201-5.
270. Gonzalez-Gay, M.A., et al., *Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain*. Rheumatology (Oxford), 2004. 43(9): p. 1182-5.
271. Shah, V., et al., *The hepatic circulation in health and disease: report of a single-topic symposium*. Hepatology, 1998. 27(1): p. 279-88.
272. Selmi, C., et al., *Genetic variants of endothelial nitric oxide synthase in patients with primary biliary cirrhosis: association with disease severity*. J Gastroenterol Hepatol, 2003. 18(10): p. 1150-5.
273. Mantaka, A., et al., *Polymorphisms of genes related to endothelial cells are associated with primary biliary cirrhosis patients of Cretan origin*. Hum Immunol, 2012. 73(8): p. 829-35.
274. Senturk, N., et al., *Association of eNOS gene polymorphism (Glu298Asp) with psoriasis*. J Dermatol Sci, 2006. 44(1): p. 52-5.
275. Fatini, C., et al., *Influence of eNOS gene polymorphisms on carotid atherosclerosis*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2004. 27(5): p. 540-4.

276. Salvarani, C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in giant cell arteritis*. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(11): p. 3219-23.
277. Dai, B., et al., *The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: a meta-analysis*. *Gene*, 2013. 519(1): p. 187-93.
278. Cao, Y., et al., *Genetic association studies of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in women with unexplained recurrent pregnancy loss: a systematic and meta-analysis*. *Mol Biol Rep*, 2014.
279. Walch, K., A. Kolbus, and K. Hefler-Frischmuth, *Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in premenopausal women with polycystic ovary syndrome*. *Maturitas*, 2008. 61(3): p. 256-9.
280. Conde, M.C., et al., *Genetic analysis of caveolin-1 and eNOS genes in colorectal cancer*. *Oncol Rep*, 2006. 16(2): p. 353-9.
281. Yeh, C.C., et al., *An intron 4 VNTR polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with early-onset colorectal cancer*. *Int J Cancer*, 2009. 124(7): p. 1565-71.
282. Arikan, S., et al., *The effects of NOS3 Glu298Asp variant on colorectal cancer risk and progression in Turkish population*. *Mol Biol Rep*, 2012. 39(3): p. 3245-9.
283. Jang, M.J., et al., *Association of eNOS polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) with colorectal cancer susceptibility in the Korean population*. *Gene*, 2013. 512(2): p. 275-81.
284. Kim, Y.J., et al., *No association of the eNOS gene polymorphisms with survival in patients with colorectal cancer*. *Med Oncol*, 2011. 28(4): p. 1075-9.
285. Funke, S., et al., *Effect modification by smoking on the association between genetic polymorphisms in oxidative stress genes and colorectal cancer risk*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009. 18(8): p. 2336-8.
286. Medeiros, R.M., et al., *Outcome in prostate cancer: association with endothelial nitric oxide synthase Glu-Asp298 polymorphism at exon 7*. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(11): p. 3433-7.
287. Marangoni, K., et al., *The endothelial nitric oxide synthase Glu-298-Asp polymorphism and its mRNA expression in the peripheral blood of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia*. *Cancer Detect Prev*, 2006. 30(1): p. 7-13.
288. Sanli, O., et al., *Despite the lack of association between different genotypes and the presence of prostate cancer, endothelial nitric oxide synthase a/b (eNOS4a/b) polymorphism may be associated with advanced clinical stage and bone metastasis*. *Urol Oncol*, 2011. 29(2): p. 183-8.
289. Medeiros, R., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the shedding of circulating tumour cells in the blood of prostate cancer patients*. *Cancer Lett*, 2003. 189(1): p. 85-90.
290. Safarinejad, M.R., S. Safarinejad, and N. Shafiei, *Effects of the T-786C, G894T, and Intron 4 VNTR (4a/b) polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene on the risk of prostate cancer*. *Urol Oncol*, 2013. 31(7): p. 1132-40.
291. Ziaei, S.A., et al., *Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp polymorphism as a risk factor for prostate cancer*. *Int J Biol Markers*, 2013. 28(1): p. 43-8.

292. Abadi, A.T. and J.G. Kusters, *Association of inducible nitric oxide synthetase genotype and Helicobacter pylori infection gastric cancer risk may be due to faulty primer design*. World J Gastroenterol, 2013. 19(3): p. 429-30.
293. Shen, J., et al., *A novel genetic polymorphism of inducible nitric oxide synthase is associated with an increased risk of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2004. 10(22): p. 3278-83.
294. Tecder Unal, M., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in gastric cancer*. Turk J Gastroenterol, 2010. 21(4): p. 338-44.
295. Dan, S., et al., *Pharmacogenetic angiogenesis profiling for first-line chemotherapy in patients with advanced gastric cancer*. Cancer Invest, 2013. 31(6): p. 390-6.
296. Amasyali, A.S., et al., *Nitric oxide synthase (eNOS4a/b) gene polymorphism is associated with tumor recurrence and progression in superficial bladder cancer cases*. J Urol, 2012. 188(6): p. 2398-403.
297. Verim, L., et al., *Possible relation between the NOS3 gene GLU298ASP polymorphism and bladder cancer in Turkey*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. 14(2): p. 665-8.
298. Ryk, C., et al., *Polymorphisms in nitric-oxide synthase 3 may influence the risk of urinary-bladder cancer*. Nitric Oxide, 2011. 25(3): p. 338-43.
299. Cheon, K.T., et al., *Gene polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase and angiotensin-converting enzyme in patients with lung cancer*. Lung, 2000. 178(6): p. 351-60.
300. Fujita, S., et al., *Genetic polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene correlate with overall survival in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy*. BMC Med Genet, 2010. 11: p. 167.
301. Zhang, J., et al., *Single nucleotide polymorphisms in NOS2A and NOS3 genes are not associated with treatment response of non-small cell lung cancer patients following the definitive radiochemotherapy*. Neoplasma, 2012. 59(6): p. 631-40.
302. Hefler, L.A., et al., *Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2002. 86(2): p. 134-7.
303. Riener, E.K., et al., *Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in women with vulvar cancer*. Gynecol Oncol, 2004. 93(3): p. 686-90.
304. Yuan, F., et al., *Influence of angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism on hepatocellular carcinoma risk in China*. DNA Cell Biol, 2013. 32(5): p. 268-73.
305. Choi, J.Y., et al., *Nitric oxide synthase variants and disease-free survival among treated and untreated breast cancer patients in a Southwest Oncology Group clinical trial*. Clin Cancer Res, 2009. 15(16): p. 5258-66.
306. Choi, J.Y., et al., *Genetic polymorphisms of eNOS, hormone receptor status, and survival of breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2006. 100(2): p. 213-8.
307. Kuptsova, N., et al., *Genetic predictors of long-term toxicities after radiation therapy for breast cancer*. Int J Cancer, 2008. 122(6): p. 1333-9.
308. Terrazzino, S., et al., *Common variants of eNOS and XRCC1 genes may predict acute skin toxicity in breast cancer patients receiving radiotherapy*

- after breast conserving surgery. *Radiother Oncol*, 2012. 103(2): p. 199-205.
309. Ahn, J., et al., *Polymorphisms in genes related to oxidative stress (CAT, MnSOD, MPO, and eNOS) and acute toxicities from radiation therapy following lumpectomy for breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(23): p. 7063-70.
 310. Yang, J., et al., *Relationships between polymorphisms in NOS3 and MPO genes, cigarette smoking and risk of post-menopausal breast cancer*. *Carcinogenesis*, 2007. 28(6): p. 1247-53.
 311. Lee, S.A., et al., *Combined effects of antioxidant vitamin and NOS3 genetic polymorphisms on breast cancer risk in women*. *Clin Nutr*, 2012. 31(1): p. 93-8.
 312. Lee, K.M., et al., *Genetic polymorphisms of NOS3 are associated with the risk of invasive breast cancer with lymph node involvement*. *Breast Cancer Res Treat*, 2007. 106(3): p. 433-8.
 313. Awata, T., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic macular edema in type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2004. 27(9): p. 2184-90.
 314. Li, Y., et al., *Oxidative stress-related genotypes, fruit and vegetable consumption and breast cancer risk*. *Carcinogenesis*, 2009. 30(5): p. 777-84.
 315. Lu, J., et al., *Promoter polymorphism (-786T>C) in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with risk of sporadic breast cancer in non-Hispanic white women age younger than 55 years*. *Cancer*, 2006. 107(9): p. 2245-53.
 316. Hefler, L.A., et al., *Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2006. 98(2): p. 151-5.
 317. Ghilardi, G., et al., *Vascular invasion in human breast cancer is correlated to T-->786C polymorphism of NOS3 gene*. *Nitric Oxide*, 2003. 9(2): p. 118-22.
 318. Hong, C.C., et al., *Genetic variability in iron-related oxidative stress pathways (Nrf2, NQO1, NOS3, and HO-1), iron intake, and risk of postmenopausal breast cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007. 16(9): p. 1784-94.
 319. Royo, J.L., et al., *Lack of association between NOS3 Glu298Asp and breast cancer risk: a case-control study*. *Breast Cancer Res Treat*, 2006. 100(3): p. 331-3.
 320. Schneider, B.P., et al., *Association of polymorphisms of angiogenesis genes with breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. 111(1): p. 157-63.
 321. Hao, Y., R. Montiel, and Y. Huang, *Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 894 G>T polymorphism is associated with breast cancer risk: a meta-analysis*. *Breast Cancer Res Treat*, 2010. 124(3): p. 809-13.
 322. Fu, H., et al., *Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) G894T polymorphism is not associated with breast cancer risk: new evidence*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. 128(2): p. 595-8.
 323. Patino, R., *Intron 4 VNTR (4a/b) polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with breast cancer in Mexican women*. *J Korean Med Sci*, 2013. 28(11): p. 1587-94.

