



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**«Επίδραση της σουλπιρίδης στο μεταβολισμό προ-καρκινογόνων
μέσω κυτοχρωμάτων σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα»**

**ΝΙΚΟΛΑΟΣ Α. ΔΗΜΟΥ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

Στην οικογένειά μου...

και σε όλους εκείνους που με βοήθησαν στη ζωή μου.

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος.....	1
Εισαγωγή.....	5
1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	6
1.2 Καρκίνος και Χημική Καρκινογένεση.....	7
1.3 Καρκίνος του Πνεύμονα	9
1.4 Διάκριση Χημικών Καρκινογόνων Ουσιών.....	12
1.4.1 Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες.....	12
1.4.1.1 Βενζο[α]πυρένιο.....	14
1.4.2 N-Νιτροζαμίνες.....	16
1.4.2.1 Η N-νιτροζαμίνη NNK.....	17
1.5 Μεταβολισμός Ξενοβιοτικών Ουσιών.....	18
1.6 Κυτόχρωμα P-450	22
1.6.1 Μοριακός Μηχανισμός Αντίδρασης.....	24
1.6.2 Ονοματολογία Κυτοχρώματος P-450	25
1.6.3 Παράγοντες Ρυθμιστικοί των Κυτοχρωμάτων.....	26
1.7 Μεταβολισμός Ξενοβιοτικών μέσω του P-450.....	30
1.7.1 Υποοικογένεια CYP1A	30
1.7.1.1 Κυτόχρωμα CYP1A1	32
1.7.1.2 Κυτόχρωμα CYP1A2.....	35
1.7.2 Υποοικογένεια CYP1B	37
1.8 Σχιζοφρένεια και Καρκίνος.....	39
1.8.1 Εισαγωγή στη Σχιζοφρένεια	39
1.8.2 Φάρμακα κατά της Σχιζοφρένειας	40
1.8.3 Ποσοστό Εμφάνισης Καρκίνου σε Σχιζοφρενείς.....	42
1.8.4 Ρύθμιση Κυτοχρωμάτων μέσω Ντοπαμινεργικού Συστήματος.....	42
1.9 Σκοπός της Έρευνας.....	46
Υλικά και Μέθοδοι.....	47
2.1 Πειραματόζωα.....	48
2.2 Καλλιέργεια Καρκινικών Κυτταρικών Σειρών Πνεύμονα	48

2.3 Απομόνωση Μικροσωματικών Πρωτεϊνών.....	50
2.4 Ανάλυση Πρωτεϊνών με την Μέθοδο της Ανοσοαποτύπωσης.....	51
2.4.1 Υπολογισμός της Συγκέντρωσης του Πρωτεϊνικού Εκχυλίσματος.....	51
2.4.2 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε Πηκτή Πολυακρυλαμίδιου.....	52
2.4.3 Μεταφορά Πρωτεϊνών σε Μembrάνη Νιτροκυτταρίνης.....	53
2.4.4 Κάλυψη των μη Ειδικών Θέσεων της Μembrάνης και Επώαση με Αντισώματα.....	54
2.4.5 Ανίχνευση Πρωτεϊνών.....	55
2.4.6 Ποσοτικοποίηση.....	56
2.5 Ποσοτική Ανάλυση mRNA.....	56
2.5.1 Απομόνωση Ολικού RNA.....	56
2.5.2 Ποσοτικός Προσδιορισμός Απομονωθέντος RNA με Φωτομέτρηση.....	57
2.5.3 Αντίστροφη Μεταγραφή RNA και Σύνθεση cDNA.....	58
2.5.4 Προσδιορισμός Έκφρασης mRNA με τη Μέθοδο Real Time PCR.....	59
2.6 Έλεγχος Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού με Άλας Τετραζολίου (MTT assay).....	63
2.10 Στατιστική Ανάλυση.....	65
Αποτελέσματα.....	66
3.1 Έκφραση Κυτοχρωμάτων P-450 στον Πνεύμονα Επιδύων.....	67
3.1.1 Επίδραση Σουλπιρίδης στα Κυτοχρώματα CYP1A1 και CYP1A2 στον Πνεύμονα Επίμυος.....	67
3.1.2 Επίδραση Σουλπιρίδης στο Κυτόχρωμα CYP1B1 στον Πνεύμονα Επίμυος.....	68
3.2 Επίδραση της Σουλπιρίδης στην Έκφραση των D2-R στα Κύτταρα A549 και H1299, και στην Ενεργοποίηση του Μονοπατιού D2-R/cAMP/CREB.....	68
3.3 Αξιολόγηση της Επίδρασης της Σουλπιρίδης στην Επιβίωση των Καρκινικών Κυττάρων Πνεύμονα.....	70
3.3.1 Επίδραση της Σουλπιρίδης στην Κυτταρική Επιβίωση των Καρκινικών Κυττάρων Πνεύμονα, A549.....	70
3.3.2 Επίδραση της Σουλπιρίδης στην Κυτταρική Επιβίωση των Καρκινικών Κυττάρων Πνεύμονα, H1299.....	71
3.4 Έκφραση Κυτοχρωμάτων P-450 σε Καρκινικά Κύτταρα του Πνεύμονα, A549.....	71
3.4.1 Επίδραση Σουλπιρίδης στο Κυτόχρωμα CYP1A1 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, A549.....	72
3.4.2 Επίδραση Σουλπιρίδης στο Κυτόχρωμα CYP1A2 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, A549.....	73

3.4.3 Επίδραση Σουλπιρίδης στο Κυτόχρωμα CYP1B1 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, A549	74
3.4.4 Επίδραση Σουλπιρίδης σε Μεταγραφικούς Παράγοντες των Κυτοχρωμάτων CYP1 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, A549	74
3.5 Έκφραση Κυτοχρωμάτων P-450 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, H1299	77
3.5.1 Επίδραση Σουλπιρίδης στο Κυτόχρωμα CYP1A1 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, H1299	77
3.5.2 Επίδραση Σουλπιρίδης στο Κυτόχρωμα CYP1A2 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, H1299	78
3.5.3 Επίδραση Σουλπιρίδης στο Κυτόχρωμα CYP1B1 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, H1299	79
3.5.4 Επίδραση Σουλπιρίδης σε Μεταγραφικούς Παράγοντες των Κυτοχρωμάτων CYP1 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, H1299	80
Συμπεράσματα	83
Συζήτηση	84
Περίληψη	88
Abstract	90
Βιβλιογραφία	91
Συντμήσεις	108

Πρόλογος

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Φαρμακολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα 2015-2018, στα πλαίσια του Δ.Π.Μ.Σ. «Βιοτεχνολογία», υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κας Μαρίας Κωνσταντή, Διευθύντριας του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και τη βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου, στην καθηγήτρια Φαρμακολογίας κα Μαρία Κωνσταντή, για την ανάθεση σε μένα του θέματος της Μεταπτυχιακής μου Διατριβής. Ιδιαίτερα θέλω να την ευχαριστήσω για την καθοδήγηση, τη συμπαράσταση και τη μεταλαμπάδευση των βαθύτατων επιστημονικών της γνώσεων. Η συνεχής παρουσία της, οι ερευνητικές κατευθύνσεις της, η υπομονή και η έμπρακτη βοήθειά της κατέστησαν δυνατή την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Στον Καθηγητή Βιολογικής Χημείας κ. Ευστάθιο Φριλίγγο, Διευθυντή του Δ.Π.Μ.Σ «Βιοτεχνολογία», θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου για την σωστή καθοδήγηση και επιμόρφωση μου καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών αλλά και για την δυνατότητα που μου προσέφερε να εκπονήσω την Μεταπτυχιακή μου Διατριβή στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας.

Στον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογίας κ. Θεόδωρο Τζαβάρα, Αναπληρωτή Διευθυντή του Δ.Π.Μ.Σ. «Βιοτεχνολογία», θα ήθελα να εκφράσω επίσης την ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες μου για την διεύρυνση του ερευνητικού μου ορίζοντα και την συνεισφορά του στην συνεργασία με την καθηγήτρια κα Μαρία Κωνσταντή.

Στην Καθηγήτρια Βιολογίας κα Μαρίκα Σύρρου, θα ήθελα να εκφράσω επίσης τις θερμές ευχαριστίες μου, για την σημαντική συνεισφορά της στην συνεργασία με την καθηγήτρια Φαρμακολογίας κα Μαρία Κωνσταντή για την εκπόνηση της Μεταπτυχιακής Διατριβής και την σωστή καθοδήγηση κατά την διάρκεια του κύκλου των μεταπτυχιακών σπουδών.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Ευάγγελο Κωλέττα, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογίας και τον κ. Σάββα Χριστοφορίδη Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογικής Χημείας, για την σωστή καθοδήγηση και επιμόρφωση μου καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ευάγγελο Κωλέττα, για την ευγενική χορηγία των κυτταρικών σειρών.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Μάριο Μαρσέλο και τέως Διευθυντή του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, που μου έδωσε την δυνατότητα να γίνω μέλος της πανεπιστημιακής κοινότητας και να ασχοληθώ με τον τόσο ενδιαφέροντα

τομέα, της βασικής έρευνας, θέτοντας στην διάθεσή μου την υλικοτεχνική υποδομή του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Περικλή Παππά, για την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε. Ήταν πάντα πρόθυμος να απαντήσει σε κάθε απορία μου και συνέβαλλε σημαντικά στην εξεύρεση λύσεων στις όποιες δυσκολίες παρουσιαζόταν. Θερμά τον ευχαριστώ και για την έμπρακτη βοήθεια στις κυτταροκαλλιέργειες και τις χρήσιμες υποδείξεις του.

Ευχαριστώ θερμότατα το Λέκτορα της Φαρμακολογίας κ. Γιώργο Λεονταρίτη, για την συνεχή επιμόρφωσή μου σε θέματα του ερευνητικού αντικειμένου. Ήταν πάντα πρόθυμος στη διαλεύκανση της κάθε απορίας μου και στην άμεση αντιμετώπιση των οποιονδήποτε δυσκολιών με τις προτάσεις του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην υποψήφια διδάκτορα κα Χριστίνα Ανδριοπούλου, για την εκπαίδευσή μου σε αναλυτικές και μοριακές τεχνικές του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας. Πρόθυμη πάντα να μου λύσει κάθε απορία και να βοηθήσει σε κάθε δυσκολία που τυχόν παρουσιαζόταν. Η υπομονή της μαζί μου, οι γνώσεις της και οι συμβουλές της ήταν ιδιαίτερα σημαντικές για την υλοποίηση της μελέτης μου.

Οφείλω να ευχαριστήσω εκ βάθρων, την υποψήφια διδάκτορα κα Ναυσικά Πούλια για την πολύτιμη και έμπρακτη βοήθεια της καθ' όλη την διάρκεια της μεταπτυχιακής μου έρευνας.

Εκφράζω επίσης τις ευχαριστίες μου στον φοιτητή του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών κ. Αριστείδη Κοφινά, μέλος της ερευνητικής ομάδας της κας Μαρίας Κωνσταντή, για την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκειά μου στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας. Οι γνώσεις του και οι πολύτιμες πρακτικές συμβουλές του ήταν καθοριστικές και βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την κα Μαριάνθη Σωτηροπούλου, ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, για την εξαιρετική γραμματειακή υποστήριξη που μου προσέφερε και τον κ. Δημήτριο Γαλάρη, Καθηγητή Βιολογικής Χημείας, για την ευγενική χορηγία των κυτταρικών σειρών.

Τέλος, ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας για την άριστη συνεργασία και το ευχάριστο περιβάλλον κατά την παραμονή μου σε αυτό.

Ιωάννινα, 2018

Εισαγωγή

1.1 Ιστορική Αναδρομή

Ο καρκίνος περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Ιπποκράτη. Τον 2^ο αιώνα ο Γαληνός εισήγαγε την έννοια της νεοπλασίας, την όρισε ως την ανάπτυξη μιας περιοχής του σώματος αντίθετη προς την φύση (Olivera P.A., 2007). Οι πρώτες παρατηρήσεις ότι η έκθεση σε ορισμένες χημικές ουσίες σχετίζεται με την αυξημένη εμφάνιση καρκίνου έγιναν ανεξάρτητα από τους Άγγλους ιατρούς J. Hill (1761) και P. Pott (1775). Ο πρώτος παρατήρησε μια αύξηση στην συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του ρινικού βλεννογόνου σε καπνιστές, ενώ ο δεύτερος παρατήρησε την εμφάνιση καρκίνου της κύστης του οσχέου σε καθαριστές καπνοδόχων του Λονδίνου. Ως συνέπεια, ο P. Pott ανέφερε την επανειλημμένη έκθεση σε προϊόντα αιθάλης (Hayes R.B., 1995). Μέχρι το τέλος του 19^{ου} αιώνα είχε γίνει φανερό ότι η περιοδική έκθεση σε ορισμένες χημικές ουσίες ή μίγματα χημικών ουσιών έχει καρκινογόνο δράση (Luch A., 2005). Το 1918 οι Ιάπωνες Yamagiwa και Ichikawa απέδειξαν ότι η τοπική εφαρμογή της λιθανθρακόπισσας στο δέρμα κονίκλων ανέπτυξε καρκινώματα του δέρματος. Οι ερευνητές δίκαια θεωρούνται πρωτοπόροι καθώς οι παρατηρήσεις αυτές άνοιξαν τον δρόμο για την μελέτη της χημικής καρκινογένεσης (Olivera P.A., 2007). Το 1930 απομονώθηκε η πρώτη καρκινογόνος ουσία, ένας πολυκυκλικός αρωματικός υδρογονάνθρακας, το βενζο[α]πυρένιο, προϊόν εσωτερικής καύσης λιθανθράκων. Η θεώρηση ότι ο καρκίνος συνοδεύεται από μεταλλάξεις (αλλοιώσεις στο γενετικό υλικό), οι οποίες λαμβάνουν μέρος στα σωματικά κύτταρα εισήχθη από τον Boveri T. το 1914. Στις αρχές τις δεκαετίας του 1950 το ζεύγος Miller παρατήρησε πως μια μεγάλη ποικιλία χημικών τοξικών ουσιών ανέπτυξε καρκίνο στα πειραματόζωα. Επιπλέον, διευκρίνισαν ότι τέτοιες ουσίες μεταβολίζονται και μετασχηματίζονται σε ενδιάμεσες ενεργές μορφές (ηλεκτρονιόφιλα) που αντιδρούν με πυρηνόφιλες ομάδες σε μόρια πρωτεϊνών, RNA και DNA (Luch A., 2005, Olivera P.A., 2007).

Στην εποχή πριν τους Watson και Crick οι καρκίνοι που παράγονταν από χημικά καρκινογόνα πιστεύεται ότι οφειλόταν σε αλληλεπίδραση χημικών ουσιών με πρωτεΐνες σε ειδικούς ιστούς. Μέχρι το τέλος της δεκαετίας του 1960 υπήρχαν αυξημένες ενδείξεις της αλληλεπίδρασης του DNA με συγκεκριμένα χημικά καρκινογόνα. Οι καρκινογόνες χημικές ουσίες που δρουν επί του DNA ονομάζονται γενοτοξικές ενώ τονίζεται πως υπάρχουν και χημικές ουσίες που δρουν επιγενετικά (μη γενοτοξικές), προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Olivera P.A., 2007).

1.2 Καρκίνος και Χημική Καρκινογένεση

Με τον όρο χημική καρκινογένεση εννοούμε την ανάπτυξη-γένεση καρκίνου ως αποτέλεσμα δράσης χημικών ουσιών επί ανώτερων οργανισμών. Τα χημικά καρκινογόνα ανήκουν στους εξωγενείς τοξικούς παράγοντες που ονομάζονται ξενοβιοτικά (Luch A., 2005). Τα χημικά καρκινογόνα συγκριτικά με τις υπόλοιπες τοξικές ουσίες παρουσιάζουν κάποιες ιδιαιτερότητες: (1) Η δράση τους είναι συνεχής, αθροιστική και επίμονη, (2) Τα αποτελέσματα γίνονται ορατά μακροπρόθεσμα, (3) Μικρές δόσεις τοξικών χημικών ουσιών και σε τακτά διαστήματα είναι περισσότερο επιβλαβείς από μια μεγάλη δόση, (4) Παρουσιάζουν ιδιόρρυθμους μηχανισμούς δράσης επί των κυττάρων. Αυτά τα χαρακτηριστικά, εντάσσουν τα χημικά καρκινογόνα στην κατηγορία των χημικών τοξικών ουσιών που προκαλούν χρόνια τοξικότητα σε χαμηλές και επαναλήψιμες δόσεις (Tsiftoglou A., 1997).

Σήμερα, ο καρκίνος αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου μετά τις καρδιοαγγειακές παθήσεις. Ως καρκίνος (νεοπλασία ή κακοήθης ανάπτυξη) αναφέρεται μια ομάδα νόσων, που χαρακτηρίζονται από ανωμαλίες στους μηχανισμούς ελέγχου της κυτταρικής αναπαραγωγής και διαφοροποίησης, με δυναμικό να εισβάλουν ή να εξαπλώνονται σε άλλα μέρη του σώματος (Tsiftoglou A., 1997). Δεν είναι όλοι οι όγκοι κακοήθεις, υπάρχουν και καλοήθεις όγκοι, οι οποίοι δεν κατέχουν την ιδιότητα να εξαπλώνονται σε άλλους ιστούς του σώματος. Πιθανά σημεία και συμπτώματα των καρκίνων περιλαμβάνουν εξογκώματα στο σώμα, ανώμαλες αιμορραγίες, παρατεταμένο βήχα, ανεξήγητη απώλεια βάρους και αλλαγές στην κινητικότητα του εντέρου. Ενώ, αυτά τα συμπτώματα μπορεί να υποδεικνύουν την ύπαρξη καρκίνου σε ένα άτομο, μπορεί ωστόσο να έχουν και άλλες αιτίες. Έχουν αναφερθεί πάνω από 100 διαφορετικά είδη καρκίνων που προσβάλλουν τον άνθρωπο (Luch A., 2005).

Το κάπνισμα και η εισπνοή του καπνού οφείλεται για το 22% των θανάτων από καρκίνο. Άλλο ένα 10% οφείλεται στη παχυσαρκία, την κακή διατροφή, την έλλειψη σωματικής άσκησης και την κατανάλωση αλκοόλ. Επίσης, περίπου το 5-10% των καρκίνων οφείλονται στις κληρονομούμενες γενετικές ανωμαλίες από τους γονείς. Άλλοι παράγοντες περιλαμβάνουν, ορισμένες λοιμώξεις, την έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία και περιβαλλοντικούς ρύπους. Στον Αναπτυσσόμενο Κόσμο σχεδόν το 20% των καρκίνων οφείλονται σε λοιμώξεις όπως η ηπατίτιδα Β, η ηπατίτιδα C και στον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Human Papilloma Virus, HPV). Οι παραπάνω παράγοντες δρουν, τουλάχιστον εν μέρει, αλλάζοντας τα γονίδια των φυσιολογικών

κυττάρων μετατρέποντάς τα σε καρκινικά κύτταρα. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό γονίδια που ρυθμίζουν την αύξηση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων πρέπει να τροποποιηθούν (Croce C.M., 2008).

Τα γονίδια κατατάσσονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: (1) Τα ογκογονίδια, τα οποία προάγουν την ανάπτυξη των κυττάρων και την αναπαραγωγή, (2) Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, που είναι γονίδια που αναστέλλουν την κυτταρική διαίρεση και την επιβίωση (Knudson A.G., 2001). Ενεργοποίηση και υπερέκφραση των ογκογονιδίων μέσω μεταλλάξεων ή δημιουργία νέων ογκογονιδίων από λάθη, που συμβαίνουν στην διαίρεση των κυττάρων, όπως επίσης απενεργοποίηση ή υποέκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση καρκίνου. Συνήθως, απαιτούνται μεταβολές σε πολλαπλά τέτοια γονίδια προκειμένου να μετατραπεί ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό κύτταρο (Knudson A.G., 2001, Cooper W.A., 2013).

Η κλασική γενετική άποψη του καρκίνου είναι, ότι περιλαμβάνει ένα σύνολο νόσων που οδηγούν σε προοδευτικές γενετικές ανωμαλίες που περιλαμβάνουν μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια και ογκογονίδια καθώς και χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Ωστόσο, αργότερα επισημάνθηκε ότι σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση καρκίνου κατέχουν και οι επιγενετικές αλλαγές (Baylin S.B., 2006). Ως επιγενετικές αλλαγές ορίζονται οι τροποποιήσεις του γονιδιώματος, οι οποίες δεν αλλάζουν την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων. Παραδείγματα αυτών αποτελούν οι αλλαγές στην μεθυλίωση του DNA (υπερμεθυλίωση και υπομεθυλίωση), οι τροποποιήσεις των ιστονών και οι αλλαγές στη χρωμοσωμική αρχιτεκτονική (Kanwal R., 2012). Κάθε μία από αυτές τις μεταβολές ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου χωρίς να μεταβάλλεται η υποκείμενη αλληλουχία του DNA. Οι αλλαγές αυτές μπορούν να παραμείνουν μετά από κυτταρικές διαιρέσεις, να διατηρηθούν για πολλές γενιές και γι' αυτό τον λόγο μπορεί να θεωρηθούν ως «επιγενετικές μεταλλάξεις» (ισοδύναμες με μεταλλάξεις) (Jacinto F.V., 2007). Επιγενετικές αλλαγές που προκύπτουν στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (DNA repair genes), προκαλούν μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA και με αυτόν τον τρόπο κατέχουν ιδιαίτερη σημασία στην εμφάνιση καρκίνου. Τέτοιες μεταβολές πιστεύεται ότι εμφανίζονται νωρίς στην εξέλιξη του καρκίνου και μπορεί να είναι μια πιθανή αιτία της χαρακτηριστικής γενετικής αστάθειας που χαρακτηρίζει όλους τους καρκίνους (Lahtz C., 2011).

Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια που επηρεάζει σχεδόν κάθε τέταρτο άτομο κατά την διάρκεια της ζωής του (Tsiftoglou A., 1997). Η διαδικασία ανάπτυξης καρκίνου από χημικές ουσίες και γενικά η ανάπτυξη καρκίνου αποτελεί μια διαδικασία που

χαρακτηρίζεται από διάφορα στάδια. Πρώτο στάδιο αποτελεί η έναρξη της νεοπλασίας (initiation) και η προαγωγή (promotion) του νεοπλάσματος. Το επόμενο στάδιο είναι η αύξηση των κυττάρων του όγκου (progression) και ακολουθεί η αγγειογένεση (angiogenesis) ώστε ο όγκος να τροφοδοτείται με τις επαρκείς και αναγκαίες ποσότητες θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου. Τελικό στάδιο αποτελεί η μετάσταση (metastasis) των κυττάρων του όγκου σε απομακρυσμένα όργανα και ιστούς του σώματος (Foulds L., 1954, Grisham J.W., 1984, Cohen S.M., 1991, Mehta R., 1995, Hasegawa R., 1998).

Η αυξημένη εμφάνιση καρκίνου στην σημερινή εποχή οφείλεται κυρίως στην έκθεση των ανθρώπων στο μολυσμένο περιβάλλον των αστικών κέντρων και βιομηχανικών περιοχών, όπου επικρατούν οι χημικές καρκινογόνες ουσίες. Σημαντικό παράγοντα αποτελεί και ο σημερινός τρόπος ζωής, καθώς σε χημικές καρκινογόνες ουσίες εκτίθεται ο άνθρωπος πολλάκις και με την τροφή (Lubin J.H., 1984, Peto R., 1996) ή ακόμα και με το κάπνισμα (Fulgoni V.L., 1998).

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο, όχι μόνο στις Η.Π.Α. αλλά σε όλον τον κόσμο. Το κάπνισμα είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. Μεταξύ των πολλών συστατικών που περιέχει ο καπνός τσιγάρου είναι οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) (Hecht S.S., 1993) και οι N-νιτροζαμίνες (N-Nitrosamines) (Walker S., 2008). Οι ουσίες αυτές έχουν ενοχοποιηθεί ως οι κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες για την ανάπτυξη καρκίνου.

1.3 Καρκίνος του Πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι επίσης γνωστός ως καρκίνωμα του πνεύμονα. Είναι ένας κακοήθης όγκος που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των κυττάρων στους ιστούς του πνεύμονα. Όπως συμβαίνει με πολλούς άλλους καρκίνους, ο καρκίνος του πνεύμονα αρχίζει με την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων ή την αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Cooper W.A., 2013). Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την αγγειογένεση και την ανάπτυξη όγκων. Οι μεταλλάξεις και η ενίσχυση του γονιδίου EGFR είναι από τις συχνότερες αλλαγές στον καρκίνο του πνεύμονα και παρέχουν την βάση για την χρήση φαρμάκων που δρουν ως αναστολείς του EGFR (Herbst R.S., 2008). Επιπλέον,

επιγενετικές μεταβολές όπως μεταβολές στην μεθυλίωση του DNA, τροποποιήσεις στις ουρές των ιστονών, ή ρύθμιση του miRNA (microRNA) μπορούν να οδηγήσουν σε απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Jakorovic M., 2013). Οι περισσότεροι καρκίνοι που ξεκινούν στον πνεύμονα, γνωστοί ως πρωτογενείς καρκίνοι του πνεύμονα, είναι καρκινώματα που προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα. Εάν αφηθεί χωρίς θεραπεία, με την αύξησή του μπορεί να εξαπλωθεί πέραν του πνεύμονα, με την διαδικασία της μετάστασης, σε κοντινό ιστό ή και σε άλλα απομακρυσμένα μέρη του σώματος (Falk S., 2000). Τα πιο κοινά συμπτώματα είναι βήχας (συμπεριλαμβανομένου και του βήχα με αίμα), απώλεια βάρους, δύσπνοια και πόνος στο στήθος (Horn L., 2015).

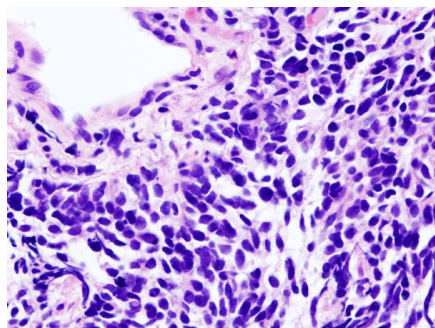
Παγκοσμίως, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η πιο κοινή μορφή καρκίνου στους άνδρες όσον αφορά την εμφάνιση αλλά και την θνησιμότητα. Μεταξύ των γυναικών έχει την τρίτη υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης και είναι ο δεύτερος μετά τον καρκίνο του μαστού σε θνησιμότητα. Τα υψηλότερα ποσοστά είναι στη Βόρεια Αμερική, την Ευρώπη και την Ανατολική Ασία, με πάνω από το ένα τρίτο των νέων περιπτώσεων το 2012 να εμφανίζεται στην Κίνα. Το τμήμα του πληθυσμού που είναι πιθανότερο να αναπτύξει καρκίνο του πνεύμονα είναι τα άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών, οι οποίοι έχουν ιστορικό καπνίσματος (World Cancer Report, 2014). Αξιοσημείωτο είναι, πως ο καρκίνος του πνεύμονα ήταν ασυνήθιστος πριν από την έλευση του καπνίσματος και δεν είχε ακόμη αναγνωριστεί ως ξεχωριστή ασθένεια μέχρι το 1761 (Horn L., 2015).

Η συντριπτική πλειοψηφία, περίπου το 85%, των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα οφείλεται σε μακροχρόνια έκθεση στον καπνό του τσιγάρου (Falk S., 2000). Το κάπνισμα, ιδιαίτερα των τσιγάρων, είναι μακράν το κύριο αίτιο για την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα (Biesalski H.K., 1998). Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει τουλάχιστον εβδομήντα τρεις (73) γνωστούς καρκινογόνους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του βενζο[α]πυρενίου καθώς και της N-νιτροζαμίνης NNK (Hecht S.S., 2012). Στον Ανεπτυγμένο Κόσμο, στους άνδρες το 90% των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα κατά τη διάρκεια του έτους 2000, αποδόθηκαν στο κάπνισμα, ενώ για τις γυναίκες το 70% (Peto R., 2006).

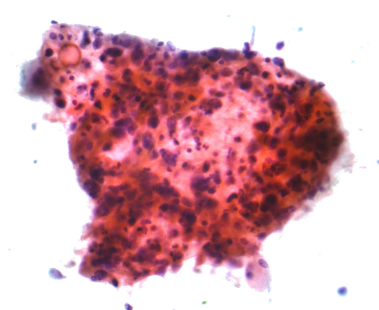
Περίπου το 10-15% των περιπτώσεων συμβαίνουν σε άτομα που δεν έχουν καπνίσει ποτέ (Thun M.J., 2008). Οι περιπτώσεις αυτές οφείλονται σε συνδυασμό γενετικών και άλλων παραγόντων, όπως την έκθεση στο αέριο ραδόνιο, σε αμιάντο, ή άλλες μορφές ρύπανσης του αέρα, συμπεριλαμβανομένου του παθητικού καπνίσματος (Alberg A.J., 2010). Η ρύπανση του αέρα στα αστικά κέντρα έχει μικρή αλλά

σημαντική επίδραση στην αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα. Εκτιμάται ότι αντιπροσωπεύει το 1-2% των καρκίνων του πνεύμονα (Alberg A.J., 2010).

Οι καρκίνοι του πνεύμονα ταξινομούνται σύμφωνα με τον ιστολογικό τους τύπο (Lu C., 2010). Η ταξινόμηση αυτή είναι σημαντική για τον προσδιορισμό του τρόπου διαχείρισης και πρόβλεψης της πορείας της νόσου. Οι καρκίνοι του πνεύμονα είναι κακοήθεις-καρκινώματα που προκύπτουν από επιθηλιακά κύτταρα. Τα καρκινώματα του πνεύμονα ταξινομούνται κάτω από το μικροσκόπιο με βάση το μέγεθος και την εμφάνιση των κακοήθων κυττάρων με την βοήθεια του ιστοπαθολόγου. Για θεραπευτικούς σκοπούς, δύο ευρείες κατηγορίες διακρίνονται: το **μικρό κυτταρικό καρκίνωμα** του πνεύμονα (small-cell lung carcinoma, SCLC) και το **μη-μικρό κυτταρικό καρκίνωμα** του πνεύμονα (non-small-cell lung carcinoma, NSCLC) (Kumar V., 2013).



Εικόνα 1.1: Μικρογραφία καρκινικού τύπου SCLC, μικροσκοπική όψη. (πηγή: cancernetwork.com)



Εικόνα 1.2: Μικρογραφία καρκινικού τύπου NSCLC, καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων. (πηγή: cancernetwork.com)

Οι τρεις κύριοι υπότυποι του NSCLC είναι το: αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma), το καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων (squamous-cell carcinoma) και το καρκίνωμα μεγάλων κυττάρων (large cell carcinoma) (Horn L., 2015). Σχεδόν το 40% των καρκίνων του πνεύμονα είναι αδενοκαρκινώματα, τα οποία προέρχονται συνήθως από περιφερειακό ιστό του πνεύμονα. Οι περισσότερες περιπτώσεις του αδενοκαρκινώματος σχετίζονται με το κάπνισμα. Είναι επίσης η πιο κοινή μορφή καρκίνου του πνεύμονα μεταξύ των ατόμων που έχουν καπνίσει λιγότερα από 100 τσιγάρα κατά την διάρκεια της ζωής τους («μη καπνιστές») (Lu C., 2010). Το καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων αποτελεί περίπου το 30% των καρκίνων του πνεύμονα και συνήθως συμβαίνει κοντά σε μεγάλους αεραγωγούς. Το 9% των καρκίνων του

πνεύμονα είναι καρκινώματα μεγάλων κυττάρων. Ονομάζονται έτσι επειδή τα καρκινικά κύτταρα είναι μεγάλα, με περίσσεια κυτταροπλάσματος, μεγάλους πυρήνες και εμφανές πυρήνιο (Lu C., 2010). Στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC), τα κύτταρα περιέχουν πυκνούς νευροεκκριτικούς κόκκους (κυστίδια που περιέχουν νευροενδοκρινείς ορμόνες). Οι περισσότερες περιπτώσεις προκύπτουν στους μεγαλύτερους αεραγωγούς (Rosti G., 2006).

Σήμερα, οι πιο κοινές θεραπείες για την αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα περιλαμβάνουν την χειρουργική επέμβαση, την χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία (Horn L., 2015).

1.4 Διάκριση Χημικών Καρκινογόνων Ουσιών

Όπως διαπιστώθηκε από τον καπνό του τσιγάρου, υπάρχουν πληθώρα χημικές καρκινογόνες ουσίες, οι οποίες για λόγους διευκόλυνσης κατατάσσονται σε ομάδες. Η διάκριση των χημικών καρκινογόνων ουσιών γίνεται σε τρεις κυρίως ομάδες, ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης (Tsiftoglou A., 1997):

Τα γενοτοξικά, εμφανίζουν δράση επί του DNA και μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις. Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, οι N-νιτροζαμίνες, η αλφατοξίνη και άλλα.

Τα μη γενοτοξικά ή επιγενετικά, η νεοπλασματική δράση οφείλεται σε ανωμαλίες της γονιδιακής έκφρασης-ρύθμισης σε σωματικά κύτταρα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι φορβολοεστέρες και η αζαθειοπρίνη.

Τα μη ταξινομημένα, ουσίες που δεν ανήκουν σε μια από τις παραπάνω κατηγορίες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν διάφορες ενώσεις αρσενικού.

Στην συνέχεια θα επικεντρωθούμε σε μερικές από τις χημικές καρκινογόνες ουσίες που απαντώνται στον καπνό του τσιγάρου και δρουν γενοτοξικά, δηλαδή δρουν επί του DNA. Μεταξύ των πολλών συστατικών που περιέχει ο καπνός του τσιγάρου, είναι οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Hecht S.S., 1993) και οι N-νιτροζαμίνες (Walker S., 2008), που ευθύνονται κυρίως για την εμφάνιση καρκίνου.

1.4.1 Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) είναι οργανικές ενώσεις που αποτελούνται από πολλαπλούς

αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι μπορούν να φέρουν επίσης υποκαταστάτες. Είναι πανταχού παρόντες στο περιβάλλον και συνεπώς η έκθεση του ανθρώπου σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες είναι αναπόφευκτη. Προκύπτουν από την ατελή καύση ή πυρόλυση οργανικών ενώσεων. Όπως προαναφέρθηκε, πιστεύεται ότι συμβάλλουν σημαντικά στην εμφάνιση καρκίνων στον άνθρωπο. Βρίσκονται κυρίως στα ορυκτά καύσιμα (πετρέλαιο και λιγνίτη), στην πίσσα, τον καπνό τσιγάρων, παραπροϊόντα πετροχημικής βιομηχανίας, τα καυσαέρια καθώς και άλλες πηγές. Παρουσιάζουν αυξημένες συγκεντρώσεις στις βιομηχανικές περιοχές (Straif K., 2006). Επίσης, πολλές φορές βρίσκονται και στην τροφή (κρέατα ψημένα στα κάρβουνα), που αποτελεί και μια από τις πηγές έκθεσης ατόμων μη καπνιστών σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Phillips D.H., 1999). Οι μεταβολίτες διαφόρων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων που εντοπίζονται στα ούρα των ασθενών αποτελούν πολλές φορές βιοδείκτες για την έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες (Grimmer G., 1997).

Από μελέτες διαπιστώθηκε ότι, προκειμένου να δράσουν οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ) ως καρκινογόνα πρέπει να μετατραπούν σε ενδιάμεσους δραστικούς μεταβολίτες. Αυτή η μεταβολική ενεργοποίηση επιτυγχάνεται με την βοήθεια των ισοενζύμων του κυτοχρώματος P-450. Οι κύριες ομάδες των ισομορφών του κυτοχρώματος P-450 που συμμετέχουν στον μεταβολισμό είναι τα: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 και CYP3A4 (Shimada T., 1989 και Shimada T., 1996). Συνεπώς, αυτές οι χημικές ουσίες (ΠΑΥ) δρουν ως προ-καρκινογόνες. Πιο συγκεκριμένα, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες υφίστανται μεταβολική ενεργοποίηση προς εποξειδία διολών. Έτσι, καθίστανται ισχυρά ηλεκτρονιόφιλα μόρια, τα οποία μπορούν να αντιδράσουν και να σχηματίσουν ομοιοπολικό δεσμό με διάφορα πυρηνόφιλα μόρια (Sellakumar A., 1974).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα ηλεκτρονιόφιλων μορίων αποτελούν οι πρωτεΐνες, το RNA και το DNA. Ωστόσο, μόνο η σύνδεση των ενεργοποιημένων ενώσεων με το DNA θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για την καρκινογόνο δράση (Guengerich F.P., 2000). Η αλληλεπίδραση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων με το DNA δείχνει ότι δρουν γενετοξικά και ως εκ τούτου δρουν κατά την έναρξη της καρκινογένεσης (initiation), όπως αναφέρθηκε πριν. Τα παράγωγα DNA (DNA adducts) που σχηματίζονται από την δράση των ουσιών ΠΑΥ μπορεί να προκαλέσουν μόνιμες μεταλλάξεις, που μεταδίδονται στα νεοσχηματιζόμενα κύτταρα κατά την κυτταρική διαίρεση. Αν αυτές οι μεταλλάξεις εντοπίζονται σε κρίσιμες θέσεις

πάνω στο DNA, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται τα ογκογονίδια ή τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τότε μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό μετασχηματισμό και την ανάπτυξη όγκων (Straif K., 2006).

Στους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες συγκαταλέγονται διάφορες ουσίες, μερικές από τις οποίες είναι: το ανθρακένιο, το βενζο[α]πυρένιο, το βενζο[α]ανθρακένιο, το διβενζο[α,h]ανθρακένιο, το βενζο[b]φλουανθένιο και άλλες. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται μερικές χαρακτηριστικές ενώσεις που συμπεριλαμβάνονται στους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Nesnow S., 1995).

Πίνακας 1.1*: Αντιπροσωπευτικοί πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες

Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ)	
• Βενζο[α]πυρένιο (B[a]P)	• Βενζο[α]ανθρακένιο
• Ανθρακένιο	• Βενζο[b]φλουανθένιο
• Φαινανθρένιο	• Βενζο[c]φλουρένιο
• Χρυσένιο	• Διβενζο[α,h]ανθρακένιο
• Πυρένιο	• Διβενζο[α,e]πυρένιο
• Τετρακένιο	• 5-Μεθυλοχρυσένιο
• Οβαλένιο	• Διβενζο[α,i]πυρένιο
• Ναθφαλένιο	

*(Straif K. 2006, Nesnow S. 1995)

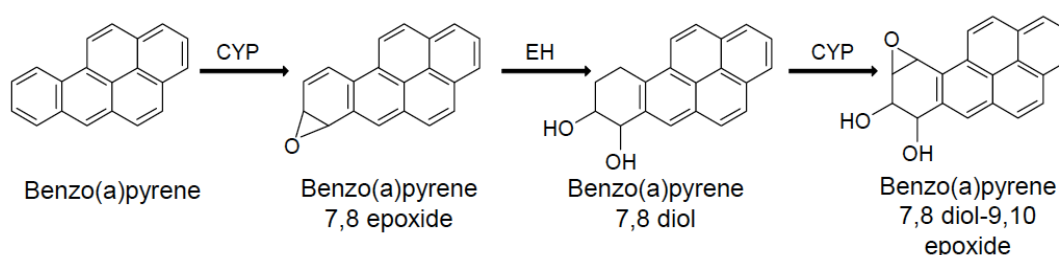
Το πιο γνωστό και ευρέως διερευνημένο είναι το βενζο[α]πυρένιο. Έχει ταυτοποιηθεί για την εμφάνιση όγκων σε πολλά είδη όπως μύες, επιμύες και κόνικλους (Straif K., 2006). Διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα καθώς βρίσκεται στον καπνό τσιγάρων. Ωστόσο, άλλες χημικές ουσίες που βρίσκονται στον καπνό σε μικρότερες συγκεντρώσεις εμφανίζουν ισχυρότερη καρκινική δράση. Σε αυτές ανήκουν το διβενζο[α,h]ανθρακένιο, το 5-μεθυλοχρυσένιο και το διβενζο[α,i]πυρένιο (Sellakumar A., 1974, Nesnow S., 1995).

1.4.1.1 Βενζο[α]πυρένιο

Σύμφωνα με την IARC (International Agency for Research on Cancer) υπάρχουν επαρκή στοιχεία που αποδεικνύουν ότι το βενζο[α]πυρένιο εμφανίζει καρκινογόνο δράση σε πειραματόζωα, με πιθανή εμφάνιση καρκινογόνου δράσης και στον άνθρωπο (ομάδα 2A, IARC 1983). Σήμερα, το βενζο[α]πυρένιο αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά

χημικά καρκινογόνα που δρουν γενετοξικά. Είναι ο κύριος πολυκυκλικός αρωματικός υδρογονάνθρακας (PAH) που απαντάται στον καπνό τσιγάρων και περιβαλλοντικών ρύπων, όπως η λιθανθρακόπισσας και τα καυσαέρια ντίζελ κινητήρων. Βρίσκεται σε αστικές και βιομηχανικές περιοχές με βαριά μολυσμένο αέρα, στο νερό και σε εκτενώς μαγειρεμένα και τηγανισμένα τρόφιμα (IARC, 1983, Hecht S.S., 1999).

Σήμερα, η ικανότητα του βενζο[α]πυρενίου να προκαλεί εμφάνιση όγκων μετά από τοπική χορήγηση ή εισπνοή είναι καλά τεκμηριωμένη (Hecht S.S., 1999). Το βενζο[α]πυρένιο υφίσταται μεταβολική ενεργοποίηση, όπως προαναφέρθηκε, και το τελικό καρκινογόνο προϊόν σχηματίζεται μέσω μιας διαδικασίας τριών σταδίων (Εικόνα 1.3). Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει τον σχηματισμό του (7,8)-εποξυ-7,8-διϋδροβενζο[α]πυρένιο που καταλύεται από τα μικροσωμιακά ένζυμα του κυτοχρώματος P-450 και ιδιαίτερα από τις ισομορφές της οικογένειας CYP1 (Ioannides C., 1993) και οδηγεί τελικά στον σχηματισμό του (7,8)-εποξειδίου του βενζο[α]πυρενίου. Το δεύτερο βήμα είναι η κατάλυση του σε (7,8)-διϋδροξυ-7,8-διϋδροβενζο[α]πυρένιο, από το ένζυμο εποξειδική υδρολάση (Epoxyde Hydrolase, EH). Τέλος, τα ένζυμα του κυτοχρώματος P-450 καταλύουν μια αντίδραση, που παράγει τέσσερα πιθανά ισομερή της 7,8-διόλης-9,10-εποξειδίου του βενζο[α]πυρενίου. Ποσοτικά, το πιο σημαντικό από τα ισομερή, που παράγονται είναι το (7R,8S)-διϋδροξύ (9S,10R)-εποξυ-7,8,9,10-τετραϋδροβενζο[α]πυρένιο, το οποίο θα συμβολίζεται στο εξής με BPDE, και είναι η τελική καρκινογόνος ουσία (Slaga T.J., 1979). Το BPDE είναι μια ισχυρά ηλεκτρονιόφιλη χημική ουσία που προσδένεται στο DNA σε κατάλοιπα γουανινών. Πιο συγκεκριμένα, προσδένεται στην N₇-θέση της γουανίνης στο DNA σχηματίζοντας παράγωγα DNA (Weinstein I.B., 1976).



Εικόνα 1.3: Απεικονίζεται το κύριο μεταβολικό μονοπάτι του βενζο[α]πυρενίου που οδηγεί στον σχηματισμό του τελικού καρκινογόνου (7,8)-διόλη-(9,10)-εποξειδίου του βενζο[α]πυρενίου (BPDE), CYP: ισοένζυμα κυτοχρώματος P-450, EH: εποξειδική υδρολάση.

Επιπλέον, το βενζο[α]πυρένιο λειτουργεί ως προσδέτης του υποδοχέα άρυλ-υδρογονανθράκων (Aryl Hydrocarbon Receptor, AhR) και συνεπώς ως ένας επαγωγέας των ενζύμων του κυτοχρώματος P-450, συγκεκριμένα της οικογένειας CYP1. Ο διπλός ρόλος του B[a]P ως επαγωγέας των CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 αλλά και ως υπόστρωμα (προ-καρκινογόνος ουσία) των κυτοχρωμάτων, το καθιστά πολύ σημαντικό καρκινογόνο, καθώς έχει την ικανότητα η ίδια ουσία να ενισχύει τον μεταβολισμό της σε δραστικό καρκινογόνο (Pelkonen O., 1982).

1.4.2 N-Νιτροζαμίνες

Οι νιτρόζο-ενώσεις και οι N-νιτροζαμίνες αποτελούν μια άλλη ομάδα χημικών καρκινογόνων που βρίσκονται σε ορισμένα είδη τροφίμων, στο πόσιμο νερό και στον καπνό των τσιγάρων (Hecht S.S., 1999). Οι εξωγενείς σχηματιζόμενες N-νιτροζαμίνες βρίσκονται κυρίως σε αλλαντικά, καπνιστά τρόφιμα και τρόφιμα επεξεργασμένα με συντηρητικά (νιτρικά και νιτρώδη άλατα) (Tricker A.R., 1991). Επιδημιολογικές μελέτες καταδεικνύουν μια στενή σχέση ανάμεσα στην ανάπτυξη καρκίνου του γαστρεντερικού συστήματος και τροφών πλούσιων σε νιτρικά που συχνά καταναλώνονται σε χώρες της Ανατολικής Ασίας (Hotchkiss J.H., 1989).

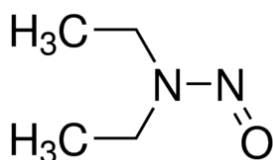
Οι περισσότερες N-νιτροζαμίνες σχηματίζονται ενδογενώς στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα νιτρικά και νιτρώδη άλατα που λαμβάνονται με την τροφή μετασχηματίζονται με την βοήθεια του μικροβιακού φορτίου του στομάχου σε νιτρόζο-ενώσεις. Επίσης, σε χώρες του Τρίτου Κόσμου μετατρέπονται σε νιτρόζο-ενώσεις, λόγω της μη ικανοποιητικής συντήρησης των τροφίμων σε χαμηλές θερμοκρασίες (Jakszyn P., 2006). Έχει αναφερθεί ότι αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως για παράδειγμα το ασκορβικό οξύ, πιο γνωστό με το όνομα βιταμίνη C, εμποδίζουν την οξείδωση των νιτρικών αλάτων προς νιτρόζο-ενώσεις (Mirvish S.S., 1975, Tannenbaum S.R., 1991). Στη συνέχεια, οι νιτρόζο-ενώσεις υφίστανται μεταβολική ενεργοποίηση από τις διάφορες ισομορφές των ενζύμων του κυτοχρώματος P-450 και μετασχηματίζονται σε N-νιτροζαμίνες. Οι N-νιτροζαμίνες σχηματίζουν τελικά ηλεκτρονιόφιλα προϊόντα, τα οποία αλκυλιώνουν το DNA και με αυτόν τον τρόπο επάγουν την καρκινογένεση (Tsiftoglou A., 1997).

Πίνακας 1.2*: Αντιπροσωπευτικές N-Νιτροζαμίνες

N-Νιτροζαμίνες	
• N-νιτροζονορνικωτίνη (NNN)	• α-υδροξυ-4-(μεθυλονιτροζαμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόλη (NNAL)
• 4-(μεθυλονιτροζαμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόνη (NNK)	• N-νιτροζοαναβασίνη (NAB)
• N-νιτροζοδιμεθυλαμίνη (DMN)	• N-νιτροζοαναταβίνη (NAT)
• N-νιτροζοδιαιθυλαμίνη (DEN)	

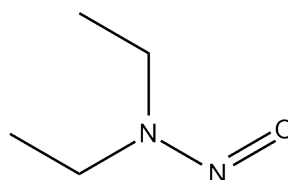
*(Hecht S.S., 2003)

Έχει αποδειχθεί με πειραματόζωα ότι η διαιθυλονιτροζαμίνη (DEN) είναι ένα αποτελεσματικό καρκινογόνο του πνεύμονα (International Agency for Research on Cancer, IARC). Μια άλλη N-νιτροζαμίνη που απαντάται ειδικά στον καπνό του τσιγάρου είναι η 4-(μεθυλονιτροζαμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόνη και στην συνέχεια θα συμβολίζεται ως NNK (Hecht S.S., 2003).



Εικόνα 1.4: Χημική δομή διμεθυλνιτροζαμίνης

(πηγή: sigmaaldrich.com)



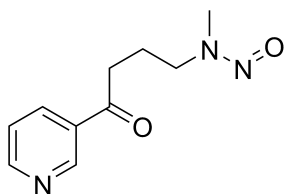
Εικόνα 1.5 : Χημική δομή διαιθυλονιτροζαμίνης

(πηγή: sigmaaldrich.com)

1.4.2.1 Η N-νιτροζαμίνη NNK

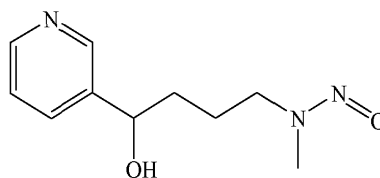
Η N-νιτροζαμίνη NNK είναι μια από τις πιο γνωστές N-νιτροζαμίνες που απαντάται στον καπνό του τσιγάρου και έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα (Hecht S.S., 2003). Είναι ένα ισχυρό καρκινογόνο το οποίο προκαλεί την εμφάνιση καρκίνου σε πολλά τρωκτικά όπως μύες, επίμυες και χάμστερ, αλλά και στον άνθρωπο (Hecht S.S., 1998). Η NNK είναι μία ένωση που φυσιολογικά συντίθεται στα φύλλα καπνού που εκτίθενται στο φώς: ο δακτύλιος πυρρολιδίνης στην νικοτίνη ανοίγει και τελικά η νικοτίνη μετατρέπεται σε

NNK. Η NNK μετατρέπεται από τα κυτοχρώματα του P-450 στην δραστική καρκινογόνο της μορφή, την α-υδροξυ-4-(μεθυλονιτροζαμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόλη, που συνοπτικά γράφεται NNAL (Akopyan G., 2006).



Εικόνα 1.6: Χημική δομή NNK

(πηγή: sigmaaldrich.com)



Εικόνα 1.7: Χημική δομή NNAL

(πηγή: sigmaaldrich.com)

1.5 Μεταβολισμός Ξενοβιοτικών Ουσιών

Ουσίες του φυσικού περιβάλλοντος του ανθρώπου, που είναι ξένες προς τον ενδιαμέσο μεταβολισμό και δεν ενσωματώνονται στον μεταβολισμό του κυττάρου για παραγωγή ενέργειας, αναφέρονται με τον όρο «ξενοβιοτικά» (Theocharidis T.K., 1997). Παραδείγματα ξενοβιοτικών ουσιών αποτελούν τα φάρμακα, οι καρκινογόνες ουσίες, τα εντομοκτόνα, τα φυτοκτόνα, τα ζιζανιοκτόνα, τα συντηρητικά τροφών, οι χρωστικές ουσίες και οι περιβαλλοντικοί ρύποι (Guengerich F.P., 2001).

Ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών, στον οποίο εκτίθενται καθημερινά ζώα και άνθρωποι, αποτελεί μια από τις σημαντικότερες διαδικασίες. Οι λιπόφιλες τοξικές ουσίες, στις οποίες ανήκουν και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, απορροφούνται εύκολα από το δέρμα, τους πνεύμονες καθώς και το γαστρεντερικό σύστημα (ΓΕΣ). Η συνεχής και επαναλαμβανόμενη έκθεση των ανώτερων οργανισμών στις τοξικές αυτές ουσίες θα είχε ως αποτέλεσμα την χρόνια συσσώρευση και την εμφάνιση υψηλής τοξικότητας. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος οι ανώτεροι οργανισμοί έχουν προοδευτικά αναπτύξει μηχανισμούς για να μεταβολίζουν και να αποβάλλουν τις τοξικές χημικές ουσίες σε μεγάλο βαθμό, ανεξαρτήτως αν οι περισσότερες από αυτές είναι σημαντικά λιπόφιλες και εμφανίζουν μεγάλο όγκο κατανομής (Richardson M., 1996).

Οι διάφορες βιοχημικές διαδικασίες, που έχουν αναπτύξει οι οργανισμοί για την μετατροπή των λιπόφιλων τοξικών ουσιών σε υδρόφιλους μεταβολίτες, ορίζεται ως ο μεταβολισμός ή αλλιώς βιομετασχηματισμός των ξένων προς τον οργανισμό ουσιών, δηλαδή τοξικών ουσιών αλλά και φαρμάκων. Συνεπώς, μια τοξική ουσία ή ένα φάρμακο μπορούν να υποστούν κατά τον μεταβολισμό πολλαπλές δομικές μεταβολές στο χημικό τους μόριο. Αυτές διεκπεραιώνονται με τη βοήθεια διαφόρων μεταβολικών ενζύμων των ξενοβιοτικών (Gonzalez F.J., 2006). Στις περισσότερες περιπτώσεις τα προϊόντα μεταβολισμού, δηλαδή οι μεταβολίτες που σχηματίζονται, είναι περισσότερο υδατόφιλοι από τις αρχικές ενώσεις. Αυτό συμβάλλει και διευκολύνει την απέκκριση των ουσιών από τον ανθρώπινο οργανισμό μέσω των ούρων και της χολής (Murphy P.J., 2001).

Επισημαίνεται ότι, αν μια τοξική χημική ουσία θα μεταβολιστεί ή όχι εξαρτάται από τις φυσικοχημικές της ιδιότητες. Έτσι για παράδειγμα πτητικές οργανικές χημικές ουσίες απομακρύνονται μέσω της εκπνοής από τους πνεύμονες χωρίς να απαιτείται μεταβολισμός (Richardson M., 1996). Ο μεταβολισμός διακρίνεται σε τρεις φάσεις:

Μεταβολική φάση I: Ο μεταβολισμός των χημικών τοξικών ουσιών καθώς και των διαφόρων φαρμακευτικών ενώσεων διεκπεραιώνεται σε δύο φάσεις με την βοήθεια ειδικών ενζύμων μεταβολισμού. Η πρώτη φάση, συμβολίζεται με φάση I, περιλαμβάνει αντιδράσεις οξειδωσης, αναγωγής και υδρόλυσης. Από αυτές, οι αντιδράσεις οξειδωσης αποτελούν την κυριότερη ομάδα. Στην φάση I τα ξενοβιοτικά μεταβολίζονται σε προϊόντα με μεγαλύτερη υδροφιλικότητα με την προσθήκη ή απελευθέρωση λειτουργικών πολικών-υδρόφιλων ομάδων στο αρχικό μόριο. Στις λειτουργικές πολικές ομάδες συμπεριλαμβάνονται: -OH, -COOH, -NH₂, -SH, που επιτρέπουν στην συνέχεια την σύζευξη με διάφορα ενδογενή υδατόφιλα μόρια. Η σύζευξη των ομάδων αυτών με τα ενδογενή υδατόφιλα μόρια αποτελεί την δεύτερη φάση του μεταβολισμού (φάση II) (Testa B., 2006).

Ο μεταβολισμός στους ανώτερους οργανισμούς τις περισσότερες περιπτώσεις έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή των ενεργών χημικών τοξικών ουσιών σε ανενεργές μορφές ή την μετατροπή χημικών μορίων σε περισσότερο υδρόφιλους μεταβολίτες για την διευκόλυνση της αποβολής από τον οργανισμό. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως, ο μεταβολισμός της φάσης I δεν οδηγεί σε ανενεργούς μεταβολίτες αλλά αντίθετα σε ενεργά ενδιάμεσα προϊόντα. Έτσι, μπορεί μια φαρμακευτική χημική ουσία που είναι προφάρμακο (αδρανής ουσία), αφού υποστεί μεταβολισμό να σχηματίσει την δραστική μορφή του φαρμάκου που εμφανίζει τα θεραπευτικά αποτελέσματα (π.χ. το

αντικαρκινικό κυκλοφωσφαμίδη) (Theocharidis T.K., 1997). Επίσης, μια χημική ουσία που δεν εμφανίζει τοξικές ή καρκινογόνες δράσεις μπορεί να μετατραπεί σε ουσία με καρκινογόνο δράση με την βοήθεια του μεταβολισμού. Σε αυτή την περίπτωση η αρχική ένωση ονομάζεται προ-καρκινογόνος. Ο δε σχηματισμός τέτοιων ενεργών ενδιάμεσων προϊόντων που προέρχονται από τον μεταβολισμό χημικών ουσιών χαρακτηρίζεται ως βιοενεργοποίηση. Αυτό συμβαίνει επειδή τα ενδιάμεσα προϊόντα είναι σαφώς περισσότερο δραστικά από τις μητρικές ενώσεις. Στην περίπτωση των τοξικών χημικών ουσιών και των προ-καρκινογόνων, τα ενεργά προϊόντα μεταβολισμού μπορούν να αλληλεπιδράσουν με πυρηνόφιλες ομάδες (-SH, -OH, -NH₂), που ευρίσκονται σε διάφορα μακρομόρια (DNA, RNA, πρωτεΐνες), με τελικό σκοπό τον σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών. Τα ενεργά ενδιάμεσα προϊόντα απομακρύνονται στην προσπάθεια αποτοξίνωσης του οργανισμού σε σημαντικό ποσοστό. Όταν η συγκέντρωση αυτών των ενεργών ενδιάμεσων προϊόντων είναι υψηλή και σαφώς μεγαλύτερη εκείνης που ο οργανισμός μπορεί να απομακρύνει, δημιουργείται μια ανισορροπία που τελικά οδηγεί σε βλάβη και καταστροφή των κυττάρων (Tsiftoglou A., 1997, Ioannides C., 2001).

Τα συστήματα ενζύμων που συμβάλλουν στον μεταβολισμό των διαφόρων τοξικών ουσιών εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς το ήπαρ είναι το πρώτο όργανο από το οποίο διέρχονται οι ουσίες που απορροφούνται από το ΓΕΣ προτού εισέλθουν στο πλάσμα του αίματος και κατανεμηθούν στους διάφορους ιστούς. Ωστόσο, μεταβολισμός λαμβάνει μέρος και σε άλλους ιστούς σε περιορισμένη κλίμακα (πνεύμονες, γαστρεντερικό, καρδιά, νεφροί, δέρμα κ.λ.π.) Τα ένζυμα μεταβολισμού, που ανήκουν στην φάση I επιφέρουν ουσιαστικά δομικές μεταβολές και εντοπίζονται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο (Endoplasmic Reticulum, ER), συνδεδεμένα στο εσωτερικό των μεμβρανών. Βρίσκονται μέσα σε λιπόφιλες περιοχές στις οποίες εισέρχονται εύκολα οι λιπόφιλες τοξικές ουσίες. Στην παρασκευή του μικροσωμιακού κλάσματος με φυγοκέντρηση του κυτταροπλάσματος των σωματικών κυττάρων, τα μικροσωμάτια παραλαμβάνονται ως ίζημα ενώ το υπερκείμενο διαλυτό κυτοσόλιο περιέχει τα ένζυμα μεταβολισμού φάσης II (Ioannides C., 2001, Tsiftoglou A., 1997).

Μεταβολική φάση II: Οι αντιδράσεις της φάσης II έχουν κυρίως βιοσυνθετικό χαρακτήρα και απαιτούν ενέργεια προκειμένου να πραγματοποιηθούν, η οποία προέρχεται κυρίως από την ενεργοποίηση συνενζύμων και ενδιάμεσων προϊόντων υψηλής ενέργειας. Συνήθως, η ενεργοποιημένη μορφή είναι κάποιο νουκλεοτίδιο.

Εξαιρέση αποτελεί η σύζευξη με αμινοξέα, που απαιτεί την ενεργοποίηση της ξένης ουσίας και όχι του αμινοξέος που γίνεται με το ακέτυλο συνένζυμο Α (ακέτυλο-CoA). Η μεταβολική φάση II περιλαμβάνει αντιδράσεις στις οποίες η ξενοβιοτική ουσία συνδέεται ομοιοπολικά με ένα ενδογενές υπόστρωμα. Η θέση της ομοιοπολικής σύνδεσης είναι μια πολική λειτουργική ομάδα (π.χ. -OH, -COOH, -NH₂, -SH), που είτε προϋπάρχει στην μητρική ένωση (δεν απαιτείται φάση I), είτε εισάγεται κατά την μεταβολική φάση I. Τα προϊόντα της σύζευξης είναι πολικά, συνήθως πιο υδατοδιαλυτά και τις περισσότερες φορές αδρανή. Τα υψηλής πολικότητας συζευγμένα προϊόντα στη συνέχεια απομακρύνονται από τον οργανισμό (Harvey R.A., 2007, Iyanagi T., 2007).

Στις αντιδράσεις σύζευξης υπάγεται η προσθήκη γλυκουρονικού οξέος,θειϊκού οξέος, αμινοξέων, γλουταθειόνης, ακετυλίου και μεθυλίου. Τα πιο γνωστά ένζυμα φάσης II είναι:

- (1) Το ένζυμο της UDP-γλυκουρονύλο-τρανσφεράσης, το οποίο προσθέτει ένα μόριο γλυκουρονικού οξέος σε μια λειτουργική ομάδα της χημικής ουσίας καθιστώντας την έτσι περισσότερο υδατόφιλη (Liston H.L., 2001),
- (2) Οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης, η οποία γουταθειόνη είναι ένα σημαντικό μόριο που βοηθά στην αποτοξίνωση του οργανισμού καθώς αντιδρά με ηλεκτροϊνιόφιλα μόρια αδρανοποιώντας τα (Boyland E., 1969).

Πίνακας 1.3*: Αντιδράσεις μεταβολική φάσης II

Αντίδραση	Ενδογενής Ένωση	Ένζυμο (εντόπιση)
Γλυκουρονιδίωση	UDP-γλυκουρονικό οξύ	UDP-γλυκουρονυλ-τρανσφεράσες (μικροσωμάτια)
Ακετυλίωση	Ακέτυλο-CoA	N-ακέτυλο-τρανσφεράσες (κυτταρόπλασμα)
Σύζευξη με γλουταθειόνη	Γλουταθειόνη	Τρανσφεράσες γλουταθειόνης (κυτταρόπλασμα, μικροσωμάτια)
Σύζευξη με γλυκίνη	Γλυκίνη	Ακέτυλο-CoA-τρανσφεράσες γλυκίνης
Σύζευξη με θειικές ρίζες	Φωσφοθειική φωσφαδενοσίνη	Θειοτρανσφεράσες (κυτταρόπλασμα)
Μεθυλίωση	S-αδενοσύλ-μεθειονίνη	Τρανσμεθυλάσες (κυτταρόπλασμα)

*(Boyland E., 1969, Liston H.L., 2001)

Οι αντιδράσεις φάσης II δεν οδηγούν πάντα σε αδρανοποίηση. Οι συζεύξεις μπορούν να ενεργοποιήσουν δηλαδή να αυξήσουν την τοξικότητα και την αντιδραστικότητα πολλών ομάδων ξενοβιοτικών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Ο-ακετυλίωση των υδροξυλαμινών, η S-σύζευξη των αλοαλκανίων με την γλουταθειόνη και η 6-γλουκοδονιδίωση της μορφίνης. Επίσης, οι φάσεις I και II δεν είναι πάντα δύο διαδοχικές πορείες. Ορισμένες φορές η φάση II προηγείται της φάσης I, ενώ μπορεί να αποτελούν και ανταγωνιστικές διαδικασίες στον μεταβολισμό ενός ξενοβιοτικού, όπως είναι η οξείδωση κατά την φάση I και η σύζευξη της ακεταμινοφαίνης (παρακεταμόλη), της κωδεΐνης και της κυκλοφωσφαμίδης κατά την φάση II (Josephy P.D., 2005).

Μεταβολική φάση III: Τέλος, πρέπει να σημειωθεί πως τα συζευγμένα προϊόντα εξάγονται διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών με τη βοήθεια μεμβρανικών αντλιών εκροής (P-γλυκοπρωτεΐνες). Η διαδικασία αυτή, παρόλο που δε μεταβάλλει τη χημική δομή του μεταβολίτη, αναφέρεται πολλές φορές ως μεταβολική φάση III (Josephy P.D., 2005, Iyanagi T., 2007).

Από τους σημαντικότερους ρόλους στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών αποτελούν οι αντιδράσεις φάσης I και συγκεκριμένα οι αντιδράσεις αφυδρογόνωσης ή οξείδωσης, οι οποίες διεκπεραιώνονται είτε με αφυδρογονάσεις ή με οξειδάσεις. Το πλέον σημαντικό όμως σύστημα μεταβολισμού φαρμακευτικών αλλά και χημικών τοξικών ουσιών, που ανήκει στην φάση I του μεταβολισμού, είναι το σύστημα του κυτοχρώματος P-450, που αναφέρεται συχνά και ως μικροσωματικό ενζυμικό σύστημα οξειδάσης μεικτής λειτουργίας (Mixed Function Oxidase, MFO). Τα σημαντικότερα συστατικά του συστήματος αυτού είναι τα ισοένζυμα του κυτοχρώματος P-450 (CYPs) που αποτελούν μια οικογένεια αιμοπρωτεϊνών με την ίδια προσθετική ομάδα (θειολο-δεσμευόμενη αίμη) και διαφορετική δομή αποπρωτεΐνης (Sheweita S.A., 2000).

1.6 Κυτόχρωμα P-450

Το κυτόχρωμα P-450 (CYP) αποτελεί το πιο σημαντικό ενζυμικό σύστημα μεταβολισμού της φάσης I. Είναι μια υπεροικογένεια πρωτεϊνών που περιέχουν ένα παράγοντα αίμης και συνεπώς κατατάσσονται στις αιμοπρωτεΐνες. Καταλύουν την οξείδωση και αναγωγή πληθώρας ενδογενών και εξωγενών ουσιών με ευρέως διαφορετική χημική δομή. Είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό των λιπόφιλων ξενοβιοτικών, διαδικασία που καταλήγει σε μεγάλο ποσοστό σε αυξημένη πολικότητα

και απώλεια της βιολογικής δράσης. Παράλληλα όμως, εμπλέκονται στη μεταβολική ενεργοποίηση των προ-καρκινογόνων και προ-τοξικών ουσιών με αποτέλεσμα την κυτταροτοξική τους δράση (Gonzalez F.J., 2011). Όσον αφορά τις ενδογενείς ουσίες, τα ένζυμα του κυτοχρώματος P-450 κατέχουν κεντρική θέση στην σύνθεση και τον καταβολισμό των λιπαρών οξέων, της χοληστερόλης, των στεροειδών ορμονών και των εικοσανοειδών (Ioannides C., 1990).

Τα κυτοχρώματα βρίσκονται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και έχουν εντοπιστεί σε βακτήρια, τους ζυμομύκητες (yeast), τα φυτά, τα έντομα, τα ψάρια και τα θηλαστικά (Ioannides C., 1990). Το κυτόχρωμα P-450 των θηλαστικών αντιπροσωπεύει μια μεγάλη ομάδα ενζύμων που είναι δεσμευμένα στο εσωτερικό των διπλοστιβάδων μεμβρανών και χρησιμοποιούν το μοριακό οξυγόνο και ηλεκτρόνια από το NADPH (σε ορισμένες περιπτώσεις NADH) για την εισαγωγή ενός ατόμου οξυγόνου στο υπόστρωμα. Το άλλο οξυγόνο μετατρέπεται σε νερό (Gonzalez J.F., 1993, Tsiftoglou A., 1997).

Σε μέγεθος τα κυτοχρώματα P-450 κυμαίνονται από 45 kDa ως 60 kDa και περιέχουν ένα μοναδικό μόριο αίμης. Ουσιαστικά, το ενζυμικό σύστημα αποτελείται από το ένζυμο NADPH-ρεδουκτάση του κυτοχρώματος P-450 και τα ίδια τα κυτοχρώματα P-450, που εντοπίζονται στις μικροσωματικές μεμβράνες. Η ρεδουκτάση του κυτοχρώματος P-450 χρησιμοποιεί ως συνένζυμο το NADPH και μεταφέρει ηλεκτρόνια στο κυτόχρωμα P-450. Υπάρχουν διάφοροι τύποι του κυτοχρώματος P-450, που ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του οργανισμού και τον ιστό. Αντίθετα ωστόσο προς την ποικιλομορφία που παρατηρείται στο κυτόχρωμα P-450, έχει ταυτοποιηθεί μόνο μια ρεδουκτάση του κυτοχρώματος P-450. Τονίζεται, ότι στο σύστημα του κυτοχρώματος P-450 λαμβάνουν μέρος κυρίως αντιδράσεις οξειδωσης. Εν τούτοις όμως, έχει και την ικανότητα να διεκπεραιώσει αναγωγικές μεταβολικές διαδικασίες, ιδιαίτερα σε συνθήκες χαμηλής τάσης οξυγόνου. Στις αντιδράσεις αυτές τα δύο ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο υπόστρωμα και όχι στο μοριακό οξυγόνο, με αποτέλεσμα την αναγωγή του υποστρώματος (Testa B., 1995).

Υπάρχουν διάφορες μορφές του κυτοχρώματος P-450. Οι μιτοχονδριακές μορφές του P-450 βρέθηκαν στα εσωτερικά των μεμβρανών και συμμετέχουν αποκλειστικά σε μονοπάτια βιοσύνθεσης στεροειδών ενώσεων, χολικού οξέος από χοληστερόλη και στον μεταβολισμό της βιταμίνης D. Η δεύτερη πιο άφθονη μορφή των κυτοχρωμάτων P-450 είναι τα μικροσωματικά και είναι συνδεδεμένα στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η πλειοψηφία αυτών είναι ένζυμα μεταβολισμού ξενοβιοτικών.

Τα κυτοχρώματα P-450, που μεταβολίζουν ξενοβιοτικά εντοπίζονται στις υψηλότερες συγκεντρώσεις στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό σε άλλους ιστούς, κυρίως τους πνεύμονες, το έντερο, τους νεφρούς αλλά και αλλού (Gonzalez J.F., 1993).

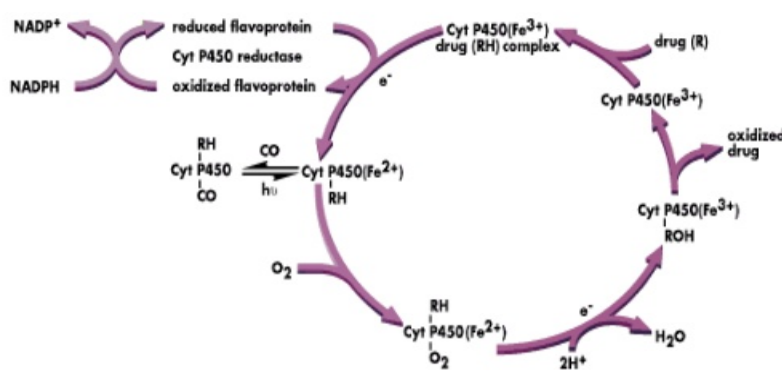
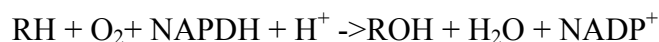
Τα κυτοχρώματα P-450 που ευρίσκονται σε φυτά, μύκητες και βακτηρίδια συνδέονται με διάφορες βιοσυνθετικές οδούς που απαιτούν οξειδωτικό μεταβολισμό. Μερικά εξ'αυτών απαιτούνται για τον καταβολισμό ουσιών. Σε αντίθεση με τα ευκαρυωτικά κυτοχρώματα P-450, τα βακτηριακά κυτοχρώματα P-450 είναι διαλυτά (Gonzalez J.F., 1993, Testa B., 1995).

Όπως έχει αναφερθεί, τα κυτοχρώματα P-450 απαιτούν ένα δεύτερο ένζυμο να μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADPH. Στα ανώτερα ζώα και φυτά, για τα κυτοχρώματα που ευρίσκονται δεσμευμένα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αυτό επιτυγχάνεται με την NADPH-ρεδουκτάση του κυτοχρώματος P-450, ένα ένζυμο που είναι επίσης δεσμευμένο στην μεμβράνη. Η μία και μοναδική μορφή του ενζύμου που υπάρχει είναι ικανή να μεταφέρει ηλεκτρόνια σε όλες τις διαφορετικές μορφές του κυτοχρώματος P-450. Η ιδιαιτερότητα αυτής της μεταφοράς είναι ακόμα άγνωστη. Δεν έχουν βρεθεί ειδικές θέσεις αλληλεπίδρασης μεταξύ της ρεδουκτάσης και του κυτοχρώματος P-450 και δεν απαιτείται αλληλεπίδραση μεταξύ της μεμβράνης και της αμινοτελικής περιοχής του ενζύμου (Shibata M., 1990). Φαίνεται να συντρέχουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και έχει αποδειχθεί ότι λαμβάνουν μέρος συγκεκριμένες περιοχές αμινοξέων 109-130 (Nadler S.G., 1991).

1.6.1 Μοριακός Μηχανισμός Αντίδρασης

Η μεταφορά του μοριακού οξυγόνου γίνεται με μια συγκεκριμένη διαδικασία. Κατά την φάση I του μεταβολισμού ένα υπόστρωμα (RH), δηλαδή μια υπό μεταβολισμό τοξική ουσία, ένα φάρμακο, ένα ξενοβιοτικό, αντιδρά με την οξειδωμένη μορφή του κυτοχρώματος P-450 (Fe^{+++}) και σχηματίζεται ένα σύμπλοκο μεταξύ RH-κυτοχρώματος P-450(Fe^{+3} -RH). Στη συνέχεια το σύμπλοκο αποδέχεται ένα ηλεκτρόνιο από το NADPH μέσω της NADPH-ρεδουκτάσης του κυτοχρώματος P-450, που ανάγει τον Fe^{+++} της αίμης σε Fe^{++} (Fe^{+2} -RH). Ύστερα το σύμπλοκο αυτό συνδέεται με μοριακό οξυγόνο (O_2), το οποίο αποδέχεται ένα ηλεκτρόνιο από το NADPH. Σε ορισμένες περιπτώσεις το δεύτερο ηλεκτρόνιο (e^-) προέρχεται από το συνένζυμο NADH μέσω του κυτοχρώματος Cy^+b_5 . Το σύμπλεγμα (O_2^- - Fe^{+2} -RH) υφίσταται ενδομοριακή αναδιάταξη με αποτέλεσμα ένα άτομο οξυγόνου να εισάγεται στο υπόστρωμα δίνοντας οξειδωμένο μεταβολίτη,

δηλαδή την ουσία προς μεταβολισμό, και το άλλο αντιδρά με δύο H^+ σχηματίζοντας νερό (H_2O). Το οξυγονωμένο υπόστρωμα αναγεννά την οξειδωμένη μορφή του κυτοχρώματος P-450 (βλέπε Εικόνα 1.8). Άρα κάθε τοξική ουσία προς μεταβολισμό που συμπεριφέρεται ως RH, οξειδώνεται προς μεταβολίτη ROH και μπορεί να περιγραφεί συνοπτικά με την αντίδραση (Testa B., 1995, Sheweita S.A., 2000):



Εικόνα 1.8: Γενικευμένος καταλυτικός κύκλος του κυτοχρώματος P-450. (Fe: άτομο σιδήρου της αίμης, RH: υπόστρωμα, ROH: προϊόν) (Guengerich F.P., 2000).

1.6.2 Ονοματολογία Κυτοχρώματος P-450

Ένας πολύ μεγάλος αριθμός κυτοχρωμάτων P-450, εκ των οποίων αρχικά κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα cDNA, κλωνοποιήθηκε και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η πρωτοταγής αλληλουχία αμινοξέων. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία ενός συστήματος ονοματολογίας για το κυτόχρωμα P-450. Η τρίτη επικαιροποίηση της εν λόγω ονοματολογίας έχει δημοσιευθεί (Nelson D.R., 1993). Στην ονοματολογία τα κυτοχρώματα P-450 ομαδοποιούνται μόνο με βάση την ομοιότητα της αλληλουχίας των αμινοξέων, που χρησιμοποιείται ως κριτήριο για την ταξινόμηση σε οικογένειες καθώς και υποοικογένειες, όπως εφαρμόστηκαν για πρώτη φορά από τον Dayhoff (Dayhoff M.O., 1979).

Η ταξινόμηση σε οικογένειες και υποοικογένειες γίνεται εμπειρικά. Οι πρωτεΐνες του κυτοχρώματος P-450 που ανήκουν σε μια γονιδιακή οικογένεια ορίζεται να έχουν

>40% ομοιότητα στην αλληλουχία αμινοξέων. Μερικές οικογένειες εμφανίζουν δύο ή και περισσότερες υποοικογένειες. Τα κυτοχρώματα μέσα σε μια υποοικογένεια εμφανίζουν πάντα >55% ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία. Οι πρωτεΐνες του κυτοχρώματος και τα αντίστοιχα γονίδια τους ονομάζονται με την ρίζα CYP, ακολουθούμενο από έναν αριθμό που χαρακτηρίζει την οικογένεια (1, 2, 3 κλπ.), ένα λατινικό κεφαλαίο γράμμα (A, B, C κλπ.) με το οποίο προσδιορίζεται η υποοικογένεια και τέλος έναν άλλο αριθμό (1, 2, 3 κλπ.), ο οποίος χαρακτηρίζει την ισομορφή του κυτοχρώματος P-450. Για παράδειγμα, το CYP1A1 σημαίνει ότι ανήκει στην οικογένεια 1, στην πρώτη υποοικογένεια (υποοικογένεια A) και αντιστοιχεί στην ισομορφή 1 (Nelson D.R., 1993).

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν αναγνωρισθεί 57 λειτουργικά CYP γονίδια και 58 ψευδογονίδια. Από τα λειτουργικά γονίδια, τα 7 κωδικοποιούν μιτοχονδριακά ένζυμα ενώ τα υπόλοιπα 50 κωδικοποιούν μικροσωμιακά ένζυμα από τα οποία τα 15 μεταβολίζουν κυρίως τις ξενοβιοτικές ουσίες και τα 20 συμμετέχουν στην βιοσύνθεση ενδογενών ουσιών (Iyanagi T., 2007).

Από τον σύνολο των CYP οικογενειών, τέσσερις οικογένειες, οι CYP1 έως CYP4, λειτουργούν κατ' εξοχήν για τον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών. Η οικογένεια CYP1 ευθύνεται κυρίως για τον μεταβολισμό καρκινογόνων και τοξικών ουσιών, ενώ οι οικογένειες CYP2 και CYP3 μεταβολίζουν φάρμακα, τοξικές ουσίες καθώς και άλλες ουσίες που καταλήγουν μετά από μεταβολισμό φάσης II σε περισσότερο σταθερά και υδροφιλικά παράγωγα, αν και υπάρχουν εξαιρέσεις (Gonzalez F.J., 2006). Ειδικά, η υποοικογένεια CYP3A αντιπροσωπεύει σχεδόν το 50% των ολικών κυτοχρωμάτων του ήπατος των ενηλίκων και μεταβολίζει περίπου το 60% των πιο συχνά συνταγογραφούμενων φαρμάκων (Ingelman-Sundberg M., 2002).

1.6.3 Παράγοντες Ρυθμιστικοί των Κυτοχρωμάτων

Η έκφραση των P-450 ενζύμων ρυθμίζεται από φυσιολογικούς, παθολογικούς, γενετικούς (πολυμορφισμός) και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αποτέλεσμα αυτής της πολύπλοκης ρύθμισης είναι η διαφορετική για κάθε άτομο σύνθεση και δραστηριότητα αυτών των ενζύμων, φαινόμενο που ονομάζεται ενδοατομική διακύμανση (interindividual variability) (Pelkonen O., 1998, Cribb A.E., 2005).

Ένας φυσιολογικός παράγοντας που επηρεάζει την έκφραση των ενζύμων του κυτοχρώματος P-450 είναι η ηλικία ενός ατόμου. Έχει βρεθεί πως η ταχύτητα των

ενζύμων αυτών είναι πολύ χαμηλή κατά τη γέννηση αλλά αυξάνεται ταχέως κατά την ενηλικίωση και στη συνέχεια μειώνεται κατά την γήρανση. Σοβαρές ασθένειες του ήπατος όπως η ηπατίτιδα, η κίρρωση, ο καρκίνος του ήπατος αλλά και άλλες παθολογικές διαταραχές, όπως ο διαβήτης και άλλες ενδοκρινικές διαταραχές, μπορούν να προκαλέσουν δομικές και βιοχημικές διαταραχές στο ήπαρ. Αυτές οι αλλαγές είναι ικανές να μειώσουν ή να αυξήσουν τα επίπεδα των P-450 ενζύμων (Mayer U.A., 1996, Sheweita S.A., 2005). Πειραματικές μελέτες σε επίμυες έχουν αποδείξει, πως μια ποικιλία ορμονών και φλεγμονωδών καταστάσεων (μέσω της παραγωγής κυτοκινών) επηρεάζουν την έκφραση ή/και την επαγωγή των κυτοχρωμάτων (Sarlis N.J., 2005).

Ο πολυμορφισμός των κυτοχρωμάτων P-450, δηλαδή η ύπαρξη αλληλόμορφων γονιδίων ενός ισοενζύμου που προήλθαν από μεταλλάξεις, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ενζυμικό προϊόν με μειωμένη, αυξημένη, διαφορετική (ως προς το υπόστρωμα) ή και καθόλου δραστηριότητα (συνήθως δε γίνεται σύνθεση του γονιδίου λόγω απαλοιφής του γονιδίου) (Ingelman-Sundberg M., 2001). Όλα τα ηπατικά P-450 ένζυμα, που μεταβολίζουν φάρμακα είναι πολυμορφικά (Ingelman-Sundberg M., 2002). Ανάμεσα στις οικογένειες CYP1-CYP3, που είναι σημαντικές για τον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών, όλα τα γονίδια είναι λειτουργικώς πολυμορφικά με μόνη εξαίρεση τα CYP1A1 και CYP2E1, που είναι σχετικά συντηρημένα και ουσιαστικά δεν έχει βρεθεί καμία μετάλλαξη που να επηρεάζει την λειτουργία τους. Αντίθετα, από τα 20 CYPs που είναι σημαντικά για τον μεταβολισμό των ενδογενών ουσιών, μόνο 6 έχουν βρεθεί, προς το παρόν, να είναι πολυμορφικά (Ingelman-Sundberg M., 2001). Μεταξύ των εθνών παρατηρούνται μεγάλες διαφορές ως προς την εμφάνιση των πολυμορφικών P-450 γονιδίων (Ingelman-Sundberg M., 2005).

Στην περίπτωση μεταβολισμού των φαρμάκων, ο πολυμορφισμός οδηγεί στην ταξινόμηση του πληθυσμού σε φτωχούς (poor metabolizers, PM), σε ενδιάμεσους (intermediate metabolizers, IM), σε επαρκείς (efficient metabolizers, EM) και σε υπερταχείς (ultrarapid metabolizers, UM) μεταβολίτες ενός φαρμάκου, ανάλογα με το είδος της γονιδιακής μετάλλαξης και την επίδραση στο αντίστοιχο κυτόχρωμα P-450 (Ingelman-Sundberg M., 2005). Ο πολυμορφισμός επηρεάζει την δόση του φαρμάκου, που πρέπει να χορηγηθεί για να επιτευχθεί θεραπευτικό αποτέλεσμα, επηρεάζει επίσης τις ανεπιθύμητες ενέργειες των φαρμάκων αλλά και την μεταβολική ενεργοποίησή τους καθώς και την μετατροπή άλλων ξενοβιοτικών ουσιών σε τοξικούς μεταβολίτες (Pelkonen O., 1998). Χαρακτηριστικά αναφέρεται η περίπτωση του αντιπηκτικού φαρμάκου βαρφαρίνη (S-warfarin), που αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου CYP2C9.

Στους ασθενείς, που είναι φτωχοί μεταβολίτες, παρουσιάζονται αυξημένες αιμορραγίες λόγω της μειωμένης κάθαρσης του φαρμάκου με αποτέλεσμα στα άτομα αυτά να απαιτείται μείωση της χορηγούμενης δόσης (Ingelman-Sundberg M., 2001). Τέλος, η σύνδεση του πολυμορφισμού με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου, είναι ιδιαίτερης σημασίας όταν συνδυάζεται με την έκθεση σε γνωστά χημικά καρκινογόνα, όπως συμβαίνει κατά το κάπνισμα (Gonzalez F.J., 2011).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η χορήγηση φαρμάκων, η έκθεση σε χημικές ουσίες που υπάρχουν στον καπνό του τσιγάρου, οι ρυπαντές της ατμόσφαιρας ή που προσλαμβάνονται με την διατροφή είναι δυνατόν να προκαλέσουν επαγωγή ή αναστολή ενός μεγάλου αριθμού κυτοχρωμάτων P-450 (Mayer U.A., 1996, Pelkonen O., 1998). Ως επαγωγή, κλασικά ορίζεται η *de novo* σύνθεση νέων ενζυμικών μορίων ως αποτέλεσμα αυξημένης μεταγραφής του αντίστοιχου γονιδίου μετά από κατάλληλο ερέθισμα. Έτσι, το αποτέλεσμα της επίδρασης ενός επαγωγέα είναι η διέγερση της *de novo* σύνθεσης των πρωτεϊνών, αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του επαγόμενου ενζύμου και τελικά η αύξηση της δραστηριότητας αυτού του ενζύμου. Ωστόσο, ο όρος επαγωγή χρησιμοποιείται και στις περιπτώσεις που υπάρχει αύξηση του πρωτεϊνικού ποσού και της δραστηριότητας των ενζύμων, ανεξάρτητα από τον εμπλεκόμενο μηχανισμό (π.χ. μείωση του ρυθμού αποδόμησης των πρωτεϊνών) (Hollenberg P.F., 2002).

Η επαγωγή έκφρασης των CYPs μπορεί να αυξήσει την ικανότητα για μεταβολική αποτοξίνωση και απομάκρυνση μέσω της ενίσχυσης των αντιδράσεων αδρανοποίησης και να αποτελέσει έτσι ένα σημαντικό τμήμα του συστήματος άμυνας ενάντια στην έκθεση σε ξеноβιοτικές ουσίες (Hollenberg P.F., 2002). Ωστόσο, στην περίπτωση των φαρμάκων που αποτελούν υπόστρωμα των επαγόμενων ενζύμων, η ενίσχυση των αντιδράσεων αδρανοποίησης οδηγεί σε εξασθένηση του φαρμακολογικού αποτελέσματος. Τέλος, η επαγωγή των κυτοχρωμάτων, που είναι υπεύθυνα για την μεταβολική ενεργοποίηση των προ-καρκινογόνων ουσιών και προ-τοξικών ουσιών (π.χ. CYP1A1/1A2) οδηγεί στην ενίσχυση των αντιδράσεων αυτών, με αποτέλεσμα την αυξημένη τοξικότητα και πιθανότητα καρκινογένεσης (Pelkonen O., 1998).

Αντίθετα αποτελέσματα από αυτά που μόλις περιγράφηκαν στον μεταβολισμό των φαρμάκων και γενικά των εξωγενών ουσιών επιφέρει το φαινόμενο της αναστολής των ενζύμων του κυτοχρώματος P-450. Ο καταλυτικός κύκλος των ενζύμων αυτών παρέχει έναν αριθμό πιθανών θέσεων για την αναστολή του μεταβολισμού των

υποστρώματων τους. Γενικώς, η αναστολή μπορεί να είναι αντιστρεπτή ή μη αντιστρεπτή (Hollenberg P.F., 2002).

Η αντιστρεπτή αναστολή αφορά τις περισσότερες περιπτώσεις της αλληλεπίδρασης μεταξύ φαρμάκων, είναι παροδική και η φυσιολογική μεταβολική λειτουργία των ενζύμων επανέρχεται μετά την απομάκρυνση του αναστολέα από τον οργανισμό. Η αντιστρεπτή αναστολή διακρίνεται στη συναγωνιστική (competitive), τη μη συναγωνιστική (non-competitive) και στην ασυναγωνιστική (uncompetitive). Στη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας εμποδίζει την δέσμευση του υποστρώματος στην ενεργή θέση του ενζύμου. Ο συναγωνιστικός αναστολέας συνήθως αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου, αν και δεν είναι απαραίτητο. Η συναγωνιστική αναστολή συμβαίνει συνήθως όταν είναι παρόντα δύο διαφορετικά υποστρώματα για το ίδιο ένζυμο. Στη μη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας δεσμεύεται σε θέση άλλη από την ενεργή και δεν έχει καμία επίδραση στην δέσμευση του υποστρώματος αλλά το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος-αναστολέα παύει να είναι λειτουργικό. Στην ασυναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας αντί να δεσμευθεί στο ελεύθερο ένζυμο δεσμεύεται στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος με αποτέλεσμα το σχηματισμό μη παραγωγικού συμπλόκου (Hollenberg P.F., 2002).

Η μη αντιστρεπτή αναστολή θεωρείται σχετικά ασυνήθιστη στα περισσότερα ένζυμα αλλά στις αντιδράσεις που καταλύονται από τα κυτοχρώματα παρατηρείται σε μεγαλύτερη συχνότητα. Στην περίπτωση αυτή, οι ενώσεις απαιτούν μεταβολική ενεργοποίηση από τα CYPs και στη συνέχεια σχηματίζουν σύμπλοκα ή ομοιοπολικούς δεσμούς, που δε μπορούν να σπάσουν για να ξαναγεννηθεί το ενεργό ένζυμο. Η λειτουργία του ενζύμου επανέρχεται μόνο με την σύνθεση νέων, καταλυτικά ενεργών CYPs ενζύμων (Pelkonen O., 1998, Hollenberg P.F., 2002).

Η έναρξη της επαγωγής είναι σχετικά αργή και απαιτεί μέρες ή και εβδομάδες για την πλήρη εκδήλωση των επιδράσεών της. Οι επιδράσεις των επαγωγέων είναι γενικά έμμεσες και στις περισσότερες περιπτώσεις δεν επιδρούν άμεσα με το ένζυμο για να προκαλέσουν επαγωγή. Αντίθετα, η έναρξη της αναστολής είναι σχετικά ταχεία και το ανασταλτικό αποτέλεσμα οφείλεται σε άμεση επίδραση του αναστολέα με το κυτόχρωμα (Hollenberg P.F., 2002).

Συμπερασματικά, ο πολυμορφισμός αποτελεί έναν μόνιμο παράγοντα για την εμφάνιση διαφοροποίησης μεταξύ διαφόρων ατόμων, ενώ οι ποικίλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες συνεισφέρουν σημαντικά σε αυτό το φαινόμενο με αποτέλεσμα κάθε

άνθρωπος να παρουσιάζει το δικό του μοναδικό προφίλ ως προς το μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών (Pelkonen O., 1998).

1.7 Μεταβολισμός Ξενοβιοτικών μέσω του P-450

Κατά την διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών τα ανθρώπινα κυτοχρώματα P-450, υπεύθυνα για τον μεταβολισμό των κύριων ξενοβιοτικών ενώσεων, έχουν μελετηθεί εκτενώς. Τα κυτοχρώματα αυτά ανήκουν στις οικογένειες 1, 2 και 3. Οι οικογένειες αυτές μεταβολίζουν και σε σημαντικό βαθμό ξενοβιοτικές ουσίες, πολλές από τις οποίες κατατάσσονται στις τοξικές ουσίες και συγκεκριμένα στις προ-καρκινογόνες ουσίες (Gonzalez J.F., 1992). Οι οικογένειες αυτές διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην μεταβολική ενεργοποίηση των προ-καρκινογόνων ουσιών που ευρίσκονται στον καπνό τσιγάρων και ευθύνονται σε σημαντικό ποσοστό για την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. Συγκεκριμένα έχουν χαρακτηριστεί οι ισομορφές του κυτοχρώματος P-450: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 και CYP3A4 (Conney A.H., 1982, Ioannides C., 1993, Fernandez-Salguero P., 1995).

1.7.1 Υποοικογένεια CYP1A

Η υποοικογένεια CYP1A στα θηλαστικά αποτελείται από δύο μέλη: το CYP1A1 και το CYP1A2 (Rifkind A.B., 2006). Τα ισοένζυμα αυτά, αν και παρόμοια στην πρωτοταγή τους δομή (68% ομολογία στην αμινοξική τους αλληλουχία στον άνθρωπο), παρουσιάζουν σημαντικά διαφορετική εκλεκτικότητα όσον αφορά τα υποστρώματα (Cribb A.E., 2005). Η υποοικογένεια CYP1A έχει ιδιαίτερη σημασία, όχι μόνο για τον πρωταρχικό ρόλο στον μεταβολισμό φαρμάκων αλλά και ξενοβιοτικών ουσιών, καθώς και για το γεγονός ότι τα μέλη της εμπλέκονται σημαντικά στη μεταβολική ενεργοποίηση των προ-καρκινογόνων και προ-τοξικών ουσιών. Όπως είναι γνωστό, οι καρκινογόνες και τοξικές ουσίες απαιτούν μεταβολική ενεργοποίηση για να εκδηλώσουν τις επιβλαβείς δράσεις (Ingelman-Sundberg M., 2001).

Η επαγωγή των ενζύμων CYP1A1 και CYP1A2 οφείλεται κυρίως στην αύξηση της μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων. Στους επίμυες η επαγωγή επιτυγχάνεται και με σταθεροποίηση του mRNA (Souket P., 1992). Η ενεργοποίηση της έκφρασης των γονιδίων CYP1A1, CYP1A2 αλλά και του CYP1B1, πραγματοποιείται πρωταρχικά από

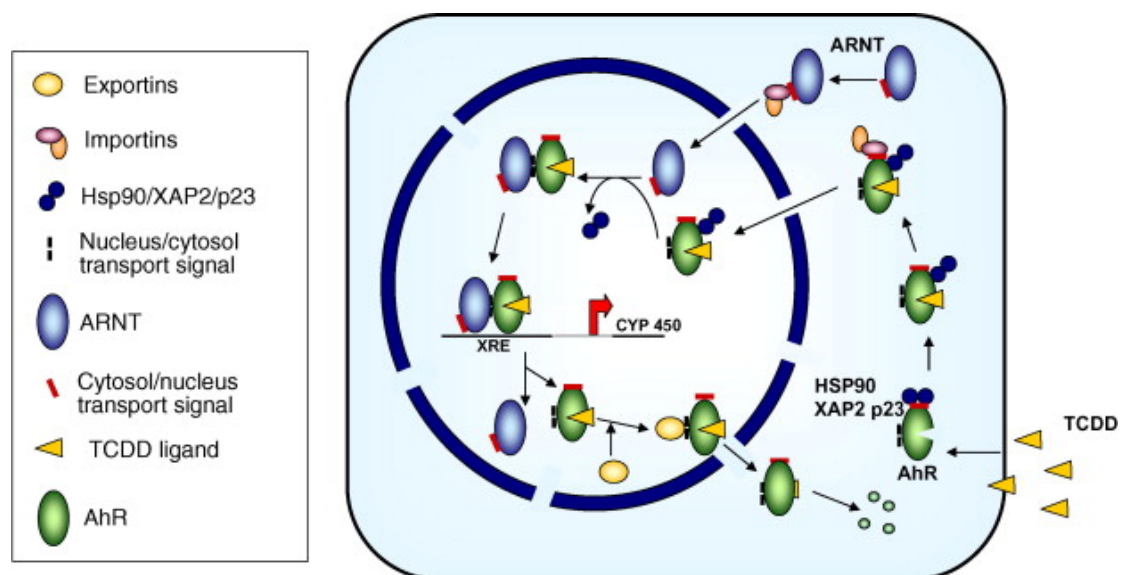
τον υποδοχέα αρυλ-υδρογονανθράκων (Aryl Hydrocarbon Receptor, AhR) μέσω ενός καταρράκτη γεγονότων, γνωστό ως μονοπάτι σηματοδότησης του AhR (Gonzalez F.J., 2006, Delescluse C., 2000).

Ο υποδοχέας AhR είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται ύστερα από πρόσδεση με την ουσία επαγωγέα. Σε φυσιολογικές συνθήκες ο υποδοχέας AhR βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα δεσμευμένος σε ένα μοριακό σύμπλοκο σαπερονίνης (δύο μόρια HSP90/XAP2/p23). Η HSP90 αποτρέπει την μεταγραφική ενεργοποίηση του AhR και τον κρατά σε διαμόρφωση που διευκολύνει την πρόσδεση της ουσίας (Delescluse C., 2000, Barouki R., 2007). Ουσίες που επάγουν τα κυτοχρώματα CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1, όπως τα καρκινογόνα B[a]P, TCDD, 3-MC, DMBA καθώς και φάρμακα όπως η ομεπραζόλη, αλλά και φυσιολογικά προϊόντα που ευρίσκονται στα φυτά, όπως η β-ναφθοφλαβόνη, αποτελούν προσδέτες (ligands) του υποδοχέα AhR (Gonzalez F.J., 2006).

Ο προσδέτης διαχέεται κατά μήκος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και δεσμεύεται στον υποδοχέα AhR. Το σύμπλοκο υφίσταται αλλαγή στην διαμόρφωσή του και μετατοπίζεται εξολοκλήρου στον πυρήνα, όπου ο AhR αποσυνδέεται από τις πρωτεΐνες HSP90/XAP2/p23 και διμερίζεται με την πυρηνική πρωτεΐνη ARNT (AhR Nuclear Translocator, πυρηνικός μετατοπιστής του AhR). Το ετεροδιμερές σύμπλοκο AhR-ARNT έχει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης με το DNA και δεσμεύεται σε ειδικές ομόφωνες ρυθμιστικές αλληλουχίες (XREs - Xenobiotic Responsive Elements - στοιχεία αποκρινόμενα σε ξενοβιοτικά), οι οποίες ευρίσκονται ανοδικά (upstream) του υποκινητή (promoter) του γονιδίου στόχου. Αυτή η δέσμευση οδηγεί στη διέγερση της μεταγραφής του γονιδίου CYP1A1 ή CYP1A2 και στη σύνθεση νέων μορίων πρωτεϊνών. Όταν η ρύθμιση της μεταγραφής πραγματοποιηθεί, ο υποδοχέας AhR εξάγεται στο κυτταρόπλασμα και υφίσταται αποδιάταξη από τα πρωτεοσώματα (Barouki R., 2007, Denison MS., 2002).

Έχει καταγραφεί επίσης, μια άλλη πρωτεΐνη που εντοπίζεται στον πυρήνα και συμμετέχει στην ρύθμιση της έκφρασης αυτών των κυτοχρωμάτων, η AhRR (Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor - Αναστολέας του υποδοχέα αρυλ-υδρογονανθράκων). Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο του *AhRR* καταστέλλει την μεταγωγή σήματος μέσω του AhR καθώς συναγωνίζεται με τον ARNT για την πρόσδεση στον υποδοχέα αρυλ-υδρογονανθράκων (AhR) για τον σχηματισμό του ετεροδιμερούς (Baba T., 2001). Ο σχηματισμός του ετεροδιμερούς AhR-AhRR έχει ως αποτέλεσμα να μην σχηματίζεται το ετεροδιμερές AhR-ARNT και συνεπώς να μην καθίσταται δυνατή η

πρόσδεση στις περιοχές XREs που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων (Evans B.R., 2008). Η έκφραση του AhRR είναι υψηλή στους όρχεις, τον πνεύμονα, τις ωοθήκες, την σπλήνα και το πάγκρεας στους ενήλικες, ενώ η έκφραση στα έμβρυα είναι χαμηλή σε όλους τους ιστούς (Yamamoto J., 2004).



Εικόνα 1.9: Μηχανισμός επαγωγής των γονιδίων CYP1A1/1A2 μέσω του AhR υποδοχέα (Barouki R., 2007).

1.7.1.1 Κυτόχρωμα CYP1A1

Από τα καλύτερα μελετημένα κυτοχρώματα του P-450 είναι το CYP1A1. Το κυτόχρωμα CYP1A1 είναι επίσης γνωστό ως AHH (Aryl Hydrocarbon Hydroxylase - Υδροξυλάση αρυλ-υδρογονανθράκων) (Cribb A.E., 2005). Το κυτόχρωμα CYP1A1 κατέχει σημαντικό ρόλο στον βιομετασχηματισμό των τοξικών και των καρκινογόνων ουσιών του περιβάλλοντος όπως οι αρωματικές αμίνες και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs). Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, με κύριο εκπρόσωπο το βενζο[α]πυρένιο (B[a]P), παράγονται από την ατελή καύση οργανικής ύλης και αποτελούν σημαντικούς ρυπαντές του περιβάλλοντος (Konstandi M., 2004).

Ως ένζυμο της μεταβολικής φάσης I, η κύρια λειτουργία του CYP1A1 είναι η οξείδωση των υδρόφοβων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, ως ένα πρώτο βήμα για την μετέπειτα αδρανοποίηση τους από τα ένζυμα της φάσης II. Έτσι, η φυσιολογική λειτουργία του CYP1A1 είναι η αποτοξίνωση. Ωστόσο, η επαγωγή του CYP1A1 και η υψηλή δραστηρότητά του οδηγούν σε τοξικότητα. Αυτά τα δύο

χαρακτηριστικά έχουν συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου και τοξικότητας σε άτομα που εκτίθενται στον καπνό του τσιγάρου ή άλλους περιβαλλοντικούς ρυπαντές (Cribb A.E., 2005).

Το CYP1A1 εκφράζεται πρωταρχικά σε εξωηπατικούς ιστούς και συγκεκριμένα στους πνεύμονες, το λάρυγγα, το δέρμα, τον πλακούντα και τον εγκέφαλο, ενώ στο ήπαρ είτε δεν έχει βασική έκφραση είτε εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (Eaton D.L., 1995, Rifkind A.B., 2006). Γενικά, η βασική έκφραση του CYP1A1 θεωρείται αμελητέα (Nebert D.W., 2004). Αντίθετα, επάγεται σε πολύ μεγάλο βαθμό στο ήπαρ και σε πολλά άλλα όργανα, όπως οι πνεύμονες, το δέρμα, οι νεφροί και το δέρμα. Επίσης, το CYP1A1 επάγεται στα λεμφοκύτταρα (Pelkonen O., 1998), το ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, σχεδόν σε κάθε όργανο, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου και της καρδιάς (Rifkind A.B., 2006). Θεωρητικά, η έκφραση του CYP1A1 μπορεί να αποδειχθεί σε σχεδόν όλους τους ιστούς. Ωστόσο, η έκφραση αυτή γενικά εξαρτάται από την παρουσία επαγωγέων. Σε περίπτωση απουσίας το γονίδιο είναι πρακτικά αδρανές (Elovaara E., 2007).

Χαρακτηριστικά υποστρώματά του είναι η θεοφυλλίνη, όπως και το βενζο[α]πυρένιο που αναστέλλεται από φλουοροκινολόνες και μακρολίδια, ενώ επάγεται από αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Beresford A.P., 1993) και εμπλέκεται στην μεταβολική ενεργοποίηση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) (Beresford A.P., 1993). Στους επόμενους πίνακες αναφέρονται αντιπροσωπευτικοί επαγωγείς, αναστολείς και υποστρώματα του CYP1A1 στον άνθρωπο.

Πίνακας 1.4*. Αντιπροσωπευτικοί επαγωγείς του CYP1A1

Επαγωγείς του CYP1A1	
<ul style="list-style-type: none">• Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, (PAHs):<ul style="list-style-type: none">- Βενζο[α]πυρένιο, B[a]PΒενζο[α]ανθρακένιο, B[a]A- 7,12-διμεθυλβενζ[α]ανθρακένιο (DMBA)- 3-μεθυλχολανθρένιο (3MC)• 6-νιτροχρυσένιο• Ετεροκυκλικέςαρωματικές αμίνες:<ul style="list-style-type: none">- 2-ακετυλαμινοφλουοράνιο	<ul style="list-style-type: none">• 2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζο-p-διοξίνη (TCDD)• Καπνός τσιγάρου• Κρέας στα κάρβουνα• Εντομοκτόνα: Carbaryl• Φαρμακευτικές ουσίες:<ul style="list-style-type: none">- Ομεπραζόλη- Λανσοπραζόλη- Πριμακόνη

*(Beresford A.P., 1993, Eaton D.L., 1995, Rendic S., 2002)

Πίνακας 1.5*. Αντιπροσωπευτικοί αναστολείς του CYP1A1

Αναστολείς του CYP1A1	
Φαρμακευτικές ουσίες:	Άλλες ουσίες:
<ul style="list-style-type: none">• Κετοконаζόλη• Νιφεδιπίνη• Αμλοδιπίνη• Προπανολόλη• Θεοφυλλίνη• Μακρολίδια• Φλουοροκινολόνες	<ul style="list-style-type: none">• Ακετονιτρίλιο• Ακετυλένια• Αιθανόλη• Αραχιδονικό οξύ

*(Beresford A.P., 1993, Eaton D.L., 1995, Rendic S., 2002)

Πίνακας 1.6*. Αντιπροσωπευτικά υποστρώματα του CYP1A1

Υποστρώματα του CYP1A1	
Τοξικές-καρκινογόνες ουσίες:	Φαρμακευτικές και άλλες ουσίες:
<ul style="list-style-type: none">• Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, PAHs<ul style="list-style-type: none">- Βενζο[α]πυρένιο, B[a]P- Βενζο[α]ανθρακένιο, B[a]A- 7,12-διμεθυλβενζ[α]ανθρακένιο (DMBA)• 6-νιτροχρυσένιο• Αρωματικές αμίνες: 4-αμινοδιφαινύλιο• Νιτροζαμίνες: NNK	<ul style="list-style-type: none">• Δικλοφαινάκη• Τρογλυταζόνη• Ζοτεπίνη• Ελλιπτισίνη• Αμιωδαρόνη• Φλουβαστατίνη• Νικοτίνη

*(Beresford A.P., 1993, Eaton D.L., 1995, Rendic S., 2002)

Η έκφραση αλλά και η δραστηριότητα του CYP1A1 έχει παρατηρηθεί να αυξάνεται στους πνεύμονες και στο ήπαρ καθώς και στον πλακούντα μετά από έκθεση σε βενζο[α]πυρένιο και διάφορους άλλους αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Elovaara E., 2007). Τονίζεται ότι η βασική έκφραση του CYP1A1 είναι πολύ χαμηλή στους πνεύμονες και προφανώς η καταλυόμενη από το κυτόχρωμα CYP1A1 βιοενεργοποίηση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων σε δραστικές μορφές καρκινογόνων που αλληλεπιδρούν με το DNA βασίζεται στην επαγωγή της έκφρασης στους ανθρώπινους πνεύμονες (Elovaara E., 2007)

Ο υποδοχέας αρυλ-υδρογονανθράκων (AhR, Aryl hydrocarbon Receptor) ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου CYP1A1 (Kilic T., 2006). Έχει βρεθεί ενεργότητα του κυτόχρωματος CYP1A1 στον γαστρεντερικό σωλήνα σε πειραματόζωα τα οποία δεν έχουν εκτεθεί σε δραστικούς επαγωγείς. Τα αποτελέσματα πιστεύεται πως οφείλονται σε επαγωγείς χαμηλής δραστικότητας που πιθανώς λαμβάνονται με την τροφή. Η έκφραση του CYP1A1 έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη καρκίνων που σχετίζονται με την παρουσία πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (Nebert D.W., 1989). Τέλος, το κυτόχρωμα CYP1A1 δεν είναι απαραίτητο για την σωστή ανάπτυξη καθώς και για την φυσιολογική ομοίωση σε μύες (Gonzalez J.F., 2002).

1.7.1.2 Κυτόχρωμα CYP1A2

Το κυτόχρωμα CYP1A2 παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων με το κυτόχρωμα CYP1A1. Στον άνθρωπο τα CYP1A1 και CYP1A2 διαφέρουν ως προς την έκφρασή τους σε διάφορους ιστούς. Το CYP1A2, αντίθετα με το CYP1A1, εκφράζεται σε βασικό επίπεδο κυρίως στο ήπαρ, ενώ έχει βρεθεί να εκφράζεται στον εγκέφαλο και γενικά δεν φαίνεται να εκφράζεται σε εξωηπατικούς ιστούς (Ioannides C., 1993, Eaton D.L., 1995). Το κυτόχρωμα CYP1A2 επάγεται στο ήπαρ, τους πνεύμονες, το έντερο, τους νεφρούς (Rifkind A.B., 2006) και τον εγκέφαλο (Nebert DW., 2004).

Έχει πληθώρα υποστρώματα, μερικά από τα πιο γνωστά είναι: η θεοφυλλίνη, όπως και στο CYP1A1, η ακεταμινοφαίνη (παρακεταμόλη), η καφεΐνη, η ιμιπραμίνη (τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό) καθώς επίσης και η βαρφαρίνη που χρησιμοποιείται ευρέως ως αντιπηκτικό (Flockhart D.A., 2007). Στους αναστολείς ανήκουν η σιμετιδίνη (αναστολέας H₂-υποδοχέων ισταμίνης), η βεραπαμίλη (αναστολέας διαύλων ιόντων Ca⁺⁺), η φλουβοξαμίνη (εκλεκτικός αναστολέας επαναπρόσληψης σεροτονίνης, SSRI- Selective Serotonin Reuptake Inhibitor). Στους επαγωγείς συγκαταλέγονται η ομεπραζόλη (αναστολέας αντλίας H⁺) και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Flockhart D.A., 2007). Πολλοί από αυτούς βρίσκονται και στον καπνό του τσιγάρου. Έχει αναφερθεί και μεταβολισμός N-νιτροζαμινών που εντοπίζονται επίσης στον καπνό τσιγάρων (Yamazaki H., 1992). Μεσολαβεί δηλαδή στην μετατροπή αρκετών προ-καρκινογόνων σε δραστικά καρκινογόνα. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η N-υδροξυλίωση αρυλαμινών (Gonzalez J.F.,

2001). Στους πίνακες που ακολουθούν αναφέρονται σημαντικοί επαγωγείς, αναστολείς και υποστρώματα του CYP1A1 στον άνθρωπο.

Πίνακας 1.7*: Αντιπροσωπευτικοί επαγωγείς του CYP1A2

Επαγωγείς του CYP1A2	
<ul style="list-style-type: none"> • Καπνός τσιγάρου (πηγή πολλαπλών χημικών ουσιών όπως PAHs) • Κρέας στα κάρβουνα, τηγανιτό κρέας • Σταυρανθή φυτά • Έντονη άσκηση • 2-ακετυλαμινοφλουρανίο • TCDD • Πολυβρωμιωμένα διφαινύλια 	<ul style="list-style-type: none"> • PAHs <ul style="list-style-type: none"> - Βενζο[α]πυρένιο - Βενζο[α]ανθρακένιο - 3-μεθυλχωλανθρένιο (3-MC) • β-ναφθοφλαβόνη • Ομεπραζόλη • Χρόνια ηπατίτιδα

Πίνακας 1.8*: Αντιπροσωπευτικοί αναστολείς του CYP1A2

Αναστολείς του CYP1A2	
<ul style="list-style-type: none"> • Σιμετιδίνη • Ονδαστερόνη • Ρανιτιδίνη • Φλουβαστατίνη • Λιδικαΐνη • Τακρίνη • Θεοφυλλίνη • Βεραπαμίλη 	<ul style="list-style-type: none"> • Αμιωδαρόνη • Σιπροφλοξασίνη • Νορφλοξασίνη • Ναλιδιξικό οξύ • Ελλιπτισίνη • Φουραφιλίνη • Περαζίνη • Χρυσίνη (φλαβονοειδές)

* (Eaton D.L., 1995, Rendic S., 2002, Flockhart D.A., 2007)

Πίνακας 1.9*: Αντιπροσωπευτικά υποστρώματα του CYP1A2

Υποστρώματα του CYP1A2		
Α. Φαρμακευτικές και άλλες ουσίες		
• Θεοφυλλίνη	• Ζολπιδέμη	• Προπαφαινόνη
• Αντιπυρίνη	• Φλουοξετίνη	• Κυκλοβενζαπρίνη
• Παρακεταμόλη	• Καρβαμαζεπίνη	• Προπανολόλη
• Δικλοφαινάκη	• Κλοζαπίνη	• R-Βαρφαρίνη
• Ναπροξένη	• Ολανζαπίνη	• Τακρίνη
• Φαινακετίνη	• Χλωροπρομαζίνη	• Ταμοξιφαίνη
• Μιρταζαπίνη	• Βεραπαμίλη	• Τερβιναφίνη

• Νορτρυπτιλίνη	• Αμιωδαρόνη	• Λιδοκαΐνη
• Χλωριμιπραμίνη	• Μεξιλιτίνη	• Δαντρολένη
• Ιμιπραμίνη	• Ονδαστερόνη	• Χλωρζοξαζόνη
• Δεσιπραμίνη	• Ρανιτιδίνη	• Καφεΐνη
• Θεοβρωμίνη	• 17β-οιστραδιόλη	

B. Τοξικές – Καρκινογόνες ουσίες

• Αρωματικές αμίνες	• Ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες που προσλαμβάνονται από τη διατροφή:
- 2-ναφθυλαμίνη	- MeIQ
- 4-αμινοδιφαινύλιο	- MeIQx
- 2-ακετυλαμινοφλουοράνιο	- GluP1
- 2-αμινοφλουοράνιο	• PAHs:
- 2-αμινοανθρακένιο	- B[α]P, DMBA
• 6-νιτροχρυσένιο	• Οργανοφωσφορικά: Παραθειό
• Αλφατοξίνη B ₁ (Μυκοτοξίνη)	• Οργανικοί διαλύτες: Τολουόλιο
• Νιτροζαμίνες: NNK	

* (Eaton D.L., 1995, Rendic S., 2002, Flockhart D.A., 2007)

Το γονίδιο του CYP1A2 παρουσιάζει παρόμοιο πρότυπο ρύθμισης με το γονίδιο του κυτοχρώματος CYP1A1, ρυθμίζεται και αυτό από το σύστημα AhR (Kilic T., 2006), με την μόνη διαφορά ότι το κυτόχρωμα CYP1A2 εκφράζεται στο ήπαρ, πιθανώς λόγω της συμμετοχής του HNF (Hepatocyte Nuclear Factor) στην ρύθμιση (Quattrochi L.C., 1994). Εκτενής αναζητήσεις δεν έχουν βρει σημαντική έκφρασή του σε ανθρώπινους πνεύμονες (Shimada T., 1996). Έχει βρεθεί ότι αυξάνεται η έκφραση καθώς και η δραστηριότητα των κυτοχρωμάτων της υποοικογένειας CYP1A στους πνεύμονες και το ήπαρ μετά από έκθεση σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Anttila S., 2001). Πολλά στοιχεία δείχνουν ότι το επίπεδο έκφρασης του κυτοχρώματος CYP1A2 στο ήπαρ είναι σημαντικό και αποτελεί ~6-13% του συνολικού κυτοχρώματος P-450 κατά μέσο όρο, με τα επίπεδα να ποικίλλουν έως και 40-φορές μεταξύ των ατόμων. Τέλος, το κυτόχρωμα CYP1A2 δεν είναι απαραίτητο για την σωστή ανάπτυξη καθώς και για την φυσιολογική ομοιόσταση σε μύες (Gonzalez J.F., 2002).

1.7.2 Υποοικογένεια CYP1B

Από την υποοικογένεια CYP1B, το κυτόχρωμα CYP1B1 αποτελεί και αυτό ένα σημαντικό ένζυμο στην βιοενεργοποίηση των προ-καρκινογόνων ουσιών. Η καταλυτική του ιδιότητα ευρίσκεται μεταξύ των κυτοχρωμάτων CYP1A1 και CYP1A2 (Shimada T.,

1998). Είναι κυρίως εξωηπατική ισομορφή, καθώς η βασική έκφρασή του στο ήπαρ είναι σχεδόν μηδενική. Σε ενήλικες ανθρώπους υπάρχει μόνο μικρή ανιχνεύσιμη έκφραση στο ήπαρ αλλά εκφράζεται σε μεγαλύτερα ποσά στους νεφρούς, την σπλήνα, τον θύμο αδέν, τον προστάτη, τις ωοθήκες, το λεπτό έντερο, το κόλον, την μήτρα, τους μαστικούς αδένες καθώς και στους πνεύμονες (Shimada T., 1998, Hayes C.L., 1996). Πολλοί από αυτούς τους ιστούς είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος λόγω των όγκων που αναπτύσσονται σε αυτούς. Έχει αναφερθεί να υπερεκφράζεται το κυτόχρωμα CYP1B1 σε όγκους, το οποίο μπορεί να αποτελεί έναν παθολογικό δείκτη (Muggay G.I., 1997).

Το κυτόχρωμα CYP1B1 έχει πολλά υποστρώματα, πολλά από τα οποία τα μετατρέπει σε δραστικά καρκινογόνα. Σε αυτά ανήκουν οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) και τα οξυγονωμένα παράγωγά τους, ετεροκυκλικές αμίνες και αρωματικές αμίνες (Shimada T., 1998, Hayes C.L., 1996). Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται χαρακτηριστικά υποστρώματα του κυτοχρώματος CYP1B1.

Πίνακας 1.10*: Αντιπροσωπευτικά υποστρώματα του CYP1B1

Υποστρώματα του CYP1B1

- | | |
|---|--------------------------------------|
| • Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs): | • Αρωματικές αμίνες |
| - Βενζο[α]πυρένιο (B[a]P) | • Ετεροκυκλικές αμίνες |
| - 7,12-διμεθυλοβενζο[α]ανθρακενίου (DMBA) | • Νιτροπολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες |
| - Διβενζο[α,λ]πυρένιο | • Ρετινοϊκό οξύ |
| - Βενζο[α]ανθρακένιο | • Αραχιδονικό οξύ |
| - 5-Μεθυλχρυσένιο | • Οιστρογόνα |
-

*(Shimada T., 1998)

Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι η παρατήρηση ότι το ανθρώπινο κυτόχρωμα CYP1B1 είναι το ίδιο δραστικό με το κυτόχρωμα CYP1A1 στην μετατροπή του γνωστού καρκινογόνου βενζο[α]πυρενίου στην 7,8-διϋδροδιόλη, που αποτελεί το πρώτο βήμα στον σχηματισμό του τελικού δραστικού καρκινογόνου (Shimada T., 1999). Τα τελικά όμως προϊόντα που σχηματίζονται διαφέρουν μεταξύ τους (Gonzalez J.F., 2001).

Στην περίπτωση χορήγησης 7,12-διμεθυλοβενζο[α]ανθρακενίου (DMBA: 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene) παρατηρήθηκε σε μύες knockout στο γονίδιο CYP1B1, να εμφανίζονται λεμφώματα σε ποσοστό 7,5% λιγότερο σε σχέση με τους μύες αγρίου τύπου (wild type). Επιπλέον, τα CYP1B1-null ζώα δεν εμφάνισαν κανένα καρκίνωμα

κυττάρων του δέρματος. Τα αποτελέσματα αυτά δεικνύουν τον σημαντικό ρόλο του κυτοχρώματος CYP1B1 στην βιοενεργοποίηση των προ-καρκινογόνων ουσιών (Gonzalez J.F., 2001).

Πειράματα που διεξήχθησαν *in vitro* δείχνουν ότι και στο κυτόχρωμα CYP1B1 η έκφραση ρυθμίζεται από το σύστημα AhR-ARNT (Sutter T.R., 1991). Σε αντίθεση με το κυτόχρωμα CYP1A1 και ιδιαίτερα το κυτόχρωμα CYP1A2 (βλέπε ανωτέρω), υπάρχουν περιορισμένα αποδεικτικά στοιχεία για την επαγωγή του ανθρώπινου CYP1B1. Έχει παρατηρηθεί όμως σημαντική αύξηση της έκφρασης του κυτοχρώματος CYP1B1 (σε επίπεδο πρωτεΐνης) σε ανθρώπινους πνεύμονες σε άτομα που δήλωναν καπνιστές. Σημειώνεται ότι τα επίπεδα της μικροσωμιακής πρωτεΐνης ήταν ακόμη υψηλότερα σε πρώην καπνιστές (Kim J.H., 2004). Εκτός από τη ρύθμιση μέσω του συστήματος AhR, το ανθρώπινο γονίδιο του κυτοχρώματος CYP1B1 ρυθμίζεται επίσης από τα οιστρογόνα μέσω του υποδοχέα οιστρογόνων (Estrogen Receptor, ER) (Tsuchiya Y., 2004) καθώς επίσης και από microRNA (Tsuchiya Y., 2006). Τέλος, όπως και τα άλλα δύο κυτοχρώματα, έτσι και το κυτόχρωμα CYP1B1 δεν είναι απαραίτητο για την σωστή ανάπτυξη καθώς και για την φυσιολογική ομοίωση σε μύες (Gonzalez J.F., 2002).

1.8 Σχιζοφρένεια και Καρκίνος

1.8.1 Εισαγωγή στη Σχιζοφρένεια

Η σχιζοφρένεια είναι μια ψυχική διαταραχή που συχνά χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογική κοινωνική συμπεριφορά και την αδυναμία του ασθενούς να διακρίνει τι είναι πραγματικό και τι όχι. Στα συμπτώματα συμπεριλαμβάνονται εσφαλμένες πεποιθήσεις, ασαφής σκέψη ή σύγχυση, ακουστικές ψευδαισθήσεις, μειωμένη κοινωνική δέσμευση, μειωμένη συναισθηματική έκφραση και η έλλειψη κινήτρων. Η διάγνωση βασίζεται στην συμπεριφορά που παρατηρείται καθώς και τις εμπειρίες που αναφέρει το άτομο. Τα συμπτώματα αρχίζουν συνήθως στην αρχή της ενηλικίωσης, και περίπου το 0.3-0.7% των ανθρώπων επηρεάζονται κατά την διάρκεια της ζωής τους. Σημαντικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση φαίνεται να είναι οι γενετικοί παράγοντες και το αρχικό περιβάλλον που μεγαλώνει το άτομο (van Os J., 2009). Εκτιμάται ότι το 2013 υπήρχαν 23.6 εκατομμύρια περιπτώσεις σχιζοφρένειας σε παγκόσμιο επίπεδο. Ο μέσος όρος του προσδόκιμου ζωής των ανθρώπων με την

διαταραχή αυτή είναι 10-20 χρόνια λιγότερο από το προσδόκιμο ζωής των φυσιολογικών ατόμων (Laurson T.M., 2012). Αυτό είναι κυρίως αποτέλεσμα αυξημένων προβλημάτων σωματικής υγείας αλλά και λόγω της εμφάνισης υψηλότερου ποσοστού αυτοκτονίας, περίπου 5% (Hor K., 2010).

Η σχιζοφρένεια συνδέεται με λεπτές διαφορές στις δομές του εγκεφάλου που βρέθηκαν στο 40-50% των περιπτώσεων καθώς και στην χημεία του εγκεφάλου κατά την διάρκεια οξείων ψυχωτικών καταστάσεων. Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στη λειτουργία της ντοπαμίνης στο σύστημα ανταμοιβής (Reward System) του εγκεφάλου (van Os J., 2009). Η εστίαση αυτή οφείλεται σε μεγάλο βαθμό από το τυχαίο εύρημα ότι τα φάρμακα της ομάδας των φαινοθειαζινών, τα οποία εμποδίζουν την λειτουργία της ντοπαμίνης, μειώνουν τα ψυχωτικά συμπτώματα. Επίσης, υποστηρίζεται από το γεγονός ότι οι αμφεταμίνες, που ενεργοποιούν την απελευθέρωση της ντοπαμίνης, μπορεί να επιδεινώσουν τα ψυχωτικά συμπτώματα στην σχιζοφρένεια (Laguette M., 1996). Στη νόσο αυτή η επιρροή της ντοπαμίνης είναι σημαντική. Ειδικά, η υπερβολική ενεργοποίηση των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων είναι η αιτία για τα θετικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας (van Os J., 2009).

Έτσι, σήμερα για την αντιμετώπιση χρησιμοποιούνται αντιψυχωτικά φάρμακα που μειώνουν τα θετικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας (van Os J., 2009). Στα φάρμακα που χρησιμοποιούνται ανήκουν η σουλπιρίδη, η αμισουλπιρίδη, η ολανζαπίνη, ρισπεριδόνη και η κλοζαπίνη. Τα φάρμακα αυτά δρουν κυρίως ως ανταγωνιστές των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων (Barry S.J.E., 2012). Πρέπει να τονιστεί ότι πολλά από τα φάρμακα αυτά δεν δρουν εκλεκτικά επί των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων αλλά εμφανίζουν περιορισμένη δράση ανταγωνιστών και στους άλλους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς καθώς και στους υποδοχείς της σεροτονίνης (5-HT, 5-υδροξυτρυπταμίνης) καθώς και άλλους υποδοχείς (Barry S.J.E., 2012).

1.8.2 Φάρμακα κατά της Σχιζοφρένειας

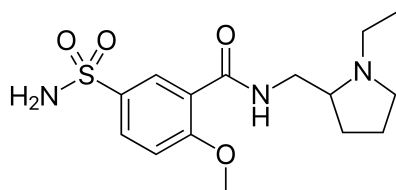
Τα αντιψυχωσικά φάρμακα (που ονομάζονται επίσης νευροληπτικά ή μείζονα ηρεμιστικά) χρησιμοποιούνται κυρίως για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας. Η χρήση των αντιψυχωσικών φαρμάκων περιλαμβάνει μια δύσκολη εξισορρόπηση μεταξύ του οφέλους που προκύπτει από την ανακούφιση των ψυχωσικών συμπτωμάτων και του κινδύνου εμφάνισης μια ευρείας ποικιλίας ενοχλητικών ανεπιθύμητων ενεργειών.

Τα αντιψυχωσικά φάρμακα δεν είναι θεραπευτικά και δεν εξαλείφουν τις χρόνιες διαταραχές της σκέψης. Συχνά μειώνουν την ένταση των ψευδαισθήσεων και των παραισθήσεων και επιτρέπουν στο άτομο με σχιζοφρένεια να λειτουργήσει σε ένα υποστηρικτικό περιβάλλον. Τα φάρμακα αυτά χωρίζονται σε πρώτης και δεύτερης γενιάς. Ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η σουλπιρίδη.

Σουλπιρίδη: Η σουλπιρίδη ανήκει στα τυπικά (κλασικά) αντιψυχωσικά φάρμακα. Είναι χημικά και κλινικά παρόμοιο φάρμακο με την αμισουλπιρίδη. Χημικά κατατάσσεται στην ομάδα των βενζαμιδίων (Bressolle F., 1992). Χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία της ψύχωσης που σχετίζεται με την σχιζοφρένεια. Έχει χρησιμοποιηθεί τόσο στην μονοθεραπεία αλλά και ως συμπληρωματική θεραπεία (στην περίπτωση εμφάνισης αντίστασης) στη σχιζοφρένεια. Επίσης χρησιμοποιείται στην μείζονα καταθλιπτική διαταραχή, και μερικές φορές σε χαμηλή δοσολογία για τη θεραπεία του άγχους και της ήπιας κατάθλιψης (Wang J., 2010, Taylor D., 2012).

Η σουλπιρίδη είναι συνήθως καλά ανεκτό, παρουσιάζοντας λίγες παρενέργειες. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται η κεφαλαλγία, ζάλη, αϋπνία, ναυτία, εμετός, αντιχολινεργικά συμπτώματα (δυσκοιλιότητα, ξηρό στόμα, θολή όραση) αλλά και προβλήματα στο εξωπυραμιδικό σύστημα, όπως τρόμος, δυστονία, παρκινσονισμός (Pani L., 2002).

Η σουλπιρίδη είναι ένας εκλεκτικός ανταγωνιστής στους υποδοχείς της ντοπαμίνης D₂ και D₃. Η δράση αυτή κυριαρχεί σε δόσεις άνω των 600mg ημερησίως. Σε δόσεις των 600mg έως 1.600mg η σουλπιρίδη εμφανίζει ήπια κατασταλτική και αντιψυχωτική δραστηριότητα. Σε χαμηλές δόσεις (κυρίως 50mg έως 200mg ημερησίως) προεξέχον χαρακτηριστικό γνώρισμα της είναι ο ανταγωνισμός των προσυναπτικών D₂ ανασταλτικών υποδοχέων της ντοπαμίνης. Σε αυτή την ιδιότητά της οφείλεται η αντικαταθλιπτική και διεγερτική δράση της και έτσι, σε αυτές τις δόσεις χρησιμοποιείται ως αντικαταθλιπτικό δεύτερης γραμμής (Bell C., 2013).



Εικόνα 1.10: Χημική δομή σουλπιρίδης

(πηγή: sigmaaldrich.com)

1.8.3 Ποσοστό Εμφάνισης Καρκίνου σε Σχιζοφρενείς

Ήδη από το 1909 παρατηρήθηκε ότι ασθενείς με σχιζοφρένεια εμφάνιζαν χαμηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Το εύρημα αυτό υποστηρίχθηκε 70 χρόνια αργότερα (du Pan R.M., 1977). Σήμερα υπάρχουν αρκετές επιστημονικές μελέτες, που αναφέρουν χαμηλότερο ποσοστό εμφάνισης καρκίνου σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (Grinshroon A., 2005, Dalton S.O., 2006, Hippisley-Cox J., 2007), ενώ υπάρχουν και μερικές που υποστηρίζουν το αντίθετο (Lichtermann D., 2001). Αυτή η διαφορά στα αποτελέσματα οφείλεται σε διαφορές στους τύπους καρκίνου, την εθνικότητα, το φύλο καθώς και στον τρόπο ζωής των ασθενών. Επιπλέον, υπάρχει μια σειρά από μελέτες, που έχουν αποδείξει αυξημένο ποσοστό θνησιμότητας στους ασθενείς με σχιζοφρένεια (Chou F.H., 2011).

Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν σε διάφορες χώρες, έχουν διαπιστώσει επίσης μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε ασθενείς με σχιζοφρένεια σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό (Goldacre M.J., 2005, Dalton S.O., 2006, Leucht S., 2007, Chou F.H., 2011), ειδικά, μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (Mortensen P.B., 1989, Mortensen P.B., 1994, Gulbinat W., 1992). Αυτό οδήγησε στην διατύπωση θεωριών ότι οι ασθενείς με σχιζοφρένεια μπορεί να έχουν δραστικά ογκοκατασταλτικά γονίδια ή ενισχυμένη δραστηριότητα των κυττάρων φυσικών δολοφόνων (Natural Killer Cells, NKC) (Rybakowski J.K., 2009, Tabares-Seisdedos R., 2009).

Μια άλλη υπόθεση ισχυρίζεται ότι τα αντιψυχωτικά φάρμακα που λαμβάνουν οι ασθενείς μπορεί να κατέχουν, τα ίδια, αντι-νεοπλασματικές δράσεις (Yde C.W., 2009, Wiklund E.D., 2010) αλλά επίσης μπορεί να αναστέλλουν και τον μεταβολισμό πολλών προ-καρκινογόνων ουσιών σε δραστικές καρκινογόνες μορφές (Daskalopoulos E.P., 2012, Harkitis P., 2015).

1.8.4 Ρύθμιση Κυτοχρωμάτων μέσω Ντοπαμινεργικού Συστήματος

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το ψυχολογικό στρες και τα μονοπάτια που είναι συνδεδεμένα με τους αδρενεργικούς υποδοχείς (Adrenergic Receptors, AR) μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση των ενζύμων του κυτοχρώματος P-450 (Konstandi M. & Radon-Camus A.M. *et al.*, 1998, Konstandi M. & Kostakis D. *et al.*, 1998, Konstandi M. & Malamas M. *et al.*, 2000, Konstandi M. & Camus-Radon A.M., 2000,

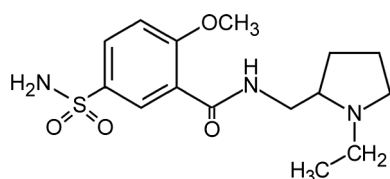
Konstandi M., 2004, Konstandi M., 2013). Ειδικά, με την εφαρμογή ψυχολογικού στρες αυξάνεται η έκφραση του CYP1A1/2 στο ήπαρ μυών και επιμύων (Konstandi M., 2004, Konstandi M., 2005, Flint M.S., 2010). Επίσης, οι αγωνιστές και ανταγωνιστές των αδρενεργικών υποδοχέων (AR) καθώς και φάρμακα που τροποποιούν την κεντρική και περιφερειακή δραστηριότητα κατεχολαμινών επηρεάζουν σημαντικά τη βασική αλλά και την επαγόμενη από το βενζο[α]πυρένιο έκφραση των κυτοχρωμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν τον ισχυρό ρυθμιστικό ρόλο του στρες και των σχετιζόμενων αδρενεργικών οδών σηματοδότησης στη ρύθμιση της βασικής έκφρασης καθώς και της επαγόμενης έκφρασης των κυτοχρωμάτων από το βενζο[α]πυρένιο (Konstandi M., 2004, Konstandi M., 2006).

Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και τα ντοπαμινεργικά συστήματα στην ρύθμιση διαφόρων ισομορφών του κυτοχρώματος P-450, που μεταβολίζουν την πλειοψηφία των σημερινών συνταγογραφούμενων φαρμάκων (Konstandi M., 2008, Daskalopoulos E.P., 2012). Ειδικότερα, η αναστολή των ντοπαμινεργικών D₂-υποδοχέων καταστέλλει σε σημαντικό βαθμό την ηπατική έκφραση των ενζύμων του κυτοχρώματος CYP1A1/2, CYP1B1, CYP2C11, CYP2D1/2, CYP2E1 και CYP3A σε επίμυες (Konstandi M., 2008, Daskalopoulos E.P., 2012, Harkitis P., 2015). Σε αυτό το ρυθμιστικό μονοπάτι ιδιαίτερα κρίσιμος είναι ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης/PI3K/AKT (Woodcroft K.J., 2002).

Η ρύθμιση των κυτοχρωμάτων που μεσολαβείται από τα σηματοδοτικά μονοπάτια συνδεδεμένα με τους D₂-ντοπαμινεργικούς υποδοχείς είναι ιδιαίτερα σημαντική. Ένα ευρύ φάσμα φαρμάκων που συνταγογραφούνται για ποικίλες νευροεκφυλιστικές και ψυχοπαθολογικές ασθένειες, όπως για παράδειγμα σχιζοφρένεια, ψύχωση, κατάθλιψη, διπολική διαταραχή αλλά και την ασθένεια του Πάρκινσον ασκούν την δράση τους κυρίως μέσω των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων (Beaulieu J.M., 2011). Τα φάρμακα αυτά δρουν είτε ως αγωνιστές ή ως ανταγωνιστές D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων και έτσι είναι σε θέση να τροποποιούν την δραστηριότητα πολλών ορμονικών οδών, συμπεριλαμβανομένου και του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης/PI3K/AKT. Με αυτόν τον τρόπο επηρεάζουν την έκφραση διαφόρων ισομορφών του κυτοχρώματος P-450, που εμπλέκονται στο μεταβολισμό φαρμάκων, τοξικών ουσιών, προ-καρκινογόνων και καρκινογόνων. Ωστόσο, η αναστολή ισομορφών του κυτοχρώματος P-450, που μεταβολίζουν κλινικώς χρησιμοποιούμενα φάρμακα, πιθανώς να οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα φαρμάκων στο σώμα, συνθήκη που μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες, ιδίως όταν τα φάρμακα χαρακτηρίζονται

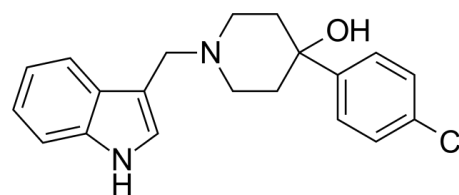
από χαμηλό θεραπευτικό δείκτη (Spatzenegger M., 1995). Είναι σημαντικό, ιδιαίτερα σε θεραπευτικά σχήματα πολλαπλών φαρμάκων, να γνωρίζουμε τις δυνατότητες για τις πιθανές αλληλεπιδράσεις φαρμάκων μεταξύ τους, καθώς ο μεταβολισμός τους μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ή αυξημένη αποτελεσματικότητα φαρμάκων, σοβαρή τοξικότητα ή ακόμα και ογκογένεση (Konstandi M., 2004, Gonzalez F.J., 1994).

Πρόσφατες πειραματικές μελέτες που διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων έδειξαν ότι δύο εκλεκτοί ανταγωνιστές των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων, η σουλπιρίδη και ο L-741,626, καταστέλλουν δραστικά την σύνθεση κυτοχρωμάτων, που μεταβολίζουν τα πιο γνωστά προ-καρκινογόνα, εμποδίζοντας την βιομετατροπή τους σε ενεργά καρκινογόνα (Konstandi M., 2008, Daskalopoulos E.P., 2012, Harkitis P., 2015).



Εικόνα 1.11: Χημική δομή σουλπιρίδης

(πηγή: sigmaaldrich.com)



Εικόνα 1.12: Χημική δομή L-741,626

(πηγή: sigmaaldrich.com)

Τα αποτελέσματα των προηγούμενων μελετών αποδεικνύουν ότι φάρμακα που δρουν ως ανταγωνιστές των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων είναι σε θέση να τροποποιήσουν διάφορα ορμονικά συστήματα που ρυθμίζουν τα κυτοχρώματα CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 αλλά και CYP3A. Ειδικά, η χορήγηση σουλπιρίδης, καθώς και του περισσότερο εκλεκτικού D₂-ντοπαμινεργικού ανταγωνιστή L-741,626, σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα οδήγησε σε σημαντική μείωση στην έκφραση των παραπάνω αναφερόμενων κυτοχρωμάτων στο ήπαρ επιμύων. Στην περίπτωση της οικογένειας CYP1 η μείωση στην έκφραση που προκάλεσε η σουλπιρίδη περιλαμβάνει τόσο τη βασική έκφραση των κυτοχρωμάτων αλλά και την από βενζο[α]πυρένιο επαγόμενη έκφραση. Η βασική έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 φαίνεται να υφίσταται μείωση στην έκφρασή τους, με την μεσολάβηση της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού ινσουλίνη/PI3K/AKT (Daskalopoulos E.P., 2012, Harkitis P., 2015).

Συγκεκριμένα, στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η επίδραση της σουλπιρίδης και του βενζο[α]πυρένιου στην έκφραση των ολικών κυτοχρωμάτων, των κυτοχρωμάτων CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1, μαζί με τους υπεύθυνους μεταγραφικούς παράγοντες AhR, AhRR, ARNT και HSP90, καθώς και των κυτοχρωμάτων CYP3A1 και CYP3A2, μαζί με τον υπεύθυνο πυρηνικό παράγοντα PXR.

	Control	Sulpiride	B[α]P	B[α]P+Sulpiride
Ολικά κυτοχρώματα	-	↓	↑	↓
CYP1A1	-	↓	↑	↓
CYP1A2	-	↓	↑	↓
CYP1B1	-	↓	↑	↓
AhR	-	↓	↑	↓
AhRR	-	-	↑	↑↑
ARNT	-	-	↑	↓
HSP90	-	↑	↑	↓
CYP3A1	-	↓		
CYP3A2	-	↓		
PXR	-	↓		

Εικόνα 113: Μειωρύθμιση στην βασική και επαγόμενη με βενζο[α]πυρένιο (B[α]P) έκφραση κυτοχρωμάτων στο ήπαρ επιμύων μετά τη χορήγηση σουλπιρίδης (Daskalopoulos E.P., 2012, Harkitis P., 2016).

Διαπιστώνεται ότι η σουλπιρίδη προκάλεσε σημαντική μείωση στα ολικά κυτοχρώματα στο ήπαρ επιμύων. Το ολικό περιεχόμενο κυτοχρωμάτων αυξήθηκε σημαντικά μετά από B[α]P και η αύξηση αυτή ανεστάλη από την σουλπιρίδη. Παρατηρήθηκε επίσης, μείωση στα επίπεδα της βασικής έκφρασης των κυτοχρωμάτων CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1, σε επίπεδο mRNA και αποπρωτεΐνης μετά την χορήγηση Sulp. Αξίζει να σημειωθεί ότι η Sulp μείωσε σημαντικά την επαγωγή με B[α]P των CYP1A1/2 και CYP1B1 στο ήπαρ επιμύων. Η μείωση αυτή φαίνεται να μεσολαβείται από καταστολή των μεταγραφικών παραγόντων AhR, HSP90 και ARNT και αυξορρύθμιση του AhRR μετά από σουλπιρίδη. Η σουλπιρίδη επίσης, περιόρισε σημαντικά την βασική έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP3A1 και CYP3A2 στο ήπαρ

επιμύων, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης (Εικόνα 1.13) (Daskalopoulos E.P., 2012, Harkitis P., 2016).

Αυτή η μείωση στην έκφραση των κυτοχρωμάτων μπορεί να επηρεάζει την τοξικότητα και καρκινογένεση, που μπορεί να προκαλέσουν πολυάριθμες τοξικές και προ-καρκινογόνες ουσίες. Ως εκ τούτου, αυτά τα φάρμακα θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως ένα μέρος της στρατηγικής για την μείωση του κινδύνου έκθεσης σε περιβαλλοντικούς ρύπους και προ-καρκινογόνες ουσίες. Ως γνωστόν, οι τρεις αυτές ισομορφές του κυτοχρώματος (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1), μαζί με την υποοικογένεια CYP3A, ευθύνονται σε σημαντικό βαθμό για τον μεταβολισμό των προ-καρκινογόνων σε ενεργά καρκινογόνα (Harkitis P., 2015).

1.9 Σκοπός της Έρευνας

Στα πλαίσια ευρείας έρευνας, που μελετά την πιθανή αντικαρκινική δράση των αντιψυχωσικών φαρμάκων, η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία διερευνά την επίδραση της σουλπιρίδης (εκλεκτικού D₂-ντοπαμινεργικού ανταγωνιστή – κοινό χαρακτηριστικό όλων των αντιψυχωσικών φαρμάκων), σε μηχανισμούς που εμπλέκονται στην καρκινογένεση. Έμφαση δόθηκε στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων του P-450, που καταλύουν τη βιομετατροπή προ-καρκινογόνων σε δραστικά καρκινογόνα, καθώς και η αποτοξίνωση από καρκινογόνα. Μελετήθηκε επίσης η επίδραση της σουλπιρίδης στον πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα. Η μελέτη αυτή έγινε τόσο *in vivo*, σε πειραματικά μοντέλα επιμύων wistar, όσο και σε *in vitro* μοντέλα με την χρήση των καρκινικών κυτταρικών σειρών πνεύμονα, A549 και H1299, που εκτέθηκαν σε σουλπιρίδη.

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Πειραματόζωα

Στα πειράματα της παρούσας μελέτης το στέλεχος επιμύων, που χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση της επίδρασης της σουλπιρίδης (SULP) και του βενζο[α]πυρενίου (B[a]P), ήταν Wistar επίμυες. Συγκεκριμένα, για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά Wistar rats, ηλικίας 3 μηνών και βάρους που κυμαινόταν μεταξύ 250-300g. Η χορήγηση της σουλπιρίδης (12 mg/kg, διαλυμένη σε φυσιολογικό ορό) έγινε 2 φορές την ημέρα υποδορίως (s.c.) για 4 συνεχόμενες μέρες (συνολικά 8 ενέσεις ανά ομάδα). Η ομάδα των μαρτύρων ελάμβανε 2 φορές την ημέρα υποδορίως (s.c) φυσιολογικό ορό. Στους επίμυες, που έγινε χορήγηση βενζο[α]πυρενίου (B[a]P, 10mg/kg διαλυμένο σε ελαιόλαδο, Minerva A.E.), η χορήγηση πραγματοποιήθηκε μια φορά την ημέρα ενδοπεριτοναϊκά (i.p.) για 3 συνεχόμενες μέρες (συνολικά 3 ενέσεις ανά ομάδα). Η τελευταία ένεση B[a]P έγινε 24h πριν την θυσία των πειραματόζωων. Ενώ, η αντίστοιχη ομάδα των μαρτύρων ελάμβανε 1 φορά την ημέρα ελαιόλαδο. Όλες οι παραπάνω χημικές ουσίες είναι της εταιρίας Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Κατά την διάρκεια των πειραμάτων, τα ζώα παρέμεναν σε πλαστικά κλουβιά (Makrolon) με στρώση από ροκανίδι (*Populus* sp.) στο εσωτερικό τους. Ο αριθμός τους ήταν τρεις επίμυες ανά κλουβί και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και σε τυποποιημένη και καθορισμένης σύστασης τροφή (Biozoe, Greece). Ο χώρος διαμονής των πειραματόζωων στο Εκτροφείο του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, διαθέτει σύστημα εξαερισμού και κεντρική θέρμανση που εξασφαλίζει υγιεινές συνθήκες διαβίωσης (θερμοκρασία 22°C και υγρασία 50-60%). Ο φωτισμός είναι ρυθμισμένος έτσι ώστε να υπάρχει σταθερός κύκλος φωτός-σκότους 12 ωρών.

Με το πέρας των πειραμάτων, δύο ώρες μετά την τελευταία χορήγηση φαρμάκων, τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό. Λήφθηκαν μέρη από τους πνεύμονες, για την απομόνωση μικροσωματίων και ολικού RNA. Τα δείγματα ιστού διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την ανάλυση.

2.2 Καλλιέργεια Καρκινικών Κυτταρικών Σειρών Πνεύμονα

Χρησιμοποιήθηκαν οι καρκινικές κυτταρικές σειρές πνεύμονα H1299 και A549. **A549:** Είναι μια ανθρώπινη καρκινική σειρά μη-μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (NSCLC) και πιο συγκεκριμένα για αδenoκαρκίνωμα. Προέρχονται από

βασικά επιθηλιακά κύτταρα των κυψελίδων του πνεύμονα, που απομονώθηκαν από έναν 58-χρονο Καυκάσιο άντρα, ο οποίος έπασχε από καρκίνο του πνεύμονα (Yuanguang L., 1998).

H1299: Η κυτταρική σειρά H1299 είναι επίσης μια ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά μη-μικρού κυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (NSCLC). Προέρχεται από λεμφαδένα, που υπέστη μετάσταση (Giaccone G., 1992). Όπως και στις άλλες αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές, τα κύτταρα H1299 μπορούν να διαιρεθούν επ' αόριστον. Τα κύτταρα αυτά έχουν μερική ομόζυγη διαγραφή του γονιδίου TP53 και ως εκ τούτου, δεν εκφράζουν την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, έλλειψη που εν μέρει ευθύνεται για το πολλαπλασιαστικό δυναμικό τους (Lin D.L., 1996). Έχει αναφερθεί επίσης ότι εκκρίνουν το ορμονικό πεπτίδιο νευρομεδίνη B (Giaccone G., 1992).

Η κυτταρική σειρά H1299 ήταν ευγενική χορηγία του Καθηγητού κ. Δημητρίου Γαλάρη, διευθυντού του Εργαστηρίου της Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής, ενώ η κυτταρική σειρά A549 ήταν ευγενική χορηγία του κ. Ευάγγελου Κωλέττα, Επίκουρου Καθηγητού, του Εργαστηρίου Βιολογίας. Ο χειρισμός τους γίνονταν σε εστία κάθετης νηματικής ροής (laminar flow hood) για την αποτροπή ανεπιθύμητων μολύνσεων και η καλλιέργεια γίνονταν σε ειδικά κατεργασμένα τρυβλία ή φλάσκες (Corning, New York, USA). Ως θρεπτικό υλικό, και στις δύο περιπτώσεις, χρησιμοποιήθηκε το DMEM(1x)+GlutaMAX™ (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), το οποίο εμπλουτίσαμε με FBS 10% (Fetal Bovine Serum, Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη 1% (P/S, penicillin/streptomycin, Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ για τη διατήρηση σταθερού pH.

Για τις πλύσεις χρησιμοποιήθηκε Phosphate Buffered Saline (PBS) (Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε το Trypsin/EDTA solution (0.05%/0.02% w/v, Biochrom GmbH, Berlin, Germany). Τα κύτταρα καταψύχονταν στους -80°C για μελλοντική χρήση σε εμβρυϊκό ορό μόσχου (Gibco® FBS, Fetal Bovine Serum, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), που περιείχε 10% (v/v) DiMethyl SulfOxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), ενώ την επόμενη μέρα μεταφέρονταν στο υγρό άζωτο.

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής φάρμακα και ουσίες.

Πίνακας 2.1: Φαρμακευτικοί παράγοντες, προέλευση και συνθήκες συντήρησης

Φάρμακο	Εταιρία	Θερμοκρασία Αποθήκευσης
Benzopyrene (B[α]P)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	-20°C
Sulpiride (SULP)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	-20°C
Dimethyl-sulfoxide (DMSO)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	-20°C

Η καρκινική κυτταρική σειρά A549 εκτέθηκε στο βενζο[α]πυρένιο (B[α]P, 10μM για 24h), στην σουλπιρίδη (SULP, 10μM για 6h), καθώς και ταυτόχρονα σε SULP 10μM και B[α]P 10μM για 24h. Ως ομάδα αναφοράς λειτούργησε η ομάδα κυττάρων, που εκτέθηκε σε διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO, με τελική συγκέντρωση 1:1000) για 24h.

Η καρκινική κυτταρική σειρά πνεύμονα H1299 εκτέθηκε επίσης, σε βενζο[α]πυρένιο (B[α]P, 10μM) για 24h, σε σουλπιρίδη (SULP, 10μM) για 6h, όπως και ταυτόχρονα σε SULP 10μM και B[α]P 10μM για 24h. Ως μάρτυρας λειτούργησε η ομάδα κυττάρων, που εκτέθηκε σε διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO, με τελική συγκέντρωση 1:1000) για 24h.

Σε προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φαρμακολογίας, χρησιμοποιήθηκαν αρκετές συγκεντρώσεις της σουλπιρίδης (1-25 μM) και αποδείχθηκε ότι η συγκέντρωση της σουλπιρίδης για 10 μM ήταν αυτή που επέφερε τα καλύτερα αποτελέσματα στην έκφραση των κυτοχρωμάτων.

Η συγκέντρωση αυτή του DMSO (1:1000) είναι αυτή που αποδείχθηκε σε προηγούμενα πειράματα ότι δεν προκαλεί κυτταρικό θάνατο στις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούμε.

2.3 Απομόνωση Μικροσωμακών Πρωτεϊνών

Η απομόνωση μικροσωμακών πρωτεϊνών έγινε από πνεύμονες επιμύων. Καθ' όλη την διάρκεια τα δείγματα και τα διαλύματα διατηρούταν στον πάγο. Τηρήθηκε η ακόλουθη διαδικασία: αφού έχει αφαιρεθεί ο επιθυμητός ιστός από τους επίμυες,

ζυγίζονται ~2g και τοποθετούνται σε παγωμένο ρυθμιστικό ολικό διάλυμα (Buffer) ομογενοποίησης 8ml (Homogenization Buffer, 0.15M KCl, 10mM K₂EDTA, 1mM Dithiothreitol, pH 7.4). Ταυτόχρονα, ο ιστός κόβεται σε μικρά κομματάκια για να ελευθερωθεί το αίμα και γίνεται ομογενοποίηση του δείγματος. Ύστερα, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του ομογενοποιημένου για 20min στις 11.000 rpm, σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά σε νέους σωλήνες (vials) και φυγοκεντρείται για 60min στις 27.500 rpm, σε θερμοκρασία 4°C. Αφαιρείται η υγρή φάση, το ίζημα (pellet) πλένεται (με διάλυμα ομογενοποίησης) και γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος σε διάλυμα ομογενοποίησης, ώστε να σχηματιστεί ένα ομογενοποιημένο. Ακολουθεί άλλη μια φυγοκέντρηση για 45min στις 27.500 rpm, σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται, πλένεται το ίζημα, προστίθενται 2ml παγωμένου διαλύματος αποθήκευσης (Storage Buffer, 1M K₂HPO₄/KH₂PO₄, 1mM K₂EDTA, 0.1mM Dithiothreitol, pH 7.4) και γίνεται ομογενοποίηση του μείγματος. Τα μικροσωματικά δείγματα διατηρούνται στους -80°C ως την ανάλυσή τους.

2.4 Ανάλυση Πρωτεϊνών με την Μέθοδο της Ανοσοαποτύπωσης

Μελετήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση με την μέθοδο ανοσοαποτύπωσης (immunoblotting) κατά Western Blotting. Για την ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης απαιτούνται τα εξής στάδια:

- α) απομόνωση εκχυλίσματος πρωτεϊνών
- β) υπολογισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος
- γ) ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών
- δ) μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- ε) κάλυψη των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης και επώαση με αντισώματα
- στ) ανοσοαποτύπωση κατά Western και
- ζ) ποσοτικοποίηση.

2.4.1 Υπολογισμός της Συγκέντρωσης του Πρωτεϊνικού Εκχυλίσματος

Υπολογίστηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών με την βοήθεια του Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) στο NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Αρχικά, ετοιμάστηκαν διαλύματα με διαδοχικές αραιώσεις αλβουμίνης από βόειο ορό γνωστής συγκέντρωσης. Στη συνέχεια, από το πρωτεϊνικό δείγμα διαλύονται 2μl σε 38μl d.d.H₂O (1:20), μέσα σε erpendorf. Από κάθε διαλυμένο δείγμα παραλαμβάνονται 5μl και τοποθετούνται σε νέο erpendorf. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 100μl μείγματος από αντιδραστήρια σωλήνα (working reagents) (A & B, 100:2, από το BCA Protein Assay Kit), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ομοίως, για τα διαλύματα κατασκευής της πρότυπης καμπύλης τοποθετούνται 5μl διαλύματος, γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης, μαζί με 100μl μείγματος working reagent σε erpendorf. Για blank χρησιμοποιείται ένα διάλυμα που σε erpendorf τοποθετούνται 5μl d.d. H₂O, μαζί με 100μl μείγματος working reagent. Γίνεται επώαση όλων των διαλυμάτων (δειγμάτων και προτύπων) στους 37°C υπό ανάδευση για 30min. Ύστερα, τοποθετούνται στον πάγο για 5min και διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι να μετρηθούν στο NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) σε απορρόφηση A562nm. Στην αρχή μετράμε τα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης και στη συνέχεια τα δείγματα των πρωτεϊνών για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής τους.

2.4.2 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε Πηκτή Πολυακρυλαμιδίου

Για την επιλογή της βέλτιστης ποσότητας πρωτεΐνης, που έπρεπε να φορτωθεί, έγινε πιλοτική ανάλυση διαφόρων ποσοτήτων πρωτεΐνης (linearization). Έτσι, 7.5μg, 10μg, 15μg και 25μg μικροσωματικής πρωτεΐνης αναλύθηκαν πιλοτικά. Η ποσότητα πρωτεΐνης, που έδωσε το καλύτερο σήμα και ευκρινή διαφορά ανάμεσα στις ομάδες των πειραματόζων που εξετάστηκαν, επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση. Στη συγκεκριμένη ομάδα πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 7.5μg μικροσωματικής πρωτεΐνης.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (sodium dodecyl sulfate), κοινώς SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), αποτελεί το πρώτο βήμα της δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης κατά Western Blot.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή που αποτελείται από δύο μέρη: την πηκτή επιστοιβαξής (stacking gel) [5% μείγμα ακρυλαμιδίου, 1.0 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS, 0.1% (v/v) TEMED] στο πάνω μέρος και την πηκτή διαχωρισμού (separating gel) [7% μείγμα ακρυλαμιδίου, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS, 0,04% (v/v) TEMED] από κάτω.

Στη συνέχεια ετοιμάστηκαν τα δείγματα: 7.5μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος μικροσωματίων αναμείχθηκαν με διάλυμα φόρτωσης Laemmli (4x) (loading buffer) [250mM Tris-HCl (pH 6.8, 8% SDS, 40% Glycerol, 8% Betamercaptoethanol, 0.04% Bromophenol Blue] σε αναλογία 3:1. Το μείγμα επώαστηκε στους 95°C για 5min προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών υπό την επίδραση SDS και β-μερκαπτοαιθανόλης. Το SDS ξετυλίγει τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες και καταστρέφει την δευτεροταγή και τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών και προσδίδει αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο καθιστώντας αμελητέο το ίδιο το φορτίο των πρωτεϊνών. Από την άλλη η β-μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και καταστρέφει την τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή τους. Ως εκ τούτου, οι αποδιαταγμένες πλέον πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάση μοριακού βάρους. Οι πρωτεΐνες με χαμηλό μοριακό βάρος μεταναστεύουν ταχύτερα καταλαμβάνοντας χαμηλότερες θέσεις στο ηλεκτροφερόγραμμα.

Έπειτα, το σύστημα των γυάλινων πλακών με την πηκτή τοποθετήθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini Protean (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Η συσκευή μεταφέρθηκε στη δεξαμενή με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer: 25mM Tris-Base, 250mM Glycine, 0.1% SDS) και τα δείγματα φορτώθηκαν στα πηγάδια της πηκτής, ενώ στο πρώτο πηγαδάκι τοποθετήθηκαν 5μl από το size marker BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA). Ακολούθως, τοποθετήθηκε το κάλυμμα με τα ηλεκτρόδια, τα οποία συνδέθηκαν στην τροφοδοτική συσκευή PowerPac™ Power Supply (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Τέλος, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση στα 100 Volt για 90min. Όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι από την εταιρία Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

2.4.3 Μεταφορά Πρωτεϊνών σε Μembrάνη Νιτροκυτταρίνης

Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε η διαδικασία της υγρής μεταφοράς (wet transfer). Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Nitrocellulose) εντός δεξαμενής με ειδικό διάλυμα μεταφοράς, Transfer Buffer (25mM Tris-Base, 192mM Glycine, 20% v/v Methanol). Όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι από την εταιρία Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε σε διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer) και στη συνέχεια μεταφέρθηκε στο διάλυμα μεταφοράς μαζί με τα: διηθητικό χαρτί, Whatman και σπόγγο από υαλοβάμβακα προκειμένου να εμποτιστεί με το διάλυμα.

Στη συνέχεια, η κασετίνα τοποθετήθηκε στην συσκευή μεταφοράς Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) εντός της δεξαμενής με το διάλυμα. Ακολούθησε η τοποθέτηση των ηλεκτροδίων και η εφαρμογή τάσης 30 Volt overnight στους 4°C προκειμένου να μεταφερθούν όλες οι πρωτεΐνες. Όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι από την εταιρία Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

2.4.4 Κάλυψη των μη Ειδικών Θέσεων της Μεμβράνης (Blocking) και Επώαση με Αντισώματα

Με την ολοκλήρωση της μεταφοράς των πρωτεϊνών στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πραγματοποιήθηκαν τρεις γρήγορες πλύσεις με απιονισμένο νερό προκειμένου να απομακρυνθεί το διάλυμα μεταφοράς. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κάλυψη των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης (blocking) επωάζοντας με άπαχο γάλα 5% (w/v) ή 3% (w/v), διαλυμένο σε Tris-Buffered Saline (TBS) με Tween 20 (TTBS) [50mM Tris-Cl, 150mM NaCl, pH 7.5] για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Η πρωτεΐνη καζεΐνη του γάλακτος προσδένεται στις ακάλυπτες θέσεις της μεμβράνης με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η μη ειδική σύνδεση των πρωτογενών αντισωμάτων. Όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι από την εταιρία Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Ακολούθησαν τρεις γρήγορες πλύσεις με TTBS προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια γάλακτος. Στη συνέχεια, προστέθηκε το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της επιθυμητής προς ανίχνευση πρωτεΐνης, επωάζοντας στους 4°C υπό ανάδευση ολόκληρη την νύχτα (overnight) ή για 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Τα αντισώματα και οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκαν πέντε πλύσεις με TTBS για 5min σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια πρωτογενούς αντισώματος. Ακολούθησε, επώαση με δευτερογενές αντίσωμα (1:1500 ή 1:2000) διαλυμένο σε άπαχο γάλα 5%(w/v) σε διάλυμα TTBS για 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει το Fc τμήμα του πρωτογενούς του ίδιου είδους προέλευσης και

είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση του αγριοράπανου (HRP: Horseradish Peroxidase) που καλύπτει την αντίδραση χημειοφωταύγειας.

Πίνακας 2.2: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν

Αντισώματα	Αραίωση	Επώαση	Δευτερογενές Ab
CYP1A	1:1000 5% dry milk	2h, θερμοκρασία δωματίου	a-mouse 1:2000
CYP1B1	1:350 3% dry milk,	Overnight, 4° C	a-rabbit 1:1500
α -tubulin	1:1000 1% BSA	Overnight, 4° C	a-rabbit 1:1500
D ₂ -R	1:750 3% BSA	Overnight 4°C	a-Rabbit 1:1500
p-CREB	1:500 3%dry milk	Overnight 4°C	a-goat 1:1500

Το αντισώματα CYP1B1, α -tubulin είναι από την εταιρία Abcam[®](Cambridge, MA, USA), ενώ το μη ειδικό αντίσωμα CYP1A καθώς και τα D₂-R και p-CREB, είναι της εταιρίας Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA).

2.4.5 Ανίχνευση Πρωτεϊνών

Με την ολοκλήρωση της επώασης του δευτερογενούς αντισώματος, πραγματοποιήθηκαν πέντε πλύσεις με TTBS σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε ανίχνευση της μπάντας της πρωτεΐνης του ενδιαφέροντος με την προσθήκη υποστρώματος ECL (Amersham GE Healthcare, Little Chalfont, UK) που έχει ως αποτέλεσμα την κατάλυση της οξειδωσης της λουμινόλης (luminol) από το HRP και την εκπομπή φωτός. Διάλυμα λουμινόλης (luminol) αναμείχθηκε με οξειδωτικό παράγοντα σε αναλογία 1:1, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, έγινε επικάλυψη της μεμβράνης με το μείγμα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1min. Οι μπάντες ανιχνεύτηκαν στο ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) με την βοήθεια του προγράμματος QuantityOne[®] (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Μετά την ανίχνευση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος ακολούθησε η ανίχνευση της α -tubulin, που χρησιμεύει ως μάρτυρας ισότιμης φόρτωσης για τις μικροσωματικές πρωτεΐνες.

2.4.6 Ποσοτικοποίηση

Η ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας των πρωτεϊνικών μπαντών έγινε με το λογισμικό ImageJ (NIH, Bethesda, USA). Για την διόρθωση των σφαλμάτων φόρτωσης, η έκφραση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος κανονικοποιήθηκε προς την έκφραση της α -tubulin για τις μικροσωματικές πρωτεΐνες του κυττάρου.

2.5 Ποσοτική Ανάλυση mRNA

Η ανάλυση της έκφρασης mRNA συνίσταται στα εξής στάδια:

- (1) Απομόνωση ολικού RNA από κυτταροκαλλιέργειες ή ιστό.
- (2) Ποσοτικός προσδιορισμός του απομονωθέντος RNA με φωτομέτρηση.
- (3) Αντίστροφη μεταγραφή RNA και σύνθεση cDNA (complementary DNA).
- (4) Προσδιορισμός της έκφρασης mRNA με τη μέθοδο RT-PCR.

2.5.1 Απομόνωση Ολικού RNA

Η απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκε σε κυτταροκαλλιέργειες, ενώ η αντίστοιχη συγκέντρωσή του προσδιορίστηκε με τη φωτομετρική μέθοδο. Συγκεκριμένα, σε ό,τι αφορά σε:

Κυτταροκαλλιέργειες: Για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης TRIzol (Invitrogen™, Carlsbad, USA) που επιτρέπει την απομόνωση RNA ταυτόχρονα με DNA και πρωτεΐνες. Η λύση των κυττάρων έγινε σε πιάτο των 6 πηγαδιών. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- α) Αναρρόφηση και απόρριψη του θρεπτικού μέσου (medium) από κάθε πηγαδάκι (well) του πιάτου και διενέργεια δύο πλύσεων με DPBS (Gibco® by Life Technologies).
- β) Προσθήκη 500μl TRIzol (Invitrogen™, Carlsbad, USA) σε κάθε πηγαδάκι και απόξεση (scraping) του πυθμένα, ώστε να επιτευχθεί η αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα. Η απόξεση έγινε με ειδική ξύστρα (κεφαλή 18mm, Corning, New York, USA). Κατά την αλλαγή από ομάδα σε ομάδα του ίδιου πιάτου, η ξύστρα καθαριζόταν με αιθανόλη 75% και αποστειρωμένη γάζα.
- γ) Ολοκλήρωση της απόξεσης του πυθμένα, συλλογή του περιεχομένου (κύτταρα και TRIzol) του κάθε πηγαδιού και μεταφορά του σε νέο αποστειρωμένο σωληνίσκο eppendorf (RNAases free).

- δ) Προσθήκη 150μl χλωροφορμίου (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) και ανακίνηση (30-40 φορές). Παραμονή του διαλύματος για 5 λεπτά σε πάγο.
- ε) Φυγοκέντρηση στα 13000g για 15 λεπτά, στους 4°C.
- στ) Μεταφορά του υπερκείμενου (ημιδιαφανής φάση) σε νέους αποστειρωμένους σωληνίσκους eppendorf.
- ζ) Προσθήκη 250μl ισοπροπανόλης (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), η οποία είχε διατηρηθεί για λίγα λεπτά μέσα σε πάγο. Προσεκτική ανακίνηση (30-40 φορές).
- η) Παραμονή του διαλύματος για 10 λεπτά σε πάγο.
- θ) Φυγοκέντρηση στα 13000g για 15 λεπτά, στους 4°C.
- ι) Απόρριψη του υπερκείμενου και έκπλυση του ιζήματος με 150μl αιθανόλης 75% (παρασκευασμένη με αποστειρωμένο d.d. H₂O/DEPC) και ανακίνηση (Η ανακίνηση έγινε πολύ προσεκτικά ώστε να μη χαθεί το ίζημα).
- ια) Φυγοκέντρηση στα 7500g για 5 λεπτά, στους 4°C.
- ιβ) Προσεκτική αφαίρεση όλης της ποσότητας της αιθανόλης 75%.
- ιγ) Προσθήκη 200μl αποστειρωμένου d.d. H₂O/DEPC (Invitrogen™, Carlsbad, USA) και προσεκτική ανάδευση με πλήρη και ήπια ομογενοποίηση του διαλύματος RNA.
- ιδ) Ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA με φωτομετρική μέθοδο (χρήση του φωτομέτρου NanoDrop).

2.5.2 Ποσοτικός Προσδιορισμός Απομονωθέντος RNA με Φωτομέτρηση

Η συγκέντρωση των διαλυμάτων RNA που προέκυψαν από την απομόνωση RNA από τις καρκινικές κυτταροκαλλιέργειες ή από τον ιστό προσδιορίστηκε με το φωτόμετρο NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Ο προσδιορισμός με αυτή τη μέθοδο θεωρείται ο ιδανικότερος, διότι:

- α) απαιτούνται μόνο 2μl δείγματος RNA για κάθε μέτρηση
- β) η οπτική πυκνότητα, η ακριβής συγκέντρωση του RNA και ο λόγος απορρόφησης A₂₆₀/A₂₈₀, ο οποίος δίνει σημαντικές πληροφορίες για την καθαρότητα του δείγματος RNA, υπολογίζονται αυτόματα από το πρόγραμμα του H/Y, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με το φωτόμετρο NanoDrop.

2.5.3 Αντίστροφη Μεταγραφή RNA και Σύνθεση cDNA

Η μεταγραφή του RNA σε cDNA έγινε με τη μέθοδο της Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού αντίστροφης μεταγραφής είναι μια υψηλής ευαισθησίας μέθοδος για την μελέτη της έκφρασης του γονιδιώματος (mRNA) από ιστό ή κυτταρικές σειρές. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, ειδικές εναρκτήριες αλληλουχίες δεοξυριβονουκλεοτιδίων [Oligo p(dT)₁₅ primer] χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση cDNA από το ολικό mRNA του γονιδίου που έχει απομονωθεί. Για να έρθει εις πέρας αυτή η αντίδραση, απαιτείται η παρουσία του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιεί το RNA ως μήτρα για να συνθέσει τον κάθε κλώνο του DNA. Το δίκλωνο DNA, που είναι το προϊόν αυτής της αντίδρασης, στη συνέχεια ενισχύεται με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), κατά την οποία το cDNA πολλαπλασιάζεται εκατομμύρια φορές. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και η διαδικασία που εφαρμόστηκε αναφέρονται κατωτέρω.

Υλικά:

- Συσκευή CFX96 Real-Time System (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad[®], CA, USA)
- DEPC-treated H₂O (Invitrogen[™], USA)
- 100mM dNTP Set (Invitrogen[™], Carlsbad, USA)
- SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen[™], Carlsbad, USA)
- Oligo p(dT)₁₅ primer for cDNA (Roche, Indianapolis, USA)
- 5x First Strand Buffer & 100mM DTT Solution (Invitrogen[™], Carlsbad, USA)
- PCR Tube Strips (Bio-Rad[®], California, USA)

Σε αποστειρωμένους σωληνίσκους eppendorf παρασκευάστηκαν τα εξής:

- **Μείγμα Α**, επαρκούς ποσότητας για x δείγματα. Για κάθε δείγμα έγινε προσθήκη 10μl DEPC/H₂O, 1μl μείγματος dNTP set και 1μl oligo p(dT)₁₅ primer.
- **Μείγμα Β**, επαρκούς ποσότητας για x δείγματα. Για κάθε δείγμα έγινε προσθήκη 4μl 5x First strand buffer και 2μl 100mM DTT solution.
- **Μείγμα Γ**, επαρκούς ποσότητας για x δείγματα. Για κάθε δείγμα έγινε προσθήκη 0.75μl DEPC/d.d. H₂O και 0.25μl SuperScriptII (το οποία προστίθεται στο τέλος της διαδικασίας λόγω της μεγάλης ευαισθησίας του ενζύμου).

Η ακριβής διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- α) Προσθήκη 12μl **Μείγματος Α** σε κάθε σωληνίσκο (PCR Tube Strip) και εν συνεχεία 1μl δείγματος RNA (συγκέντρωσης 1μg/μl) και φυγοκέντρωση σε φυγόκεντρο (Centrifuge 5430, Eppendorf, USA) στις 2000 στροφές για 1 λεπτό.
- β) Επώαση στους 65°C για 5 λεπτά και ψύξη στους 4°C για 1 λεπτό.
- γ) Προσθήκη 6μl **Μείγματος Β** σε κάθε σωληνίσκο και φυγοκέντρωση στις 2000 στροφές για 1 λεπτό.
- δ) Επώαση στους 42°C για 2 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης, έγινε προσθήκη της αντίστροφης μεταγραφάσης στο SuperScript II στο Μείγμα Γ, ώστε να μειωθεί η πιθανότητα απενεργοποίησής της.
- ε) Προσθήκη 1μl **Μείγματος Γ** σε κάθε σωληνίσκο, όσο το δυνατόν πιο γρήγορα.
- στ) Επώαση στους 42°C για 1 ώρα και 58 λεπτά,
- ζ) επώαση στους 70°C για 15 λεπτά και ψύξη στους 4°C για 5 λεπτά.
- η) Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, προσθήκη 80μl DEPC/d.d. H₂O σε κάθε σωληνίσκο (ούτως ώστε η τελική συγκέντρωση του cDNA να είναι 1μg/100μl) και αποθήκευση στους -20°C (για σχετικά άμεση χρήση) ή στους -80°C (για μακροχρόνια αποθήκευση).

2.5.4 Προσδιορισμός Έκφρασης mRNA με τη Μέθοδο Real Time PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR) συνιστά την μέθοδο εκλογής για την ποσοτική ανάλυση έκφρασης του mRNA ενός γονιδίου του ενδιαφέροντος. Η μέθοδος Real Time PCR επιτρέπει την εκθετική ενίσχυση περιοχής DNA με γνωστή νουκλεοτιδική αλληλουχία μέσω διαδοχικών κύκλων διπλασιασμού. Κάθε κύκλος συνίσταται από τρία βασικά στάδια: α) την αποδιάταξη της διπλής έλικας του cDNA (denaturation) μέσω αύξησης της θερμοκρασίας, β) την υβριδοποίηση (πρόσδεση) των εκκινητών στο εκμαγείο μόριο DNA (annealing) μέσω ελάττωσης της θερμοκρασίας, γ) την επιμήκυνση (extension) των εκκινητών σε θερμοκρασία ιδανική για την θερμο-σταθερή Taq πολυμεράση. Η παραπάνω διαδικασία οδηγεί σε διπλασιασμό της αλληλουχίας cDNA σε κάθε κύκλο, με αποτέλεσμα την συσσώρευση θεωρητικά 2^v αντιγράφων μετά από v κύκλους αντίδρασης με 100% απόδοση.

Σε αυτή τη μελέτη εφαρμόστηκε qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) που επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό του συμπληρωματικού DNA από το mRNA του γονιδίου του ενδιαφέροντος. Σε αντιδιαστολή με την συμβατική μέθοδο η ενίσχυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR). Η Real Time PCR επιτρέπει την παρακολούθηση του πολλαπλασιασμού των προϊόντων κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (σε real time) σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιούνται ζεύγη εκκινητών, τα οποία είναι ειδικά για το κάθε γονίδιο το οποίο μελετάται. Οι αντιδράσεις PCR γίνονται σε συσκευή C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad[®]), μέσα σε ειδικά Multiplate PCR πιάτα (Bio-Rad, California, USA).

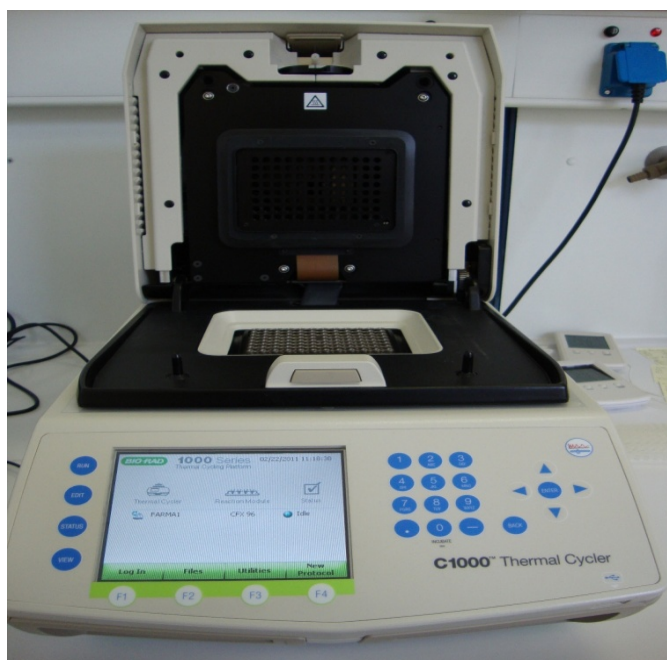
Υλικά:

- Συσκευή CFX96 Real-Time System (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad[®], California, USA)
- SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)
- DEPC-treated water (Invitrogen[™], Carlsbad, USA)
- Εκκινητές (forward και reverse primers) για τα γονίδια προς εξέταση (Invitrogen[™], Carlsbad, USA)
- Multiplate 96-Well PCR Plates (Bio-Rad[®], California, USA)
- Microseal 'B' Adhesive Seals, Optical (Bio-Rad[®], California, USA)

Για τη μελέτη cDNA που είχε απομονωθεί από καρκινικές κυτταροκαλλιέργειες, σε κάθε πηγαδάκι του πιάτου PCR, έγινε προσθήκη των εξής: Κάθε δείγμα μετρήθηκε εις διπλούν.

- 1μl εκκινητή forward συγκεκριμένου γονιδίου
- 1μl εκκινητή reverse συγκεκριμένου γονιδίου
- 5μl SYBR Green PCR Master Mix
- 1μl DEPC-treated water
- 2μl δείγματος cDNA

Ακολούθως, το πιάτο PCR καλύφθηκε με ειδική αυτοκόλλητη μεμβράνη (Microseal 'B' Adhesive Seal, Bio-Rad[®], California, USA), έγινε φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 3 λεπτά και το πιάτο τοποθετήθηκε στην ειδική βάση της συσκευής PCR (Εικόνα 2.1).

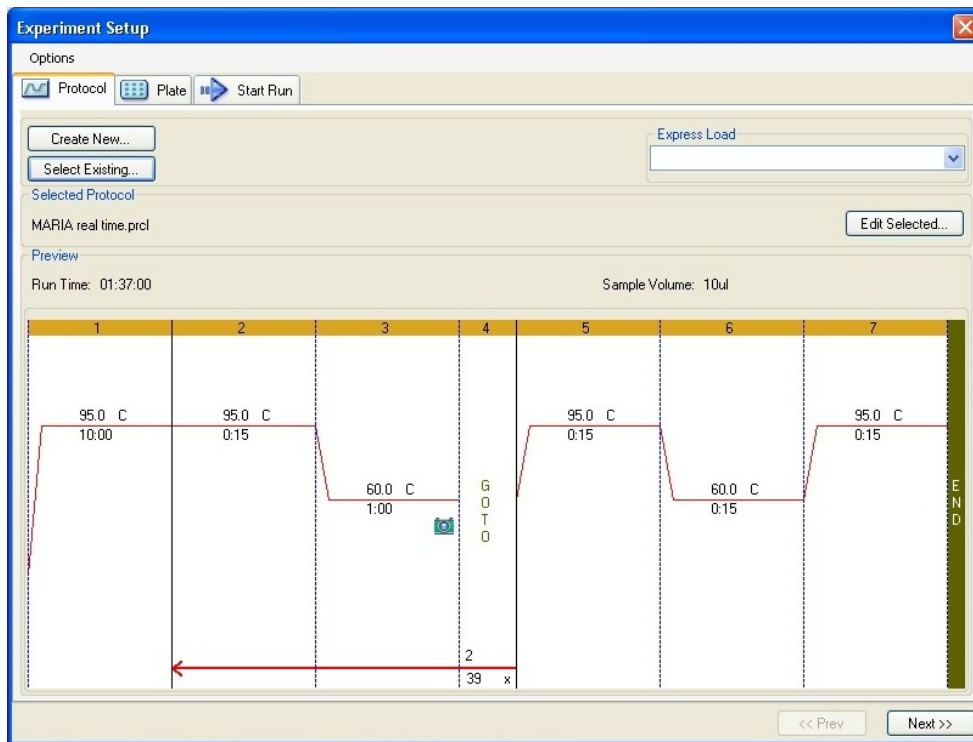


Εικόνα 2.1: CFX96 Real-Time System (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad©)

Ο έλεγχος της διαδικασίας της PCR έγινε μέσω του προγράμματος (Bio-Rad[©] CFX Manager) του Η/Υ, στον οποίο ήταν συνδεδεμένη η συσκευή C1000 Thermal Cycler. Οι θερμικές συνθήκες ήταν οι εξής (βλ. Πίνακα 2.3 και Εικόνα 2.2):

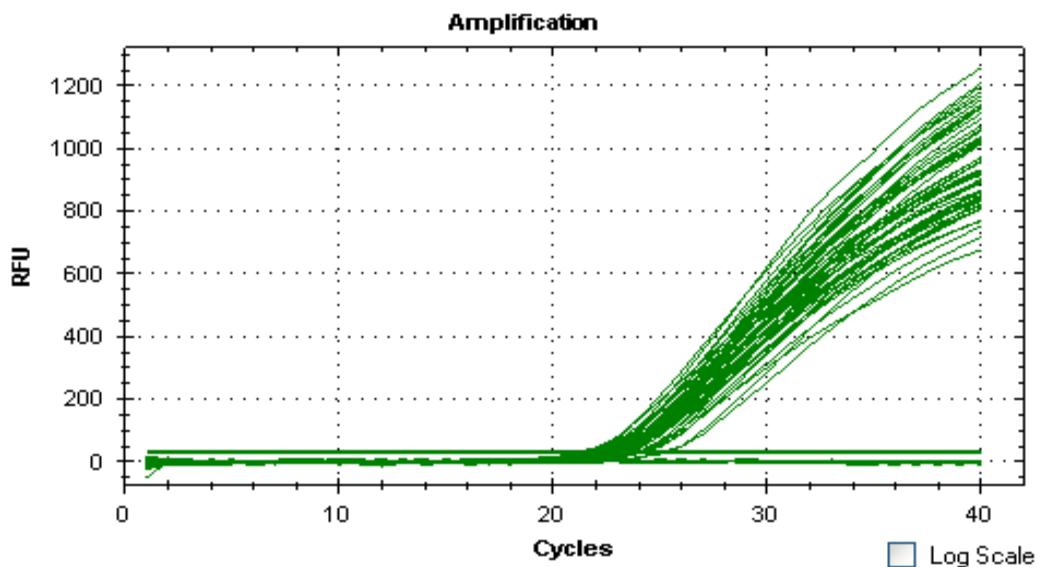
Πίνακας 2.3: Αναλυτικό πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρονική Διάρκεια	
1	95	10 λεπτά	
2	95	15 δευτερόλεπτα	} 40 κύκλοι
3	60	1 λεπτό	
4	95	15 δευτερόλεπτα	
5	60	15 δευτερόλεπτα	
6	95	15 δευτερόλεπτα	



Εικόνα 2.2: Αναλυτικό πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

Η συνολική διάρκεια της διαδικασίας ήταν 1 ώρα και 37 λεπτά. Όταν ολοκληρώθηκε η διαδικασία της PCR, το πρόγραμμα του H/Y εμφάνισε τις $C(t)$ του κάθε δείγματος, καθώς και την καμπύλη της αντίδρασης PCR (Εικόνα 2.3) που αντιστοιχούσε σε κάθε δείγμα.



Εικόνα 2.3: Χαρακτηριστικό γράφημα real time PCR

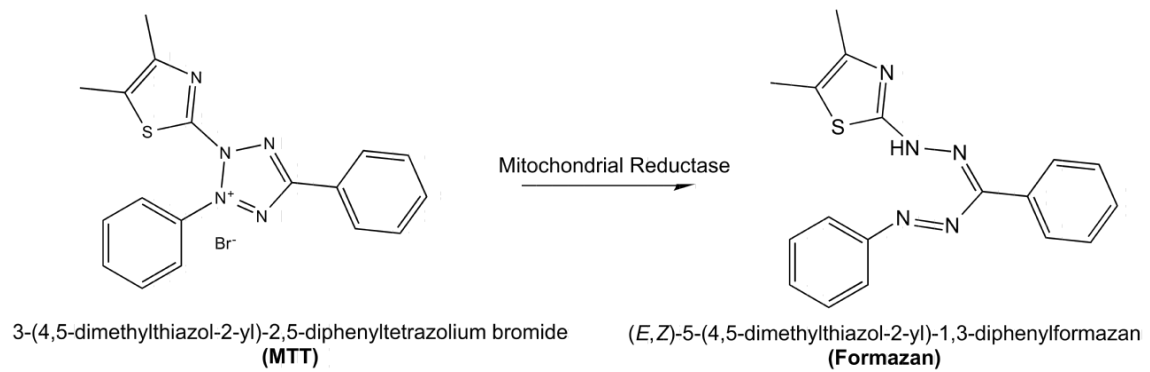
Για την κοινωνικοποίηση των αποτελεσμάτων, έγινε μέτρηση PCR με εκκινητή το house-keeping γονίδιο της β-ακτίνης (hActinB, Invitrogen™, Carlsbad, USA). Οι τιμές των C(t) του κάθε γονιδίου προς μελέτη αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές C(t) της β-ακτίνης και η τιμή που προέκυψε ήταν η σχετική τιμή που αντιστοιχούσε στην έκφραση του mRNA του αντίστοιχου γονιδίου. Οι διάφοροι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα 2.4. Όλοι οι εκκινητές προμηθευτήκανε από την εταιρία Invitrogen™ (Carlsbad, USA). Οι αλληλουχίες των παρακάτω εκκινητών βρίσκονται με κατεύθυνση 5'→3'.

Πίνακας 2.4: Αλληλουχίες εκκινητών αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Γονίδιο	Πρόσθιος Εκκινητής	Αντίστροφος Εκκινητής
hCYP1A1	CAGTACCTCAGCCACCTCCAAG	TGGTGGTTGTGGTCATAGCG
hCYP1A2	ATGAGATGCTCAGCCTCGTG	CAGCGTTGTGTCCCTTGTTG
hCYP1B1	GCAAGGGCATGGGAATTGAC	TGGATGGACAGCGGGTTTAG
hAhR	CCACTTCAGCCACCATCCAT	AAGCAGGCGTGCATTAGACT
hARNT	GCCGGCAGAGAATTCAGGA	ATGGAGTCTGAAAGCTGCCC
hAhRR	GGCTGCTGTTGGAGTCTCTT	CATCGTCATGAGTGGCTCGG
hHSP90	GCCGGATGCCTAAGTAGACC	CCATGTCAACCCTTGGAGCA
hActinB	CTCGCCTTTGCCGATCC	GGGTACTIONCAGGGTGAGGA

2.6 Έλεγχος Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού με Άλας Τετραζολίου (MTT assay)

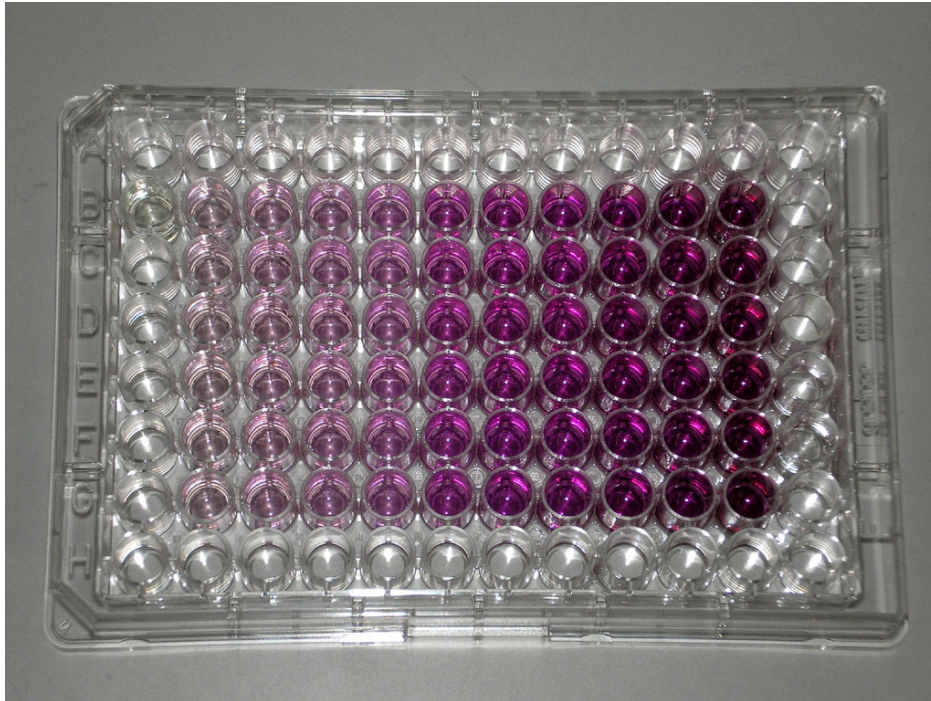
Το άλας του 3-[4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ]-2,5-διφαινυλτετραζόλιο βρωμίδιο (MTT) χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Πιο συγκεκριμένα, η χρωματογραφική αυτή τεχνική βασίζεται στην κυτταρική μετατροπή του τετραζολίου (κίτρινου χρώματος) σε κρυστάλλους φορμαζάνης (μωβ χρώματος) από μεταβολικώς ενεργά κύτταρα. Η μετατροπή αυτή γίνεται από αναγωγικές αντιδράσεις στα μιτοχόνδρια των κυττάρων παρουσία των συμπαραγόντων NADH και NADPH. Οι κρύσταλλοι φορμαζάνης που σχηματίζονται διαλυτοποιούνται σε ειδικό διάλυμα και η μέτρηση γίνεται σε φασματοφωτόμετρο ELISA στα 540nm. Η διαδικασία γίνεται σε αποστειρωμένα 96-well πιάτα.



Εικόνα 2.4: Αναγωγική αντίδραση μετατροπής του MTT σε κρυστάλλους Φορμαζάνης

Διαδικασία που ακολουθήθηκε:

1. Σε κάθε πηγαδάκι προστίθενται 100 μl εναιωρήματος μέσου με κύτταρα, συνολικά σε κάθε πηγαδάκι τοποθετήθηκαν 5000 κύτταρα (ο αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε σε προηγούμενη μελέτη και καθορίστηκε ο ιδανικός αριθμός των κυττάρων).
2. Επώαση του πιάτου για 24 ώρες σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂.
3. Ύστερα από το πέρας των 24 ωρών προστίθενται η σουλπιρίδη (η σουλπιρίδη προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 1-25 μM για τα χρονικά διαστήματα 12-72 ώρες).
4. Προσθήκη 10 μl διαλύματος MTT σε συγκέντρωση 5 mg/ml.
5. Επώαση 4 ώρες στους 37°C και 5% CO₂.
6. Προσθήκη 100 μl διαλύματος διαλυτοποίησης και επώαση overnight στους 37°C και 5% CO₂. [Διάλυμα Διαλυτοποίησης: 10% TritonX-100 σε διάλυμα όξινης Ισοπροπανόλης 0.1N]
7. Μέτρηση απορρόφησης στα 540nm σε φασματοφωτόμετρο ELISA.



Εικόνα 2.5: Χαρακτηριστική εικόνα 96-wellplate ύστερα από τη διαλυτοποίηση των κρυστάλλων Φορμαζάνης

2.7 Στατιστική Ανάλυση

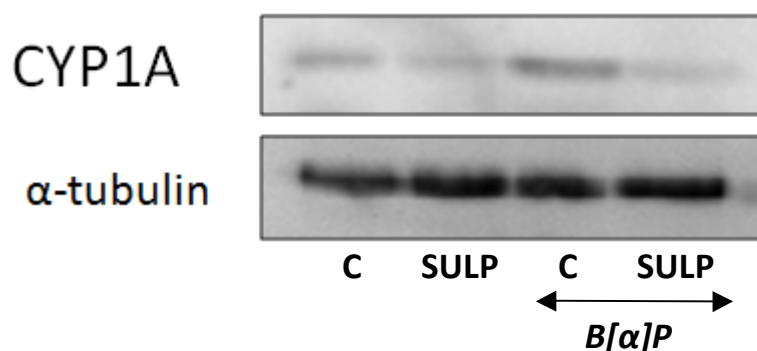
Τα δεδομένα στα γραφήματα εκφράστηκαν ως Μέσος Όρος \pm Τυπικό Σφάλμα ($\text{mean} \pm \text{SE}$) και αξιολογήθηκαν με Student's t-test. Ως επίπεδο σημαντικότητας όλων των αναλύσεων καθορίστηκε όριο μικρότερο ή ίσο του 0.05 ($P < 0.05$).

Αποτελέσματα

3.1 Έκφραση Κυτοχρωμάτων P-450 στον Πνεύμονα Επιμύων

3.1.1 Επίδραση Σουλπιρίδης στα Κυτοχρώματα CYP1A και CYP1A2 στον Πνεύμονα Επίμυος

Προηγούμενες μελέτες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φαρμακολογίας έδειξαν ότι η υποδόρια χορήγηση του εκλεκτικού D₂-ντοπαμινεργικού ανταγωνιστή, σουλπιρίδη (10μM) σε επίμυες κατέστειλε τη βασική αλλά και την επαγόμενη από B[α]P έκφραση των κυτοχρωμάτων της οικογένειας CYP1 στο ήπαρ επιμύων. Βάσει αυτού του ευρήματος, θελήσαμε να ερευνήσουμε εάν η σουλπιρίδη έχει την ίδια επίδραση και στους πνεύμονες επιμύων. Είναι γνωστό ότι οι περιβαλλοντικοί ρύποι και ο καπνός του τσιγάρου εισέρχονται με την εισπνοή αρχικά στους πνεύμονες και στη συνέχεια περνούν στην κυκλοφορία.

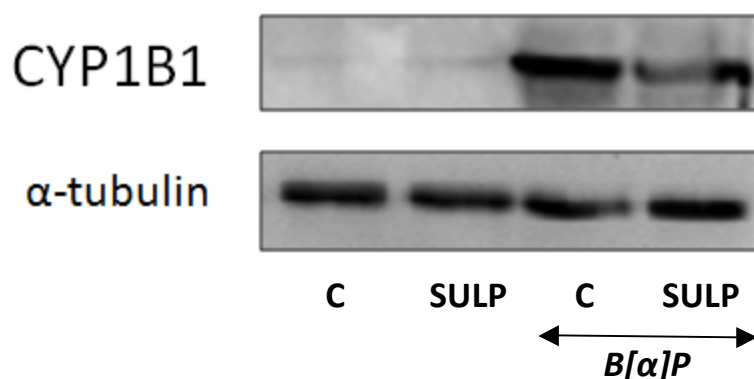


Εικόνα 3.1: Αξιολόγηση με western blot των μεταβολών στη βασική και επαγόμενη με B[α]P έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP1A1 και CYP1A2 σε πνεύμονα επιμύος μετά από χορήγηση SULP. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε στο western blot δεν είναι ειδικό. Αναγνωρίζει και τις δύο isoμορφές, CYP1A1 και CYP1A2. (c: control, SULP: σουλπιρίδη, B[α]P: βενζο[α]πυρένιο).

Αρχικά παρατηρούμε ότι σε συμφωνία με τα προηγούμενα ευρήματα (Εικόνα 1.13), το B[α]P είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του CYP1A. Η SULP μείωσε στους πνεύμονες τη βασική έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP1A1 και CYP1A2 σε επίπεδο αποπρωτεΐνης και εμπόδισε την επαγωγή τους με B[α]P (Εικόνα 3.1).

3.1.2 Επίδραση Σουλπιρίδης στο Κυτόχρωμα CYP1B1 στον Πνεύμονα Επίμυος

Στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση του κυτοχρώματος CYP1B1 στους πνεύμονες επιμύων, καθώς ανήκει και αυτό στην οικογένεια CYP1 των κυτοχρωμάτων, και παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο ήπαρ επιμύων σε προηγούμενες μελέτες.



Εικόνα 3.2: Αξιολόγηση με western blotting των μεταβολών στην βασική και επαγόμενη με B[α]P έκφραση του κυτοχρώματος CYP1B1 σε πνεύμονα επίμυος μετά από χορήγηση SULP. (c: control, SULP: σουλπιρίδη, B[α]P: βενζο[α]πυρένιο).

Παρατηρείται ότι το επίπεδο έκφρασης του κυτοχρώματος CYP1B1 στους πνεύμονες είναι πολύ χαμηλό. Μετά από επαγωγή με B[α]P, τα επίπεδα αποπρωτεΐνης του CYP1B1 είναι υψηλά στους πνεύμονες των επιμύων. Η SULP περιόρισε σημαντικά αυτή την επαγωγή (Εικόνα 3.2).

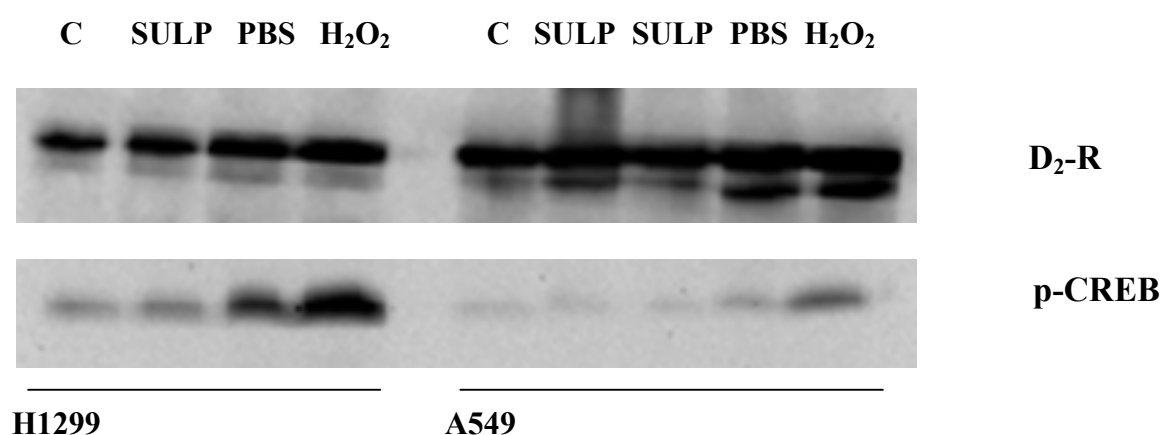
3.2 Επίδραση της Σουλπιρίδης στην Έκφραση των D2-R στα Κύτταρα A549 και H1299, και στην Ενεργοποίηση του Μονοπατιού D2-R/cAMP/CREB

Στη συνέχεια, πριν προχωρήσουμε στην *in vitro* έκθεση των καρκινικών πνευμονικών κυττάρων σε σουλπιρίδη, ήταν απαραίτητο να διερευνήσουμε εάν τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα εκφράζουν τον D₂-υποδοχέα.

Επειδή δεν αρκεί μόνο ένας υποδοχέας να εκφράζεται αλλά είναι σημαντικό να είναι και λειτουργικός, έπρεπε να διερευνήσουμε εάν οι υποδοχείς αυτοί είναι λειτουργικοί. Γνωρίζοντας, ότι ο ανταγωνισμός των D₂-υποδοχέων έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης (cAMP) και εν συνεχεία μέσω της ενεργοποιημένης PKA (protein kinase A), την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/AKT και MAP κινασών, μελετήσαμε τη φωσφορυλίωση του

μεταγραφικού παράγοντα CREB, ο οποίος φωσφορυλιώνεται σε απόκριση της ενεργοποίησης των ανωτέρω μονοπατιών, συνεπώς και της ενεργοποίησης των D₂-υποδοχέων, και είναι σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας για πληθώρα γονιδίων.

Έτσι, μια ομάδα κυττάρων επωάστηκε με σουλπιρίδη για 7h, μια δεύτερη ομάδα επωάστηκε για 1h με PBS (απουσία δηλαδή θρεπτικών συστατικών και γλυκόζη με αποτέλεσμα την επαγωγή της αυτοφαγίας) και μια τρίτη ομάδα επωάστηκε με το H₂O₂ για 7h (επαγωγέας της απόπτωσης). Οι δύο ομάδες θετικών μαρτύρων αυτοφαγίας και απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν διότι είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν τη φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα CREB.



Εικόνα 3.3: Αξιολόγηση με Western blot της έκφρασης των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα, A549 και H1299, και την ενεργοποίηση του μονοπατιού D₂-R/cAMP/CREB μετά από σουλπιρίδη (SULP), στέρηση του θρεπτικού μέσου (PBS) και επαγωγή απόπτωσης με H₂O₂. Το p-CREB είναι η φωσφορολιωμένη μορφή του CREB.

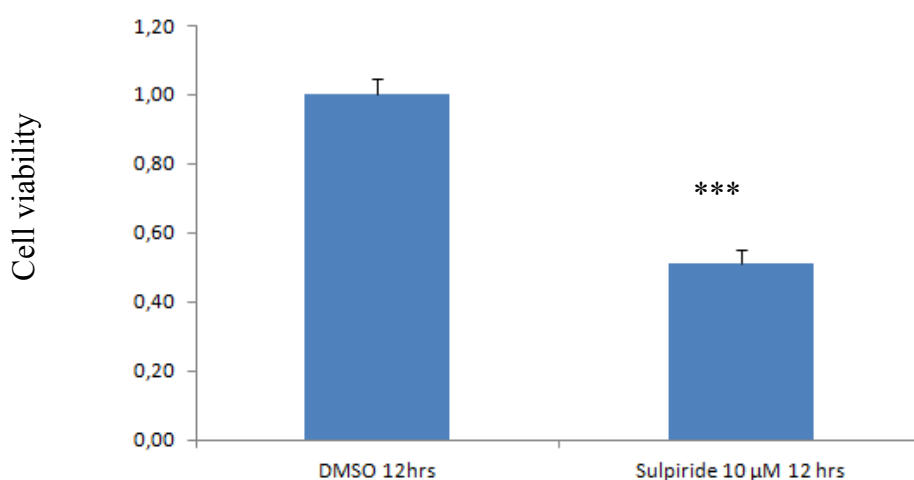
Δεν φαίνεται να επέρχεται σημαντική μεταβολή στο επίπεδο έκφρασης των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα H1299 και A549, μετά από έκθεση σε σουλπιρίδη. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση σε συνθήκες starvation (PBS) ή μετά από έκθεση στον παράγοντα απόπτωσης H₂O₂ (Εικόνα 3.3). Ταυτόχρονα φαίνεται ότι, τα ανθρώπινα κύτταρα εκφράζουν σημαντικά τους D₂-ντοπαμινεργικούς υποδοχείς. Αξίζει να σημειωθεί ότι η σουλπιρίδη αναστέλλει σημαντικά τη λειτουργία των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων και του μονοπατιού D₂-R/cAMP/CREB στα κύτταρα A549 και H1299, σε αντίθεση με το H₂O₂ και τη στέρηση του θρεπτικού μέσου που προκάλεσαν ισχυρή ενεργοποίηση του μονοπατιού (Εικόνα 3.3).

3.3 Αξιολόγηση της Επίδρασης της Σουλπιρίδης στην Επιβίωση των Καρκινικών Κυττάρων Πνεύμονα

Στη συνέχεια, με σκοπό να μελετήσουμε εάν η σουλπιρίδη έχει άμεση επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των δύο κυτταρικών σειρών, χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο MTT. Αρχικά προσδιορίστηκε ο αριθμός των κυττάρων, ο οποίος είναι ο βέλτιστος σε κάθε πηγαδάκι, έτσι έγινε πιλοτική μελέτη και για κάθε κυτταρική σειρά χρησιμοποιήθηκαν από 500-10000 κύτταρα ανά πηγαδάκια και μετρήθηκε με MTT η κυτταρική τους ανάπτυξη. Καταλήξαμε στη χρήση 5000 κυττάρων ανά πηγαδάκι, ένας αριθμός κυττάρων ο οποίος μας επιτρέπει να διακρίνουμε την επίδραση του φαρμάκου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

3.3.1 Επίδραση της Σουλπιρίδης στην Κυτταρική Επιβίωση των Καρκινικών Κυττάρων Πνεύμονα, A549

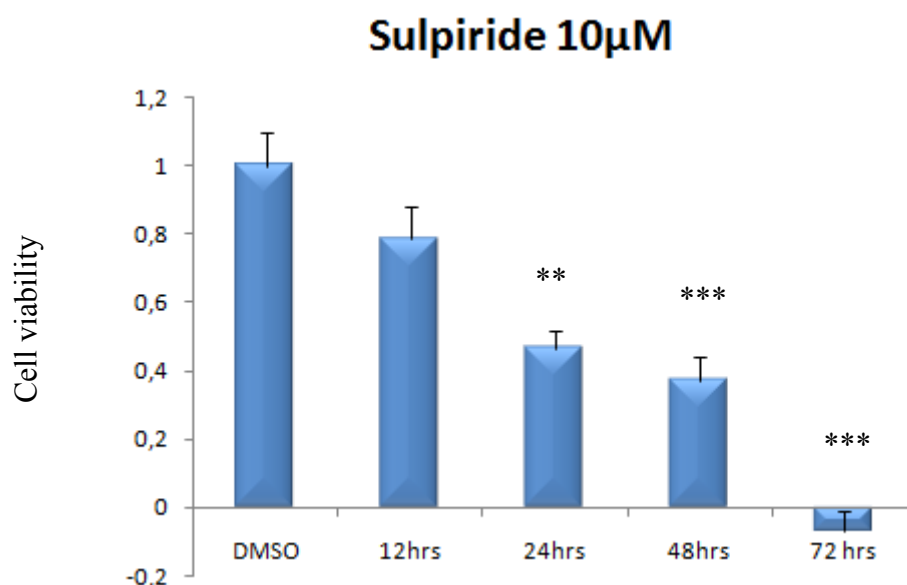
Μελετήθηκε η επιβίωση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα, A549. Η έκθεση σε Sulp(10 μ M) μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό των A549 καρκινικών κυττάρων πνεύμονα εντός 12 ωρών.



Εικόνα 3.4: Επιβίωση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 μετά από έκθεση σε σουλπιρίδη. Αξιολόγηση με το MTT test. Η σύγκριση έγινε σε σχέση με τα κύτταρα A549, που εκτέθηκαν σε DMSO (control).(οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος \pm Τυπικό Σφάλμα, ***P<0.001).

3.3.2 Επίδραση της Σουλπιρίδης στην Κυτταρική Επιβίωση των Καρκινικών Κυττάρων Πνεύμονα, H1299

Ύστερα μελετήσαμε και την επίδραση της σουλπιρίδης και στον πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα, H1299.



Εικόνα 3.5: Επιβίωση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα H1299 μετά από έκθεση σε σουλπιρίδη. Αξιολόγηση με το MTT-test. Η σύγκριση έγινε σε σχέση με τα κύτταρα H1299, που εκτέθηκαν σε DMSO (control).(οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος \pm Τυπικό Σφάλμα, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

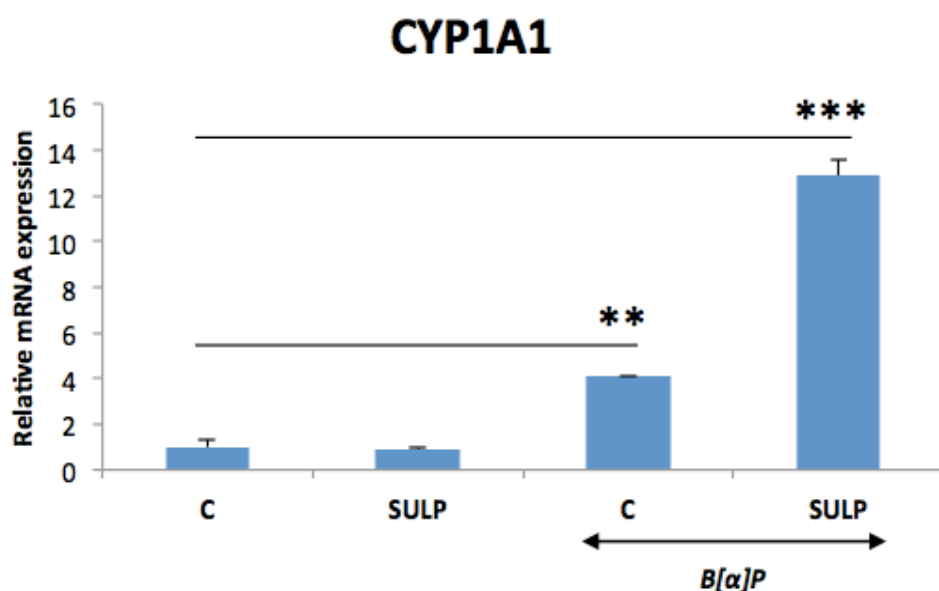
Η SULP(10 μ M) μείωσε δραστικά τον πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα, H1299, μετά από έκθεση για 24 ώρες, ενώ η παρουσία τους στο θρεπτικό υλικό (medium) εντός 72 ωρών ήταν σχεδόν ανύπαρκτη (Εικόνα 3.5).

3.4 Έκφραση Κυτοχρωμάτων P-450 σε Καρκινικά Κύτταρα του Πνεύμονα, A549

Στη συνέχεια, αφού είδαμε ότι η σουλπιρίδη αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ύστερα από 12 ώρες επώασης, επόμενος στόχος ήταν να μελετήσουμε την επίδρασή της στην έκφραση των κυτοχρωμάτων στις δύο κυτταρικές σειρές, A549 και H1299. Έτσι, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε σουλπιρίδη (10 μ M) για 6 ώρες και στη συνέχεια απομονώθηκε ολικό mRNA.

3.4.1 Επίδραση Σουλπιρίδης στο Κυτόχρωμα CYP1A1 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, A549

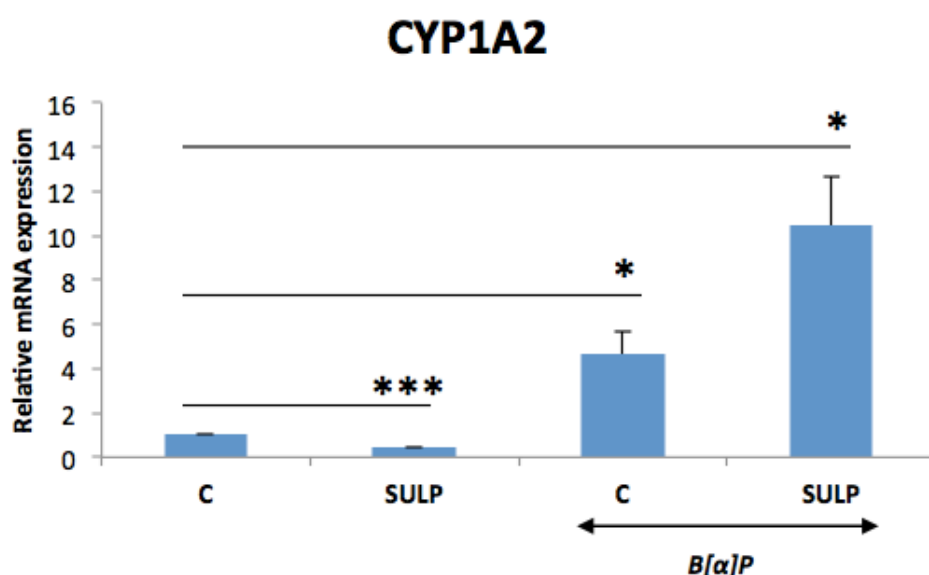
Στα κύτταρα A549, μετά από έκθεση σε B[α]P (10μM, 24h), παρατηρήθηκε αύξηση του κυτοχρώματος CYP1A1 σε επίπεδο mRNA ($P<0.01$). Η Sulp (10μM, 6h) δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην έκφραση του CYP1A1. Έκθεση των κυττάρων A549 σε Sulp (10μM, 24h) ενίσχυσε την επαγωγή του κυτοχρώματος CYP1A1 με B[α]P (10μM, 24h) ($P<0.001$) (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6: Σχετική έκφραση mRNA του κυτοχρώματος CYP1A1 μετά από επίδραση Sulp και B[α]P στην κυτταρική σειρά A549 (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με τα κύτταρα A549, που εκτέθηκαν σε DMSO (control). (c: control, Sulp: σουλπιρίδη, B[α]P: βενζο[α]πυρένιο).

3.4.2 Επίδραση Σουλπιρίδης στο Κυτόχρωμα CYP1A2 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, A549

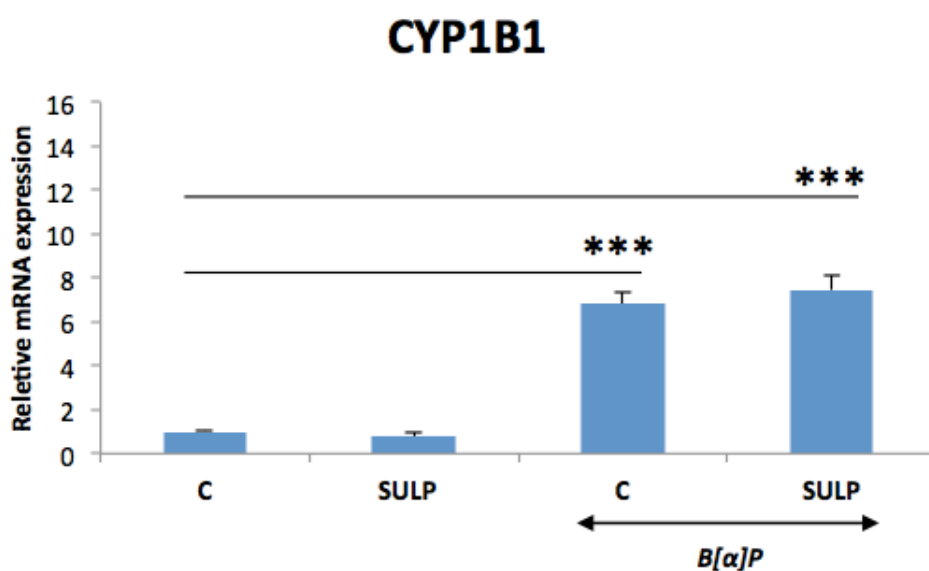
Στο κυτόχρωμα CYP1A2 παρατηρήθηκε επίσης επαγωγή, σε επίπεδο mRNA, μετά την έκθεση σε B[a]P (10 μ M, 24h) ($P < 0.05$). Μειωμένη ήταν η βασική έκφραση του κυτοχρώματος CYP1A2 μετά από έκθεση σε Sulp (10 μ M, 6h) ($P < 0.001$). Η έκθεση σε Sulp (10 μ M, 24h) επίσης, ενίσχυσε στα κύτταρα A549 περαιτέρω την επαγωγή στο κυτόχρωμα CYP1A2, που προκάλεσε το B[a]P (10 μ M, 24h) ($P < 0.05$) (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7: Σχετική έκφραση mRNA του κυτοχρώματος CYP1A2 μετά από επίδραση Sulp και B[a]P στην κυτταρική σειρά A549 (οι τιμές εκφράζονται ως Μέσος όρος \pm Τυπικό Σφάλμα, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με τα κύτταρα A549 που εκτέθηκαν σε DMSO (control). (c: control, Sulp: σουλπιρίδη, B[a]P: βενζο[α]πυρένιο).

3.4.3 Επίδραση Σουλπιρίδης στο Κυτόχρωμα CYP1B1 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, A549

Τα κύτταρα A549, που εκτέθηκαν σε B[α]P (10μM, 24h), παρουσίασαν αύξηση στην έκφραση του κυτοχρώματος CYP1B1 σε επίπεδο mRNA ($P < 0.001$). Η Sulp (10μM, 6h) δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην βασική έκφραση του CYP1B1, αλλά και στην επαγόμενη από B[α]P στα καρκινικά κύτταρα A549 (Εικόνα 3.8).

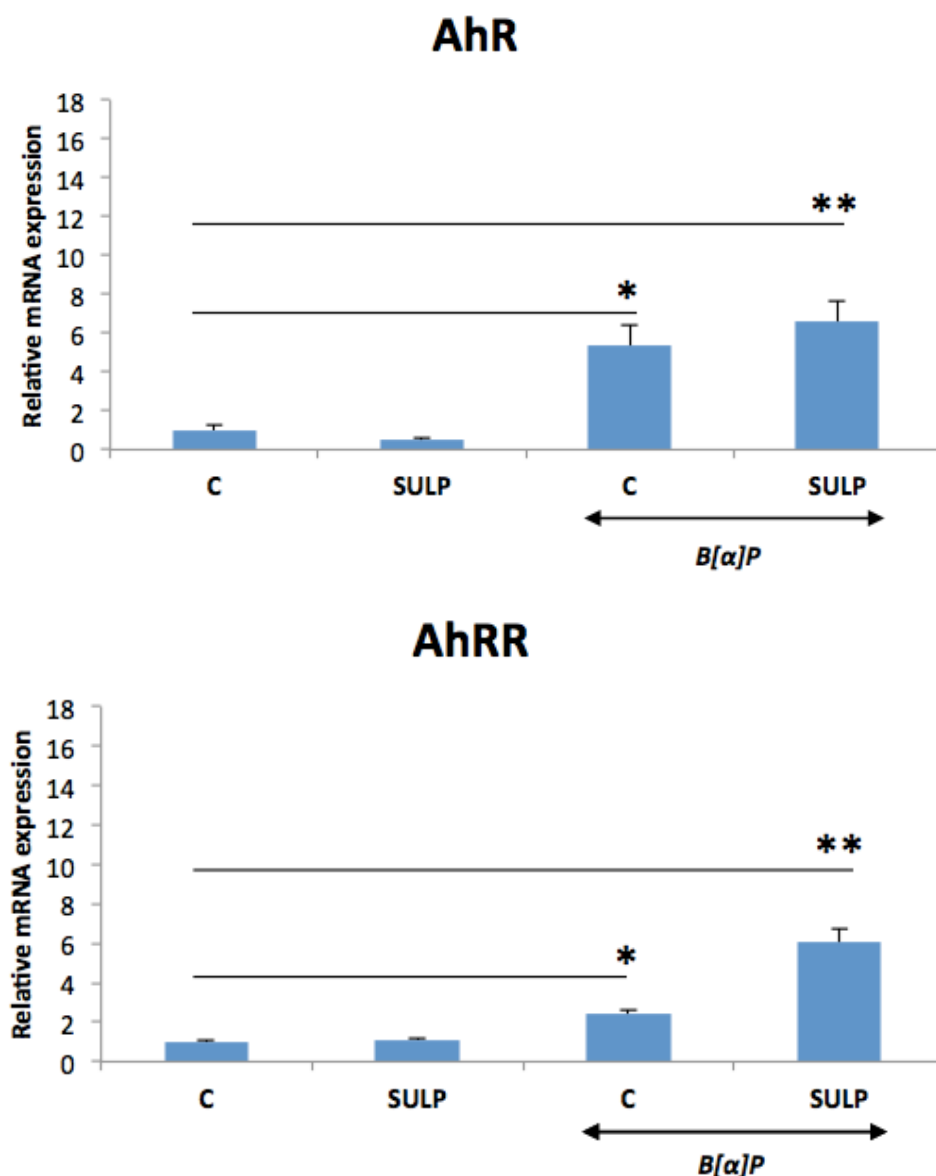


Εικόνα 3.8: Σχετική έκφραση mRNA του κυτοχρώματος CYP1B1 μετά από επίδραση Sulp και B[α]P στην κυτταρική σειρά A549 (οι τιμές εκφράζονται ως Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, $***P < 0.001$). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με τα κύτταρα A549, που εκτέθηκαν σε DMSO (control). (c: control, Sulp: σουλπιρίδη, B[α]P: βενζο[α]πυρένιο).

3.4.4 Επίδραση Σουλπιρίδης σε Μεταγραφικούς Παράγοντες των Κυτοχρωμάτων CYP1 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, A549

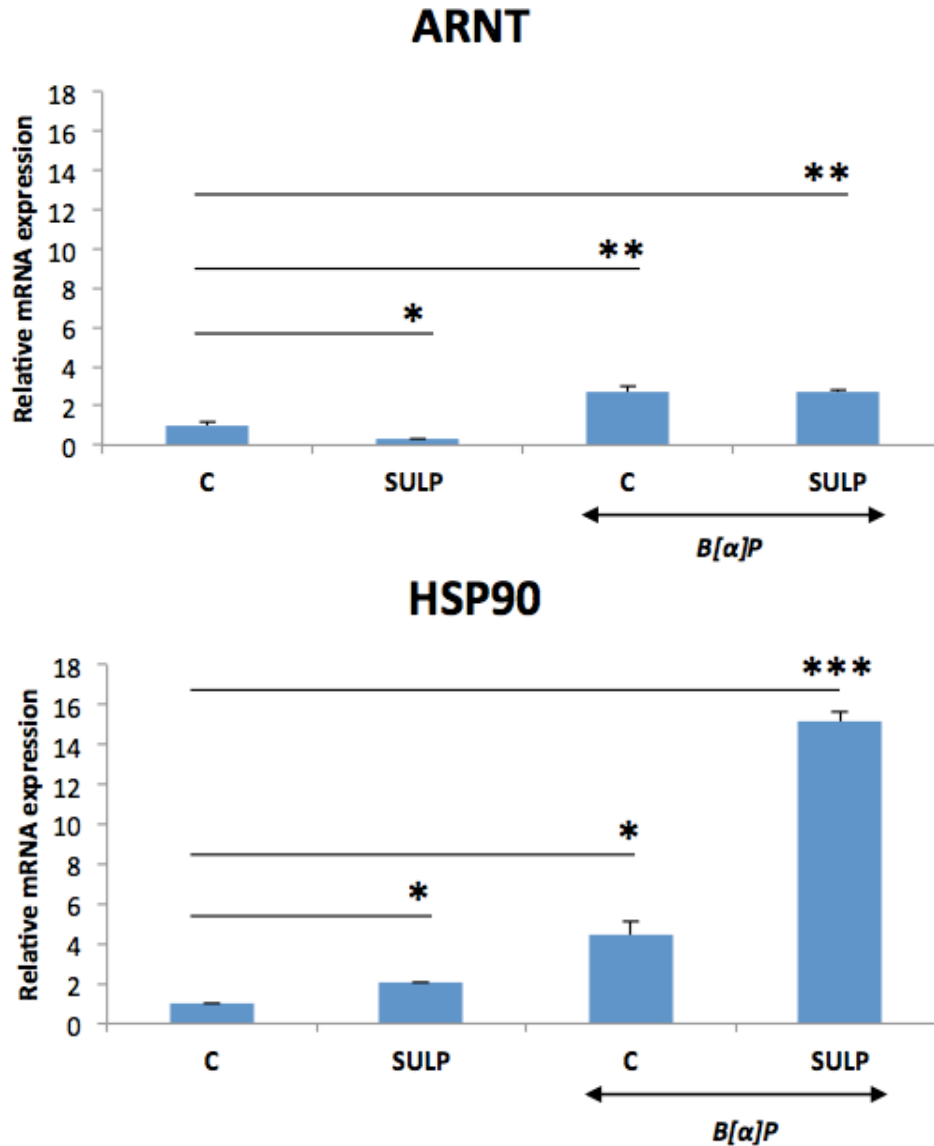
Αφού μελετήσαμε την επίδραση της σουλπιρίδης στην έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα A549, στη συνέχεια εξετάστηκε η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων AhR, AhRR, ARNT και HSP90 σε επίπεδο mRNA. Είναι γνωστό ότι αυτοί οι

μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζουν σε σημαντικό βαθμό την επαγωγή της έκφρασης των κυτοχρωμάτων της οικογένειας CYP1.



Εικόνα 3.9: Μεταβολές στη σχετική έκφραση mRNA των μεταγραφικών παραγόντων AhR και AhRR μετά από επίδραση SULP και B[α]P στην καρκινική κυτταρική σειρά πνεύμονα, A549 (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, *P<0.05, **P<0.01). (c: control, SULP: σουλπιρίδη, B[α]P: βενζο[α]πυρένιο).

Παρατηρήθηκε επαγωγή στους μεταγραφικούς παράγοντες AhR και AhRR, μετά από έκθεση σε B[α]P (10μM, 24h) (P<0.05 και P<0.05 αντίστοιχα) των κυττάρων A549. Αντίθετα, η SULP (10μM, 6h) δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στη βασική έκφραση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων, ενώ ενίσχυσε την επαγωγή των AhR και AhRR με B[α]P (10μM, 24h) (P<0.01 και P<0.01 αντίστοιχα) (Εικόνα 3.9).



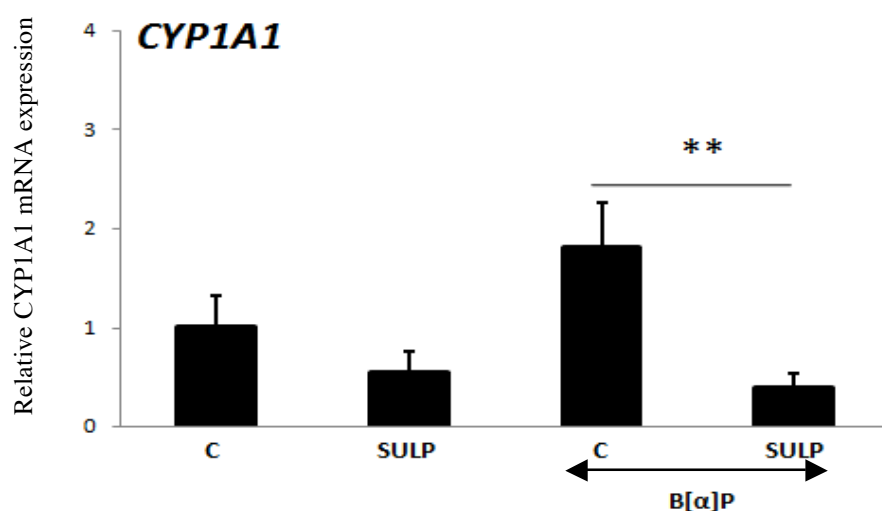
Εικόνα 3.10: Μεταβολές στη σχετική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων ARNT και HSP90 μετά από επίδραση SULP και B[α]P στην κυτταρική σειρά A549 (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001). (c: control, SULP: σουλπιρίδη, B[α]P: βενζο[α]πυρένιο).

Έκθεση σε SULP(10μM, 6h) των καρκινικών κυττάρων A549 προκάλεσε μείωση της βασικής έκφρασης του ARNT (P<0.05), ενώ αύξησε την βασική έκφραση της HSP90 (P<0.05) (Εικόνα 3.10). Τα κύτταρα A549 υπό την επίδραση του B[α]P(10μM, 24h) παρουσίασαν αύξηση της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων ARNT και HSP90 (P<0.01 και P<0.05, αντίστοιχα) (Εικόνα 3.10). Ας σημειωθεί ότι η SULP (10μM, 24h) ενίσχυσε την επαγωγή με B[α]P (10μM, 24h) της HSP90 (P<0.001) (Εικόνα 3.10).

3.5 Έκφραση Κυτοχρωμάτων P-450 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, H1299

Στη συνέχεια μελετήσαμε την επίδραση της σουλπιρίδης στην έκφραση των κυτοχρωμάτων της οικογένειας CYP1 και στα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα H1299. Έτσι, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε σουλπιρίδη (10 μ M) για 6 ώρες και στη συνέχεια απομονώθηκε ολικό mRNA.

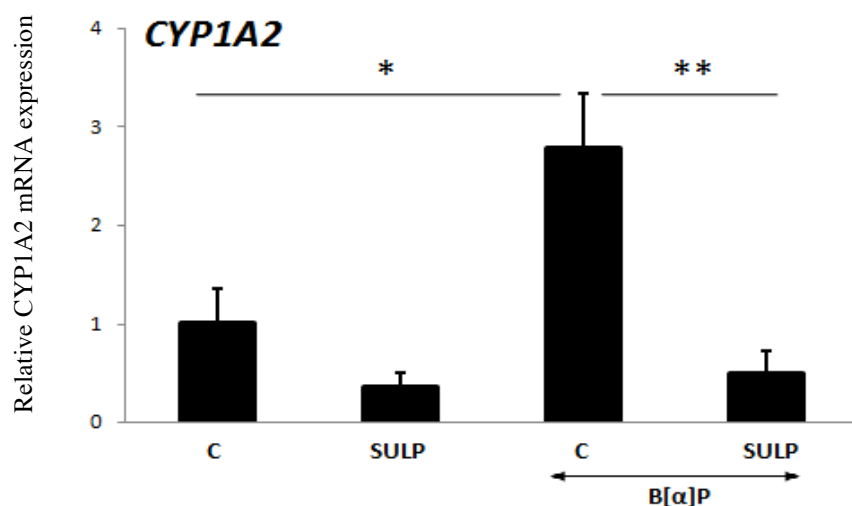
3.5.1 Επίδραση Σουλπιρίδης στο Κυτόχρωμα CYP1A1 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, H1299



Εικόνα 3.11: Μεταβολές στη σχετική έκφραση mRNA του κυτοχρώματος CYP1A1 μετά από επίδραση SULP και B[α]P στην κυτταρική σειρά H1299 (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος \pm Τυπικό Σφάλμα, ** $P < 0.01$). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με τα κύτταρα H1299, που εκτέθηκαν σε DMSO (control). (c: control, SULP: σουλπιρίδη, B[α]P: βενζο[α]πυρένιο).

Στα κύτταρα H1299, μετά από έκθεση σε B[α]P (10 μ M, 24h), παρατηρήθηκε αύξηση του κυτοχρώματος CYP1A1 σε επίπεδο mRNA, η οποία δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Η SULP (10 μ M, 6h) μείωσε ελαφρά την βασική και σημαντικά την επαγόμενη με B[α]P έκφραση του κυτοχρώματος CYP1A1 ($P < 0.01$) (Εικόνα 3.11).

3.5.2 Επίδραση Σουλπιρίδης στο Κυτόχρωμα CYP1A2 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, H1299

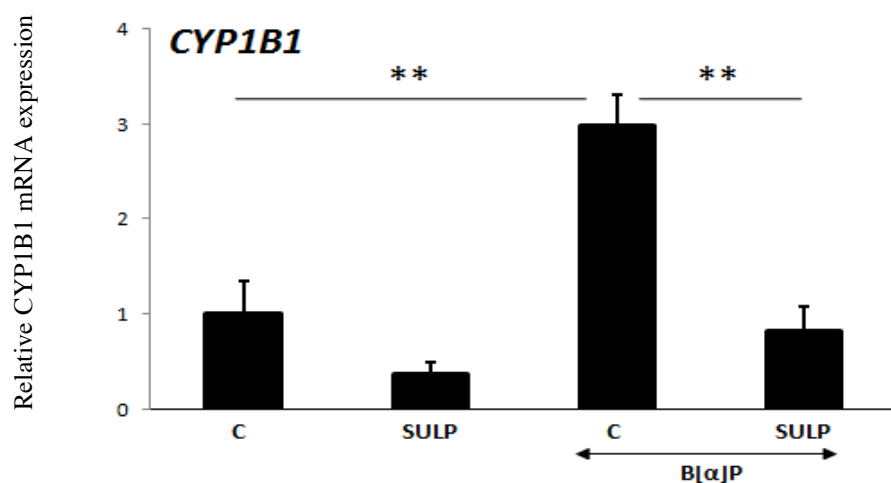


Εικόνα 3.12: Μεταβολές στη σχετική έκφραση mRNA του κυτοχρώματος CYP1A2 μετά από επίδραση SULP και B[α]P στην κυτταρική σειρά H1299 (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος \pm Τυπικό Σφάλμα, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με τα κύτταρα H1299 που εκτέθηκαν σε DMSO (control). (c: control, SULP: σουλπιρίδη, B[α]P: βενζο[α]πυρένιο).

Στο κυτόχρωμα CYP1A2 παρατηρήθηκε επίσης επαγωγή, σε επίπεδο mRNA, μετά από έκθεση σε B[α]P (10 μ M, 24h) ($P < 0.05$). Η έκθεση σε SULP (10 μ M, 6h) μείωσε σημαντικά την επαγόμενη με B[α]P έκφραση του κυτοχρώματος CYP1A2 ($P < 0.01$) (Εικόνα 3.12).

3.5.3 Επίδραση Σουλπιρίδης στο Κυτόχρωμα CYP1B1 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, H1299

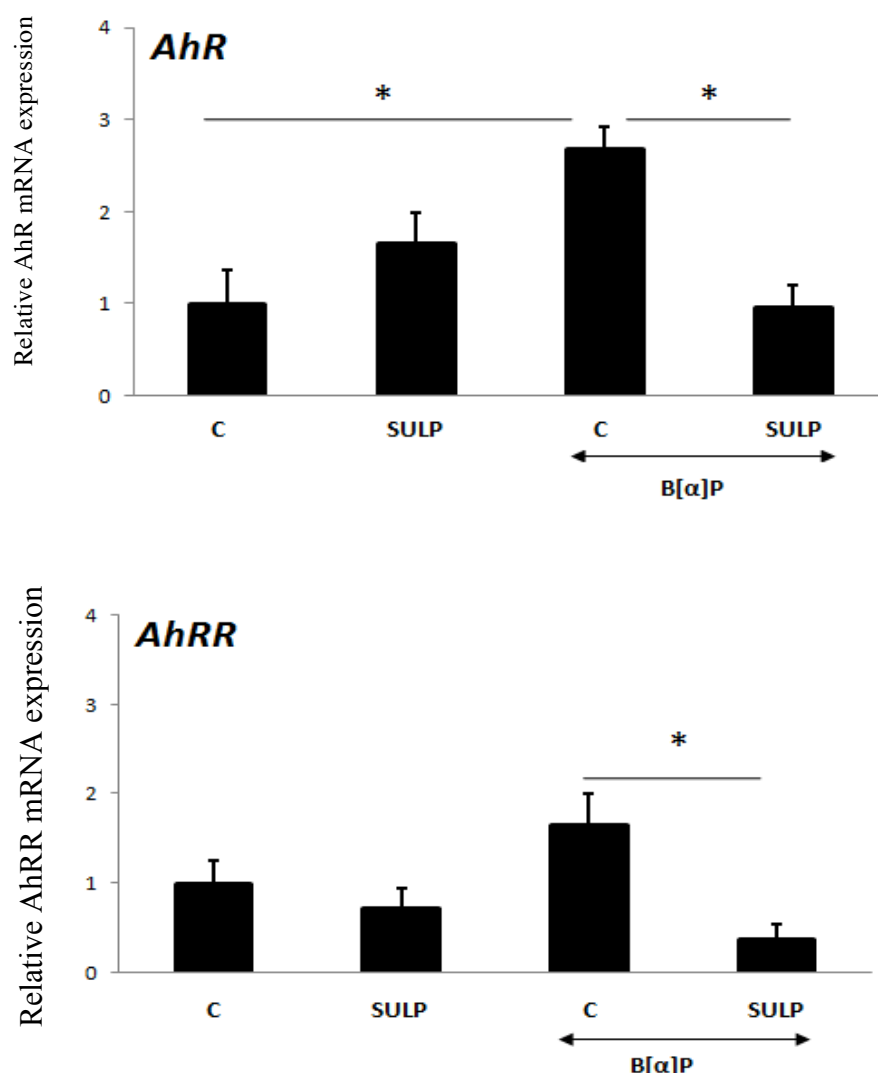
Τα κύτταρα H1299, που εκτέθηκαν σε B[α]P (10μM, 24h) παρουσίασαν αύξηση στην έκφραση του κυτοχρώματος CYP1B1 σε επίπεδο mRNA ($P < 0.01$). Η Sulp (10μM, 6h) μείωσε ασθενώς την βασική έκφραση του κυτοχρώματος CYP1B1, και σημαντικά την επαγόμενη με B[α]P (10μM, 24h) στα καρκινικά κύτταρα H1299 ($P < 0.01$) (Εικόνα 3.13).



Εικόνα 3.13: Μεταβολές στη σχετική έκφραση CYP1B1 mRNA στην κυτταρική σειρά H1299 μετά από επίδραση Sulp και B[α]P (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, $**P < 0.01$). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με τα κύτταρα H1299, που εκτέθηκαν σε DMSO (control). (c: control, Sulp: σουλπιρίδη, B[α]P: βενζο[α]πυρένιο).

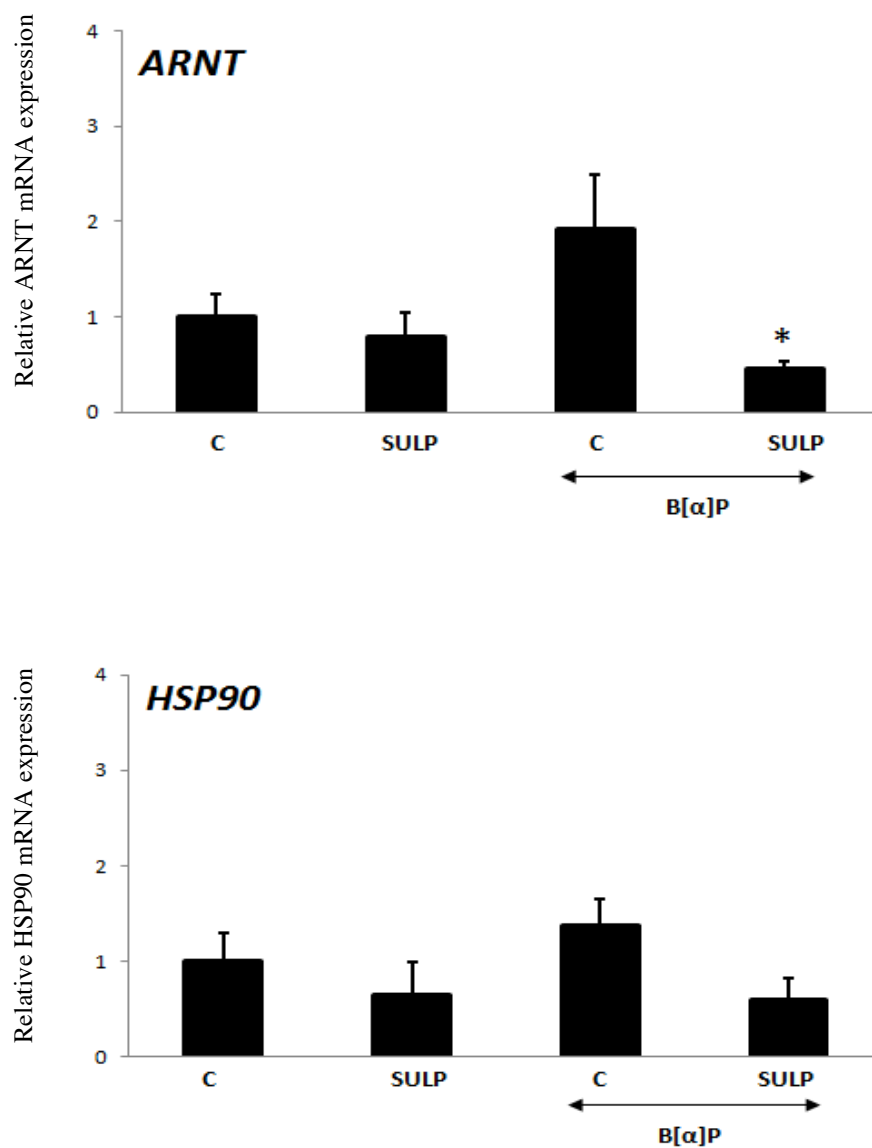
3.5.4 Επίδραση Σουλπιρίδης σε Μεταγραφικούς Παράγοντες των Κυτοχρωμάτων CYP1 σε Καρκινικά Κύτταρα Πνεύμονα, H1299

Αφού μελετήθηκε η επίδραση της σουλπιρίδης στην έκφραση των κυτοχρωμάτων της οικογένειας CYP1 και στην δεύτερη ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά του πνεύμονα H1299, στη συνέχεια εξετάστηκε η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων AhR, AhRR, ARNT και HSP90 σε επίπεδο mRNA. Ως γνωστόν, αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζουν σε σημαντικό βαθμό την επαγωγή της έκφρασης των κυτοχρωμάτων της οικογένειας CYP1.



Εικόνα 3.14: Μεταβολές στη σχετική έκφραση mRNA των μεταγραφικών παραγόντων AhR και AhRR μετά από επίδραση SULP και B[α]P στην καρκινική κυτταρική σειρά πνεύμονα, H1299 (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, *P<0.05). (c: control, SULP: σουλπιρίδη, B[α]P: βενζο[α]πυρένιο).

Παρατηρήθηκε ασθενής επαγωγή στους μεταγραφικούς παράγοντες AhR και AhRR, μετά από έκθεση των κυττάρων H1299 σε B[α]P (10μM, 24h) ($P < 0.05$ στον AhR). Η Sulp (10μM, 6h) μείωσε την επαγόμενη έκφραση των AhR και AhRR με B[α]P (10μM, 24h) ($P < 0.05$) (Εικόνα 3.14).



Εικόνα 3.15: Μεταβολές στη σχετική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων ARNT και HSP90 μετά από επίδραση Sulp και B[α]P στην κυτταρική σειρά H1299 (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος \pm Τυπικό Σφάλμα, $*P < 0.05$). (c: control, Sulp: σουλπιρίδη, B[α]P: βενζο[α]πυρένιο).

Η έκθεση σε SULP (10 μ M, 6h) των καρκινικών κυττάρων H1299 προκάλεσε μείωση της επαγόμενης με B[a]P (10 μ M, 24h) έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων ARNT και HSP90 (P<0.05) (Εικόνα 3.15).

Συμπεράσματα

Η *in vivo* μελέτη που διεξήχθη σε επίμυες καθώς και η *in vitro* μελέτη στα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα, A549 και H1299, μας οδήγησε σε σημαντικά συμπεράσματα όσον αφορά την επίδραση της σουλπιρίδης, εκλεκτικού D₂-ντοπαμινεργικού αναστολέα, στη βασική και την επαγόμενη με βενζο[α]πυρένιο έκφραση των κυτοχρωμάτων, που μεταβολίζουν τις κυριότερες κατηγορίες καρκινογόνων και φαρμάκων. Συγκεκριμένα, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκε ότι:

1. Η σουλπιρίδη μείωσε σημαντικά τη βασική και επαγόμενη με B[a]P έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1, που μεταβολίζουν φάρμακα, τοξικές και προ-καρκινογόνες ουσίες καθώς και καρκινογόνα, στους πνεύμονες των επιμύων.
2. Τα καρκινικά κύτταρα, H1299 και A549, εκφράζουν σημαντικά τους D₂-ντοπαμινεργικούς υποδοχείς, γεγονός που δείχνει ότι η σουλπιρίδη έδρασε άμεσα δεσμεύοντάς τους.
3. Η σουλπιρίδη μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό των πνευμονικών καρκινικών κυττάρων, A549 και H1299, μετά από 12h, ενώ στα H1299 ο αριθμός των κυττάρων ήταν σχεδόν ανύπαρκτος μετά από 72h.
4. Μετά από έκθεση σε σουλπιρίδη των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα, A549, δεν διαπιστώθηκε καμία μεταβολή στη βασική έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP1A1 και CYP1B1. Μειώθηκε όμως η έκφραση του κυτοχρώματος CYP1A2. Αξίζει να σημειωθεί ότι η σουλπιρίδη ενίσχυσε την επαγωγή των CYP1A1/2 και CYP1B1 κυτοχρωμάτων με B[a]P.
5. Η βασική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων AhR και AhRR δεν επηρεάστηκε από την σουλπιρίδη στα κύτταρα A549, ενώ μειώθηκε του ARNT και αυξήθηκε της HSP90.
6. Η σουλπιρίδη δεν επηρέασε τη βασική έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 στα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα H1299. Περιορίσει σημειωτέον την επαγωγή τους με B[a]P.
7. Η επαγωγή των μεταγραφικών παραγόντων AhR, AhRR, ARNT και HSP90 με B[a]P μειώθηκε με την σουλπιρίδη στα H1299, ενώ αυξήθηκε στα A549.

Συζήτηση

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η σουλπιρίδη (SULP), ένα αντιψυχωσικό φάρμακο, που δρα ως εκλεκτικός D₂-ντοπαμινεργικός ανταγωνιστής, μειώνει σημαντικά το περιεχόμενο του ήπατος επιμύων σε ολικά κυτοχρώματα P-450s, τόσο σε επίπεδο βασικής έκφρασης όσο και σε συνθήκες επαγωγής με B[α]P. Αυτή η μείωση μπορεί να αποδοθεί σε σημαντικό βαθμό στην καταστολή της έκφρασης των CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1, τα οποία είναι υπεύθυνα για την βιοενεργοποίηση ενός μεγάλου αριθμού προ-καρκινογόνων ουσιών, στις οποίες εκτιθέμεθα μέσω της διατροφής, της εισπνοής καυσαερίων και του καπνού των τσιγάρων. Επίσης, η SULP κατέστειλε τη βασική έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP3A1 και CYP3A2, που είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό της πλειοψηφίας των συνταγογραφούμενων φαρμάκων και αρκετών προ-καρκινογόνων ουσιών. Φαίνεται, επομένως πως η SULP καταστέλλει την μεταβολική βιομετατροπή των προ-καρκινογόνων στο ήπαρ (Daskalopoulos E.P., 2012, Harkitis P., 2015).

Να σημειωθεί ότι οι D₂-ντοπαμινεργικοί υποδοχείς είναι στόχοι φαρμάκων, που χρησιμοποιούνται σε πολλές νευροεκφυλιστικές νόσους και ψυχοπαθολογικές διαταραχές, όπως είναι η κατάθλιψη, η ψύχωση, η νόσος του Πάρκινσον (Parkinson's disease) και η σχιζοφρένεια. Τα φάρμακα, που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις νόσους είναι είτε D₂-ντοπαμινεργικοί αγωνιστές είτε D₂-ντοπαμινεργικοί ανταγωνιστές και μπορούν να επηρεάζουν τη λειτουργική αποδοτικότητα του ντοπαμινεργικού συστήματος μέσω μίμησης, αποκλεισμού ή τροποποίησης της ευαισθησίας των D₂-υποδοχέων στη ντοπαμίνη (Beaulieu J.M., 2011).

Τα κυτοχρώματα CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 διαδραματίζουν, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, κεντρικό ρόλο στη βιοενεργοποίηση προ-καρκινογόνων και τοξικών ουσιών (Ingelman-Sundberg M., 2001, Piipari R., 2000). Η μειωμένη έκφρασή τους συνδέεται με την μειωμένη παραγωγή ενεργών ηλεκτρονιόφιλων μεταβολιτών και ενεργών ριζών. Τα προϊόντα αυτά αλληλεπιδρούν με κυτταρικά μακρομόρια και μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες, όπως είναι η παραγωγή προϊόντων προσθήκης DNA (DNA adducts), που αν δεν διορθωθούν μπορεί να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις, κυτταρικούς μετασχηματισμούς και τελικά σε καρκίνο (Straif K., 2006).

Είναι γνωστό ότι ο μεταγραφικός παράγοντας AhR ρυθμίζει τόσο την βασική όσο και την επαγόμενη με B[α]P έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 (Barouki R., 2007). Η μεταγραφική ενεργοποίηση αυτών των κυτοχρωμάτων

απαιτεί την πρόσδεση ενός ligand στον AhR, όπως π.χ. ο επαγωγέας B[a]P. Ο AhR υπάρχει ως σύμπλοκο με την HSP90 στο κυτταρόπλασμα. Μετά την πρόσδεση του B[a]P στον AhR, το σύμπλοκο μετατοπίζεται στον πυρήνα, αποδεσμεύει την HSP90, σχηματίζει ετεροδιμερές με τον ARNT και δεσμεύεται σε ειδικές συνενετικές ρυθμιστικές αλληλουχίες (XREs-Xenobiotic Responsive Elements), οι οποίες βρίσκονται ανοδικά (upstream) του υποκινητή (promoter) των ανωτέρω γονιδίων (Barouki R., 2007). Συνεπώς, η καταστολή της επαγόμενης από B[a]P έκφρασης των κυτοχρωμάτων CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 μετά από χορήγηση SULP, καθώς και των μεταγραφικών παραγόντων AhR, HSP90 και ARNT δείχνει ότι η μειωρόθμιση των κυτοχρωμάτων της οικογένειας CYP1 με SULP γίνεται μέσω μηχανισμού, στον οποίο εμπλέκεται το σύστημα του AhR (Mimura J., 1999). Την υπόθεση αυτή επιβεβαιώνει η περαιτέρω ενίσχυση της επαγωγής του μεταγραφικού παράγοντα AhRR με SULP. Είναι γνωστό ότι ο AhRR αναστέλλει την λειτουργία του AhR, εμποδίζοντας τον ARNT στον σχηματισμό του ετεροδιμερούς, αλλάζοντας με αυτό τον τρόπο την ικανότητα σύνδεσης του συμπλόκου στις αλληλουχίες XRE (Evans B.R., 2008). Η αύξηση της έκφρασης του AhRR, σε αντίθεση με την μείωση της έκφρασης των άλλων μεταγραφικών παραγόντων (AhR, HSP90 και ARNT), επιβεβαιώνει προηγούμενες παρατηρήσεις ότι οι αλληλεπιδράσεις AhR-AhRR είναι περισσότερο πολύπλοκες από ένα απλό μοντέλο, όπου ο AhR ενεργοποιεί τον AhRR και ο AhRR καταστέλλει τον AhR. Συγκεκριμένα, μπορεί ο AhR, που έχει σχηματίσει σύμπλοκο με προσδέτη, να μην ενεργοποιεί τον AhRR σε κάθε ιστό (Hahn M.E., 2009). Πρέπει να σημειωθεί ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες AhRR, HSP90 και ARNT δεν κατέχουν ουσιαστικό ρόλο στην μέσω SULP καταστολή της βασικής έκφρασης των κυτοχρωμάτων CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 καθώς δεν επηρεάστηκε η βασική έκφραση των AhRR και ARNT, ενώ αυξήθηκε εκείνη της HSP90 (Beischlag T.V., 2008).

Η μείωση που προκάλεσε η SULP στην έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα φαρμακοτοξικότητας, καθώς μπορεί να οδηγήσουν σε σημαντική αύξηση των επιπέδων των φαρμάκων-υποστρωμάτων στον οργανισμό, παρόλο που μεταβολίζουν μικρό αριθμό συνταγογραφούμενων φαρμάκων. Ειδικά, σε φάρμακα με στενό θεραπευτικό εύρος, τα αποτελέσματα μπορεί να είναι ιδιαίτερα επικίνδυνα, μερικές φορές ακόμα και θανατηφόρα (Gonzalez F.J., 1994, Spatzenegger M., 1995). Σημειωτέον, η καταστολή της έκφρασής των κυτοχρωμάτων από την SULP σημαίνει έκθεση του οργανισμού σε χαμηλότερα επίπεδα καρκινογόνων ουσιών.

Σε επίπεδο μεταγωγής σήματος, υπάρχουν μελέτες, που προτείνουν ότι η SULP δρα μέσω του ηπατικού σηματοδοτικού μονοπατιού insulin/PI3K/AKT/FOXO1 για την μείωση της βασικής έκφρασης των κυτοχρωμάτων CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1. Αναστολή των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων των παγκρεατικών κυττάρων προκαλεί έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα των νησιδίων Langerhans του παγκρέατος. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε απενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού insulin/PI3K/AKT/FOXO1 στα ηπατοκύτταρα (Daskalopoulos E.P., 2012) και πιθανώς, συνδέεται με την μειωμένη έκφραση αρκετών κυτοχρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των CYP1A1/2 και CYP1B1, μεταξύ άλλων.

Έκθεση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 σε SULP δεν επηρέασε τη βασική έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP1A1 και CYP1B1 και των μεταγραφικών παραγόντων, AhR και AhRR, αλλά μείωσε εκείνη του κυτοχρώματος CYP1A2. Μειώθηκε επίσης, η βασική έκφραση του ARNT, ενώ αυξήθηκε της HSP90 με SULP. Αντίθετα, στα κύτταρα A549 η επαγόμενη με B[a]P έκφραση αυτών των CYP1 κυτοχρωμάτων ενισχύθηκε περαιτέρω μετά από έκθεση σε SULP. Παράλληλα, παρατηρήθηκε αύξηση των μεταγραφικών παραγόντων AhR, HSP90, ARNT και AhRR, γεγονός που υποδεικνύει ότι, όπως και στα *in vivo* πειράματα, η ενίσχυση με SULP της επαγωγής των CYP1 κυτοχρωμάτων γίνεται με την συμμετοχή αυτών των μεταγραφικών παραγόντων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η SULP δεν επηρέασε την βασική έκφραση των CYP1 κυτοχρωμάτων στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα H1299, ενώ κατέστειλε την επαγωγή τους με B[a]P, επίδραση που είναι ανάλογη εκείνης, που παρατηρήθηκε σε υγιή πνευμονικό ιστό επιμύων. Η διαφορά που φαίνεται στην επίδραση της SULP στις δύο καρκινικές σειρές ίσως να υποδεικνύει καθοριστικό ρόλο για τον p53, αφού τα H1299 δεν τον εκφράζουν σε αντίθεση με τα A549 (Wohak L.E., 2014).

Η διαφορά στην επίδραση της SULP στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων *in vivo* και *in vitro* πιθανώς, οφείλεται στην πολυεπίπεδη δράση του φαρμάκου *in vivo*. Είναι γνωστό ότι η SULP δρα *in vivo* μέσω κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος και μέσω των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων των β-παγκρεατικών κυττάρων στη ρύθμιση της έκφρασης των προαναφερθέντων CYP1 γονιδίων (Daskalopoulos E.P., 2012). Στα καρκινικά κύτταρα, A549, η διαφοροποιημένη δράση της SULP μπορεί να αποδοθεί σε πιθανή απενεργοποίηση σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών ρύθμισης των κυτοχρωμάτων, καθώς η γενετική αστάθεια είναι το χαρακτηριστικό όλων των

καρκίνων (Lahtz C., 2011). Αυτό είναι ένα πεδίο μελέτης, που χρήζει ενδελεχούς διερεύνησης.

Τέλος, ο μεγάλος αριθμός των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων τόσο στα A549, όσο και στα H1299 υποδεικνύει ότι η δράση της SULT ήταν άμεση στις ανωτέρω καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ταυτόχρονα, η μείωση του πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα, A549 και H1299, από SULT οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ενδεχομένως το ίδιο το φάρμακο να κατέχει αντινεοπλασματικές δράσεις, γεγονός που το καθιστά ένα ενδιαφέρον πεδίο για περαιτέρω διερεύνηση.

Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι η SULT διαφοροποιεί σημαντικά το πνευμονικό μεταβολικό προφίλ στους επίμυες σε σχέση με τους μάρτυρες μειώνοντας την βασική και επαγόμενη με B[a]P έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP1. Ομοίως, στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα, H1299, η SULT περιόρισε την επαγωγή των CYP1 με B[a]P. Επιβεβαιώνεται επίσης ότι η δράση της SULT γίνεται μέσω του συστήματος AhR. Αντιθέτως, η SULT δεν επηρέασε τη βασική και επαγόμενη έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP1 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα, A549. Επιπλέον, ο μεγάλος αριθμός D₂-υποδοχέων στα καρκινικά κύτταρα A549 και H1299 δείχνει την άμεση δράση της SULT στους υποδοχείς. Επιπρόσθετα, η ίδια η SULT φαίνεται να εμφανίζει αντινεοπλασματική δράση. Τα αποτελέσματα από τα *in vitro* και *in vivo* πειραματικά μοντέλα αυτής της μελέτης, παρ' ότι δεν επιτρέπουν την απόλυτη αναγωγή σε ανθρώπινες συνθήκες, δείχνουν ότι η μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου σε σχιζοφρενείς ασθενείς, που κατά πλειοψηφία είναι δεινοί καπνιστές, και λαμβάνουν φαρμακευτική αγωγή βασισμένη σε D₂-ντοπαμινεργικούς ανταγωνιστές, σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό, θα μπορούσε να αποδοθεί, τουλάχιστον κατά ένα μέρος, στη μειωμένη έκφραση σημαντικών κυτοχρωμάτων και συνεπώς στη μειωμένη βιοενεργοποίηση μεγάλου αριθμού προ-καρκινογόνων ουσιών. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση αυτής της υπόθεσης στα πλαίσια κλινικών μελετών.

Περίληψη

Υπάρχουν συσσωρευμένες ενδείξεις ότι οι άντρες ψυχωσικοί-σχιζοφρενείς ασθενείς, που λαμβάνουν ως θεραπευτική αγωγή αντιψυχωσικά φάρμακα εμφανίζουν χαμηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό, αν και συνήθως είναι καπνιστές. Όλα τα αντιψυχωσικά φάρμακα παρουσιάζουν ένα κοινό χαρακτηριστικό: είναι ανταγωνιστές των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων.

Η παρούσα έρευνα μελέτησε την πιθανή συσχέτιση μεταξύ της αντιψυχωσικής φαρμακευτικής αγωγής και της ικανότητας ενεργοποίησης καρκινογόνων ουσιών από τους πνεύμονες. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η επίδραση της σουλπιρίδης (SULP), εκλεκτικός D₂-ντοπαμινεργικός ανταγωνιστής, στο πνευμονικό μεταβολικό προφίλ στα σημαντικότερα κυτοχρώματα μεταβολισμού καρκινογόνων ουσιών, τα CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 στο πειραματικό μοντέλο αρσενικών επιμύων Wistar, καθώς και στις ανθρώπινες καρκινικές σειρές του πνεύμονα A549 και H1299. Επιπλέον, διερευνήθηκε η επίδραση της σουλπιρίδης στον πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων, καθώς και το πλήθος των D₂-υποδοχέων, στις παραπάνω κυτταρικές σειρές.

Η ευρύτερη μελέτη έδειξε ότι η SULP, ένα ευρέως συνταγογραφούμενο φάρμακο, μείωσε την βασική και επαγόμενη με βενζο[α]πυρένιο (B[a]P - ένα ευρέως διαδεδομένο προ-καρκινογόνο) έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 στον πνεύμονα επίμυος.

Στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα, H1299, η SULP μείωσε την επαγωγή των κυτοχρωμάτων CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 με B[a]P. Η δράση της SULP γίνεται μέσω του συστήματος AhR. Η μειωρύθμιση που προκάλεσε η SULP στην επαγωγή με B[a]P μεσολαβείται από τους μεταγραφικούς παράγοντες AhR, AhRR, ARNT και HSP90, που συμμετέχουν στην ρύθμιση των ανωτέρω γονιδίων, ενώ σε βασικό επίπεδο φαίνεται να μη διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο. Αντιθέτως, η SULP δεν επηρέασε την βασική και επαγόμενη έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP1 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα, A549.

Ο μεγάλος αριθμός D₂-υποδοχέων στις καρκινικές σειρές πνεύμονα, A549 και H1299, δείχνει την άμεση δράση της σουλπιρίδης. Ταυτόχρονα, η σουλπιρίδη μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων και στις δύο κυτταρικές σειρές πνεύμονα. Σημειωτέον, ότι στα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα, H1299, ο πληθυσμός αυτός είναι σχεδόν ανύπαρκτος.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι αρκετά κυτοχρώματα, κλειδιά του μηχανισμού βιομετατροπής προ-καρκινογόνων ουσιών, παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση στους πνεύμονες των επιμύων μετά από χορήγηση SULP. Ομοίως, η έκφραση των κυτοχρωμάτων αυτών καταστέλλεται από την SULP στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα, H1299, ενώ δεν επηρεάζεται στα A549, υποδεικνύοντας ένα σημαντικό ρόλο για τον p53 στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων της υποοικογένειας CYP1 στα καρκινικά κύτταρα.

Συμπερασματικά, η μείωση της έκφρασης των κυτοχρωμάτων CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1, μετά από χορήγηση σουλπιρίδης, που παρατηρείται στα *in vitro* και *in vivo* πειραματικά μοντέλα, που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη, μαζί με την πιθανή αντινεοπλασματική δράση της σουλπιρίδης, θα μπορούσε να ερμηνεύσει, τουλάχιστον κατά ένα μέρος, τον μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, που παρατηρείται σε σχιζοφρενείς ασθενείς με φαρμακευτική αγωγή D₂-ντοπαμινεργικών ανταγωνιστών, σε σχέση με τον φυσιολογικό-υγιή πληθυσμό. Βέβαια, τα ανωτέρω αποτελέσματα δεν μπορούν να αναχθούν απολύτως στην ανθρώπινη συνθήκη, αλλά συνιστούν την βάση για ενδελεχή διερεύνηση αυτής της υπόθεσης στα πλαίσια πειραματικών και κλινικών μελετών, όπου θα διερευνηθεί η συμμετοχή και άλλων σημαντικών παραγόντων, όπως των ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων, μεταξύ άλλων.

Abstract

There is accumulating evidence that male psychotic patients following treatment with antipsychotics are at low risk in developing cancer, although they are usually heavy smokers. All antipsychotic drugs display a common feature: they are D₂-dopaminergic antagonists. The present study investigated the effect of Sulpiride (SULP), a selective D₂- antagonist on the pulmonary carcinogen- metabolising profile (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1) of male Wistar rats, and on the human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells, A549 and H1299. The effect of SULP on the cell population and the level of D₂-receptor expression in the above mentioned cell lines was also investigated. The data indicated that SULP markedly repressed the basal and Benzo[a]pyrene (B[a]P)-induced CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 expression in the rat lung. In H1299 lung cancer cells, SULP also reduced the induction of cytochromes CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 by B[a]P through down-regulation of critical factors in the AhR regulatory pathway. In contrast, SULP further increased the induction by B[a]P of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 in A549 lung cancer cells. As in H1299 so in A549 cells, the AhR regulatory pathway plays an important role in the induction by B[a]P of these cytochromes. The high expression level of D₂-Rs detected in the human lung cancer cells A549 and H1299, indicate a potential direct action of SULP on these receptors. It is of interest also to note that SULP markedly decreased the A549 and H1299 cell population. Taken together these findings indicate that D₂-R-linked pathways profoundly play significant roles in pulmonary carcinogenesis and strengthen further our previous findings indicating that D₂-Rs regulate the CYP-dependent carcinogen metabolism in the liver, a critical parameter in carcinogenesis and detoxification of the body.

Βιβλιογραφία

- Aida K., Negishi M. «Post-transcriptional regulation of coumarin 7-hydroxylase (P450Coh) induction by xenobiotics in mouse liver: mRNA stabilization by pyrazole» *Biochemistry* 30, 1991: 8041.
- Akiyama T.E., Gonzalez F.J. «Regulation of P450 genes by liver-enriched transcription factors and nuclear receptors» *Biochimica et Biophysica Acta* 1619, 2003: 223-234.
- Akopyan G., Bonavida B. «Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis» *Int J Oncol* 29, 2006: 745–752.
- Alberg A.J., Samet J.M. «Textbook of Respiratory Medicine (5th ed.), Chapter 46» του/της Murray & Nadel's. Saunders Elsevier, 2010.
- Anand P., Kunnumakkara A.B., Kunnumakara A.B., Sundaram C., Harikumar K.B., Tharakan S.T., Lai O.S., Sung B., Aggarwal B.B. «Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes» *Pharm. Res.* 25 (9) , 2008: 2097–116.
- Anttila S., Tuominen P., Hirvonen A., Nurminen M., Karjalainen A., Hankinson O., Elovaara E. «CYP1A1 levels in lung tissue of tobacco smokers and polymorphisms of CYP1A1 and aromatic hydrocarbon receptor» *Pharmacogenetics* 11, 2001: 501–509.
- Baba T., Mimura J., Gradin K., Kuroiwa A., Watanabe T., Matsuda Y., Inazawa J., Sogawa K., Fujii-Kuriyama Y. «Structure and expression of the Ah receptor repressor gene» *J. Biol. Chem.* 276 (35), 2001: 33101–10.
- Bailey D.G., Dresser G.K. «Interactions between grapefruit juice and cardiovascular drugs» *American Journal of Cardiovascular Drugs* 4 (5), 2004: 281–97.
- Balmain A., and Harris C.C. «Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes» *Carcinogenesis* 21, 2000: 371-377.
- Barouki R., Coumoul X., Fernandez-Salguero P.M. «The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein» *FEBS Letters* 581, 2007: 3608–3615.
- Barry S.J.E., Gaughan T.M., Hunter R. «Schizophrenia» *BMJ Clinical Evidence*, 2012.
- Baylin S.B., Ohm J.E. «Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? » *Nature Reviews Cancer.* 6 (2) , 2006: 107–16.
- Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R. «The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors» *Pharmacol Rev* 63, 2011: 182–217.
- Beischlag T.V., Luis Morales J., Hollingshead B.D., Perdew G.H. «The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression» *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 18, 2008: 207–250.
- Bell C., Bhikha S., Colhoun H., Carter F., Frampton C., Porter R. «The response to sulpiride in social anxiety disorder: D2 receptor function» *Journal of Psychopharmacology* 27 (2), 2013: 146–151.
- Beresford A.P. «CYP1A1: friend or foe?» *Drug Metabolism Reviews* 25 (4), 1993: 503–17.

- Bièche I., Narjoz C., Asselah T., Vacher S., Marcellin P., Lidereau R., Beaune P., de Waziers I. «Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues» *Pharmacogenetics and Genomics* 17 (9), 2007: 731–42.
- Biesalski H.K., Bueno de Mesquita B., Chesson A., et al. «European Consensus Statement on Lung Cancer: risk factors and prevention. Lung Cancer Panel» *CA Cancer J Clin (Smoking is the major risk factor, accounting for about 90% of lung cancer incidence.)* 48 (3):, 1998: 167–176; discussion 164–166.
- Boyland E., Chasseaud L.F. «The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis» *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. Advances in Enzymology – and Related Areas of Molecular Biology* 32, 1969: 173–219.
- Bressler R. «Grapefruit juice and drug interactions. Exploring mechanisms of this interaction and potential toxicity for certain drugs» *Geriatrics* 61 (11), November 2006: 12–8.
- Bressolle F., Bressolle F., Brès J., Fauré-Jeantis A. «Absolute bioavailability, rate of absorption, and dose proportionality of sulpiride in humans» *Journal of Pharmaceutical Sciences* 81 (1), 1992: 26–32.
- Caron E., Rioux N., Nicolas O., LLebel-Talbot H., Hammelin B.A. «Quantification of the Expression and Inducibility of 12 Rat Cytochrome P450 Isoforms by Quantitative RT-PCR» *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 19(6), 2005: 368-378.
- Castell Jose V., Donato M. Teresa, Gomez-Lechon Maria Jose. «Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach» *Experimental and Toxicologic Pathology* 57, 2005: 189–204.
- Catania J.R., McGarrigle B.P., Rittenhouse-Olson K., Olson J.R. «Induction of CYP2B and CYP2E in precision-cut rat liver slices in defined medium» *Toxicology In Vitro* 21, 2007: 109-478.
- Chen G.F., Ronis M.J., Ingelmann-Sundberg M., Badger T.M. «Hormonal regulation of microsomal cytochrome P450E1 and P450 reductase in rat liver and kidney» *Xenobiotica* 29(5), 1999: 437-451.
- Chou F.H., et al. «The incidence and relative risk factors for developing cancer among patients with schizophrenia: a nine-year follow-up study» *Schizophr Res* 129(2-3), 2011: 97-103.
- Cohen S.M., Purtilo D.T. and Ellwein L.B. «Ideas in pathology. Pivotal role of increased cell proliferation in human carcinogenesis» *Mod Pathol* 4, 1991: 371–382.
- Conney A.H. «Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture» *Cancer Res* 42, 1982: 4875–4917.
- Cooper W.A., Lam D.L.C., O'Toole S.A. «Molecular biology of lung cancer» *Journal of Thoracic Disease* 5 (Suppl. 5), 2013: 479–490.
- Crespi C.L., Penman B.W., Gelboin H.V., Gonzalez F.J. «A tobacco smoked-derived nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, is activated by multiple human cytochrome P450 s including the polymorphic human cytochrome P4502D6» *Carcinogenesis* 12, 1991: 1197–1201.

- Cribb A.E., Peyrou M., Muruganandan S., Schneider L. «The endoplasmic reticulum in xenobiotic toxicity» *Drug Metabolism Reviews* 37, 2005: 405 – 442.
- Croce C.M. «Oncogenes and cancer» *N. Engl. J. Med.* 358 (5), 2008: 502–11.
- D'Agostini F., Balansky R.M., Bennicelli C., Lubet R.A., Kelloff G.J.& De Flora S. «Pilot studies evaluating the lung tumor yield in cigarette smoke-exposed mice» *Int J Oncol* 18, 2001: 607-615.
- Dalton S.O., Johansen C., Poulsen A.H., et al. «Cancer risk among users of neuroleptic medication: a population-based cohort study» *Br. J. Cancer* 95 (7). , 2006: 934–939.
- Daskalopoulos E.P., Lang M.A., Marselos M., Malliou F., Konstandi M. «D(2)-dopaminergic receptor-linked pathways: critical regulators of CYP3A, CYP2C, and CYP2D» *Mol Pharmacol* 82(4), 2012: 668-78.
- Dayhoff M.O. «National Biomedical Research Foundation» Στο *Atlas of protein sequence and structure. Vol. 5. Suppl. 3.* Silver Spring, Maryland, 1979.
- Delescluse C., Lemaire G., de Sousa G., Rahamani R. «Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway» *Toxicology* 153, 2000: 73–82.
- Denison M.S., Pandini A., Nagy S.R., Baldwin E.P., Bonati L. «Ligand binding and activation of the Ah receptor» *Chemico-Biological Interactions* 141, 2002: 3-24.
- Dowsley T.F., Reid K., Petsikas D., et al. «Cytochrome P-450-dependent bioactivation of 1,1-dichloroethylene to a reactive epoxide in human lung and liver microsomes» *J Pharmacol Exp Ther* 289, 1999: 641–8.
- Dragani T.A., and Pierotti M.A. «Animal models to look for polygenic effects in cancer predisposition» Στο *The Genetics of Cancer, Vol. 4,* του/της M.J. (eds) Ponder B.A.J. and Waring, 111-122. Dordrecht: Kluwer, 1995.
- Drocourt L., Ourlin J.C., Pascussi J.M., Maurel P., Vilarem M.J. «Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 Is Regulated by the Vitamin D Receptor Pathway in Primary Human Hepatocytes» *The Journal of Biological Chemistry*, 2002.
- Droll K., Bruce-Mensah K., Otto S.V., Gaedigk A., Sellers E.M., Tyndale R.F. «Comparision of three CYP2D6 probe substrates and genotype in Ghaninans, Chinese and Caucasians» *Pharmacogenetics* 8(4), 1998: 325-333.
- du Pan R.M., Muller C. «Cancer mortality in patients of psychiatric hospitals» *Schweiz. Med. Wochenschr.* 107 (17), 1977: 597–604.
- Eaton D.L., Gallagher E.P., Bammler T.K., Kunze K.L. «Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: Implications for human variability in expression and enzyme activity» *Pharmacogenetics* 5, 1995: 259 – 274.
- El-Mansoury A.M., Morgan N.G. «Activation of protein kinase C modulates alpha2-adrenergic signaling in rat pancreatic islets» *Cellular Signaling* 10(9), 1998: 637-643.
- Elovaara Eivor, Mikkola Jouni, Stockmann-Juvala Helene, Luukkanen Leena, Keski-Hynnälä Helena, Kostiaainen Risto, Pasanen Markku, Pelkonen Olavi, Vainio Harri. «Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolizing enzyme activities in human lung, and their inducibility by exposure to naphthalene, phenanthrene,

pyrene, chrysene, and benzo(a)pyrene as shown in the rat lung and liver» *Arch Toxicol* 81(3), 2007: p. 169.

- Essali A., Al-Haj Haasan N., Li C., Rathbone J. «Clozapine versus typical neuroleptic medication for schizophrenia» *The Cochrane database of systematic reviews (1)*. John Wiley and Sons, Ltd., 2009. 21.
- Evans B.R., Karchner S.I., Allan L.L., Pollenz R.S., Tanguay R.L., Jenny M.J., Sherr D.H., Hahn M.E. «Repression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling by AHR repressor: role of DNA binding and competition for AHR nuclear translocator» *Mol. Pharmacol.* 73 (2), 2008: 387–98.
- Falk S., Williams C. «Lung Cancer—the facts (3rd ed.)» Chapter 1. 3–4. Oxford University Press, 2010.
- Fernandez-Salguero P., Gonzalez F.J. «The CYP2A gene subfamily: species differences, regulation, catalytic activities and role in chemical carcinogenesis» *Pharmacogenetics* 5 (Special Issue):, 1995: S123–8.
- Fernandez-Salguero P., Hoffman S.G., Cholerton S., Mohernweiser H., Raunio H., Rautio A., Pelkonen O., Huang J., Evans W.E., Idle J.R., Gonzalez F.J. «A Genetic polymorphism in coumarin-7-hydroxylation: Sequence of human CYP2A genes and identification of variant CYP2A6 alleles» *The American Journal of Human Genetics* 57(3), 1995: 651-660.
- Flint M.S., Hood B.L., Sun M., Stewart N.A., Jones-Laughner J., Conrads T.P. «Proteomic analysis of the murine liver in response to a combined exposure to psychological stress and 7,12-dimethylbenz(a) anthracene» *J. Proteome Res* 9, 2010: 509–520.
- Flockhart D.A. «Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table» *Indiana University School of Medicine. Retrieved on July 2011, 2007.*
- Foulds, L. «The experimental study of tumor progression: a review» *Cancer Res* 14, 1954: 327–339.
- Fulgoni V.L. and Ramirez A.G. «Cancer. The role of diet, nutrition, and fitness» *Cancer* 83, 1998: 1775-1783.
- Gariboldi M., Manenti G., Canzian F., Falvella F.S., Radice M.T., Pierotti M.A., Della Porta G., Binelli G. and Dragani T.A. «A major susceptibility locus to murine lung carcinogenesis maps on chromosome 6» *Nature Genet.* 3, 1993: 132-136.
- Giaccone G., Battey J., Gazdar A.F., Oie H., Draoui M., Moody T.W. «Neuromedin B is present in lung cancer cell lines» *Cancer Res.* 52 (9 Suppl), May 1992: 2732s–2736s. PMID 1563005.
- Goldacre M.J., Kurina L.M., Wotton C.J., Yeates D., Seagroatt V. «Schizophrenia and cancer: an epidemiological study» *Br. J. Psychiatry* 187, 2005: 334–338.
- Gonzalez F. J., Crespi H., M Aceij M. Czerwinsk and Gelboin Harry V. «Analysis Activities of Human Cytochrome and Expression» *Tohoku J. Exp. Med.* 168, 1992: 67-72.
- Gonzalez F.J. and Gelboin H.V. «Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins» *Drug Metab Rev* 26, 1994: 165–183.

- Gonzalez F.J. «Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1» *Mutation Research* 569, 2005: 101-110.
- Gonzalez F.J., Gelboin H.V. «Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins» *Drug Metabolism Reviews* 26(1&2), 1994: 165-183.
- Gonzalez F.J., Kimura S. «Understanding the role of xenobiotic metabolism in chemical carcinogenesis using gene knockout mice» *Mutation Research* 477, 2001: 79-87.
- Gonzalez F.J., Yu AI. «Cytochrome P450 and Xenobiotic Receptor in Humanized Mice» *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 46, 2006: 41–64.
- Gonzalez J.F. «Transgenic models in xenobiotic metabolism and toxicology» *Elsevier Toxicology* 181–182, 2002: 237–239.
- Gonzalez J.F. «Molecular biology of human xenobiotic-metabolizing cytochromes P450: role of vaccinia virus cDNA expression in evaluating catalytic function» *Toxicology* 82 , 1993: 77-88 .
- Gonzalez J.F., Shioko K. «Understanding the role of xenobiotic-metabolism in chemical carcinogenesis using gene knockout mice» *Mutation Research* 477, 2001: 79–87.
- Goodwin B., Moore L.B., Stoltz C.M., McKee D.D., Kliewer S.A. «Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor» *Molecular Pharmacology* 60, 2001: 427-431.
- Grimmer G., Jacob J., Dettbarn G., Naujack K.W. «Determination of urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) for the risk assessment of PAH-exposed workers» *Int Arch Occup Environ Health* 69, 1997: 231–239.
- Grinshpoon A., Barchana M., Ponizovsky A., et al. «Cancer in schizophrenia: is the risk higher or lower?» *Schizophr. Res.* 73 (2–3), 2005: 333–341. .
- Grisham J.W., Kaufmann W.K. and Kaufmann D.G. «The cell cycle and chemical carcinogenesis» *Surv Synth Patho Res* 1, 1984: 49–66. .
- Guengerich E.P. «Cytochrome P450, drugs and diseases» *Molecular Interventions* 3(4), 2003: 194-204.
- Guengerich F.P. «Metabolism of chemical carcinogens» *Carcinogenesis* 21, 2000: 345-351.
- Guengerich F.P. «Uncommon P450-Catalyzed Reactions» *Current Drug Metabolism* 2, 2001: 93 -115.
- Guengerich F.P. «Characterization of human cytochrome P450 enzymes» *The FASEB Journal* 6(2), 1992: 745-748.
- Gulbinat W., Dupont A., Jablensky A., et al. «Cancer incidence of schizophrenic patients. Results of record linkage studies in three countries» *Br. J. Psychiatry Suppl.* 18, 1992: 75–83.
- Hahn M.E., Allan L.L., Sherr D.H. «Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: complex interactions involving the AHR repressor» *Biochem Pharmacol* 77, 2009: 485–497.

- Harkitis P., Daskalopoulos E.P., Malliou F., Lang M.A., Marselos M., Fotopoulos A., Albucharali G. and Konstandi M. «Dopamine D2-receptor antagonists down-regulate CYP1A1/2 and CYP1B1 in the rat liver» *PLOS one, in press. 2015*, 2015.
- Harvey R.A., Champe P.C. «Εισαγωγή στην φαρμακολογία» Αθήνα: Επιστημονικές εκδόσεις Γρ Παρισιάνος, 2007.
- Hasegawa R., Futakuchi M., Mizoguchi Y., Yamaguchi T., Shirai T., Ito N. and Lijinsky W. «Studies of initiation and promotion of carcinogenesis by N-nitroso compounds» *Cancer Lett 123*, 1998: 185–191.
- Haseman J.K., Huff J.E., Rao G.N. and Eustis S.L. «Sources of variability in rodent carcinogenicity studies» *Fund. Appl. Toxicol. 12*, 1989: 793-804.
- Hayashi S., Watanabe J., Kawajiri K. «Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIIE1 gene» *Journal of Biochemistry 110 (4)*, 1991: 559–65. PMID 1778977.
- Hayes R.B. «Genetic susceptibility and occupational cancer» *Med Lav 86*, 1995: 206–213.
- Hecht S.S. «Lung carcinogenesis by tobacco smoke» *International Journal of Cancer 131 (12)*, 2012: 2724–2732.
- Hecht S.S. «Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer» *Nat Rev Cancer 3*, 2003: 733–744.
- Hecht S.S. «Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines» *Chem Res Toxicol 11*, 1998: 559–603.
- Hecht S.S. «Tobacco smoke carcinogens and lung cancer» *J Natl Cancer Inst 91*, 1999: 1194-1210.
- Hecht S.S., Carmella S. G., Murphy S. E., Foiles P. G., Chung F. L. *Journal of Cell Biochem. Suppl. 17F*, 1993: 27.
- Hecht S.S., Hochalter J.B., Villalta P.W., Murphy S.E. «2'-hydroxylation of nicotine by cytochrome P450 2A6 and human liver microsomes: formation of a lung carcinogen precursor» *Proc National Academy of Science 97*, 2000 : 12493-12497.
- Herbst R.S., Heymach J.V., Lippman S.M. «Lung cancer» *New England Journal of Medicine 359 (13)*, September 2008: 1367–1380.
- Hippisley-Cox J., Vinogradova Y., Coupland C., Parker C. «Risk of malignancy in patients with schizophrenia or bipolar disorder: nested case–control study» *Arch. Gen. Psychiatry 64 (12)*, 2007: 1368–1376 .
- Hironi T., Chow T., Imaoka S., Funae Y. «Catalytic Specificity of CYP2D Isoforms in Rat and Human» *Drug Metabolism and Disposition 30(9)*, 2002: 970-976.
- Ho Y.S., Chen C.H., Wang Y.J., Pestell R.G., Albanese C., Chen R.J., Chang M.C., et al. «Tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induces cell proliferation in normal human bronchial epithelial cells through NFκB activation and cyclin D1 up-regulation» *Toxicol Appl Pharmacol 205*, 2005: 133–148.
- Hollenberg P.F. «Characteristics and common properties of inhibitors, inducers and activators of CYP enzymes» *Drug Metabolism Review 34(1&2)*, 2002: 17 – 35.

- Holloway M.G., Laz E.V., Waxman D.J. «Codependence of growth-hormone responsive, sexually dimorphic hepatic gene expression on signal transducer and activator of transcription 5b and hepatic nuclear factor 4alpha» *Molecular Endocrinology* 20(3), 2006: 647-660.
- Honkakoski P., Zelko I., Sueyoshi T., Negishi M. «The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene» *Mol Cell Biol* 18, 1998a : 5652-5658.
- Hor K., Taylor M. «Suicide and schizophrenia: a systematic review of rates and risk factors» *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* 24 (4 Suppl.), 2010: 81–90.
- Horn L., Lovly C.M., Johnson D.H. «Neoplasms of the lung» Στο *Harrison's Principles of Internal Medicine (19th ed.)*, του/της Hauser SL, Jameson JL, Fauci AS, Longo DL, Loscalzo J. Kasper DL, Chapter 107. McGraw-Hill. ISBN 978-0-07-180216-1., 2015.
- Hotchkiss J.H. «Preformed N-nitroso compounds in foods and beverages» *Cancer Surv.* 8, 1989: 295–32.
- Hukkanen J. «Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes in Human Lung» Department of Toxicology and Pharmacology. University of Oulu, 2000.
- IARC, Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. *Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data*. Lyon, 1983.
- «International Agency for Research on Cancer (IARC)» Some N-nitroso Compounds» Του/Της Vol 17. IARC, 83–124. Lyon (France):, 1983.
- Ingelman-Sundberg M. «Human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms» *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 369(1), 2004: 89-104.
- Ingelman-Sundberg M. «Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes» *Mutation Research* 482, 2001: 11 - 19.
- Ingelman-Sundberg M. «Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity» *The Pharmacogenomics Journal* 50, 2005: 195-200.
- Ingelman-Sundberg M. «Polymorphism of Cytochrome P450 and Xenobiotic Toxicity» *Toxicology* 181-182, 2002: 447 - 452.
- Ingelman-Sundberg M. «The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research» *Toxicology and Applied Pharmacology* 207, 2005: 52 – 56.
- Ioannides C. «Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics» John Wiley and Sons, 2001.
- Ioannides C. , Parke D.V. «Induction of Cytochrome P4501 as an Indicator of Potential Chemical Carcinogenesis» *Drug Metabolism Reviews* 25, 1993: 485–501.

- Iyanagi T. «Molecular Mechanisms of Phase I and Phase II Drug Metabolizing Enzymes: Implication for Detoxification» *International Review of Cytology* 260, 2007: 35 – 112.
- Jacinto F.V., Esteller M. «Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer» *Mutagenesis*. 22 (4), 2007: 247–53.
- Jakopovic M., Thomas A., Balasubramaniam S. «Targeting the epigenome in lung cancer: expanding approaches to epigenetic therapy» *Frontiers in Oncology* 3 (261), 2013: (261).
- Jakszyn P. and Gonzalez C.A. «Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence» *World journal of gastroenterology : WJG* 12 (27):, 2006: 4296–303.
- Jin Z., Gao F., Flagg T., Deng X. «Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone promotes functional cooperation of Bcl2 and c-Myc through phosphorylation in regulating cell survival and proliferation» *J Biol Chem* 279, 2004: 40209–40219.
- Johnson T.N., Rostami-Hodjegan A., Tucker G.T. «Prediction of the clearance of eleven drugs and associated variability in neonates, infants and children» *Clin Pharmacokinet* 45 (9), 2006: 931–56.
- Joseph P.D., Guengerich F.P., Miners J.O. «Phase I and Phase II Drug Metabolism: Terminology that we should phase out» *Drug Metabolism Reviews* 37, 2005: 575-580.
- Kamataki T., Fujieda M., Kiyotani K., Iwano S., Kunitoh H. «Genetic polymorphism of CYP2A6 as one of the potential determinants of tobacco-related cancer risk» *Biochem Biophys Res Commun* 338, 2005: 306-10.
- Kanwal R., Gupta S. «Epigenetic modifications in cancer» *Clinical Genetics*. 81 (4), 2012: 303–11 .
- Kilic T., Ural D., Ural E., Yumuk Z., Agacdiken A., Sahin T., et al. «Relation between proinflammatory to anti-inflammatory cytokine ratios and long-term prognosis in patients with non-ST elevation acute coronary syndrome» *Heart* 92, 2006: 1041–1046.
- Kim J.H., Sherman M.E., Curriero F.C., Guengerich F.P., Strickland P.T., Sutter T.R. «Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers» *Toxicol Appl Pharmacol* 199, 2004: 210–219 .
- Kim S.K., Novak R.F. «The role of intracellular signaling in insulin mediated regulated of drug metabolizing enzyme gene and protein expression» *Pharmacology and Therapeutics* 113, 2007: 88-120.
- Klaunig J.E., Goldblatt P.J., Hinton D.E., Lipsky M.M., Chacko J., Trump B.F. «Mouse liver cell culture. I. Hepatocyte isolation» *In Vitro* 17, 1981: 913–925.
- Knudson A.G. «Two genetic hits (more or less) to cancer» *Nature Reviews Cancer*. 1 (2), 2001: 157–62.
- Koizumi A., Tsukada M., Hirano S., Kamiyama S., Masuda H. and Suzuki K.T. «Energy restriction that inhibits cellular proliferation by torpor can decrease

susceptibility to spontaneous and asbestos-induced lung tumors in A/J mice» *Lab. Invest.* 68 , 1993: 728-739

- Konstandi M. «Psychophysiological stress: a significant parameter in drug pharmacokinetics» *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 9 , 2013: 1317–1334.
- Konstandi M., Harkitis P., Kostakis D., Marselos M., Johnson E.O., Lang M.A. «D2-receptor-linked signaling pathways regulate the expression of hepatic CYP2E1» *Life Sci.* 82, 2008: 1–10.
- Konstandi M., Johnson E., Lang M.A., Camus-Radon A.M., Marselos M. «Stress modulates the enzymatic inducibility by benzo[alpha]pyrene in the rat liver» *Pharmacol Res* 42, 2000: 205–211.
- Konstandi M., Johnson E., Lang M.A., Malamas M., Marselos M.N. «Noradrenaline, dopamine, serotonin: different effects of psychological stress on brain biogenic amines in mice and rats» *Pharmacol Res* 41, 2000: 341–346.
- Konstandi M., Johnson E.O., Lang M.A. «Consequences of psychophysiological stress on cytochrome P450-catalyzed drug metabolism» *Neurosci Biobehav Rev* 45C, 2014: 149–167.
- Konstandi M., Johnson E.O., Marselos M., Kostakis D., Fotopoulos A., Lang M.A. «Stress-mediated modulation of B(alpha)P-induced hepatic CYP1A1: role of catecholamines» *Chem Biol Interact* 147, 2004: 65–77.
- Konstandi M., Kostakis D., Harkitis P., Johnson E.O., Marselos M., Adamidis K., et al. «Benzo(alpha) pyrene-induced up-regulation of CYP1A2 gene expression: role of adrenoceptor-linked signaling pathways» *Life Sci.* 79, 2006: 331–341.
- Konstandi M., Kostakis D., Harkitis P., Marselos M., Johnson E.O., Adamidis K. et al. «Role of adrenoceptor-linked signaling pathways in the regulation of CYP1A1 gene expression» *Biochem Pharmacol* 69, 2005: 277–287.
- Konstandi M., Kostakis D., Johnson E., Lang M.A., Marselos M.E. «Evidence of alpha2-adrenoceptor involvement in B[alpha]P induction processes of drug-metabolizing enzymes: the effect of stress» *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet* 23, 1998: 491–495.
- Konstandi M., Marselos M., Radon-Camus A.M., Johnson E., Lang M.A. «The role of stress in the regulation of drug metabolizing enzymes in mice» *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet* 23, 1998: 483–490.
- Kumar V., Abbas A.K, Aster J.C. *Robbins Basic Pathology (9th ed.)*. Elsevier Saunders, ch 12, p. 505.
- Lacy C.F., Armstrong L.L., Goldman M.P., Lance L.L. «Cytochrome P450 Enzymes: Substrates, Inhibitors, and Inducers. Hudson, OH:» *LexiComp Inc.*, 2007: 1899–1912.
- Lahtz C., Pfeifer G.P. «Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer» *J Mol Cell Biol.* 3 (1), 2011: 51–8 .
- Laruelle M., Abi-Dargham A., van Dyck C.H., et al. «Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (17), 1996: 9235–40.

- Laursen T.M., Munk-Olsen T., Vestergaard M. «Life expectancy and cardiovascular mortality in persons with schizophrenia» *Current opinion in psychiatry* 25 (2) , 2012: 83–8.
- LeCluyse E.L. «Pregnane X Receptor: Molecular Basis for Species Differences in CYP3A Induction by Xenobiotics» *Chemico-Biological Interactions* 134(3), 2001: 283-289.
- Leucht S., Burkard T., Henderson J., Maj M., Sartorius N. «Physical illness and schizophrenia: a review of the literature» *Acta Psychiatr. Scand.* 116 (5), 2007: 317–333.
- Lewis D.F., Lake B.G., Bird M.G., Loizou G.D., Dickins M., Goldfarb P.S. «Homology modelling of human CYP2E1 based on the CYP2C5 crystal structure: investigation of enzyme-substrate and enzyme-inhibitor interactions» *Toxicology in Vitro* 17 (1), 2003: 93–105.
- Lichtermann D., Ekelund J., Pukkala E., Tanskanen A., Lonnqvist J. «Incidence of cancer among persons with schizophrenia and their relatives» *Arch. Gen. Psychiatry* 58 (6), 2001: 573–578.
- Lin D.L., Chang C. «p53 is a mediator for radiation-repressed human TR2 orphan receptor expression in MCF-7 cells, a new pathway from tumor suppressor to member of the steroid receptor superfamily» *J. Biol. Chem.* 271 (25), June 1996: 14649–52.
- Lin Yuanguang, Zhang Ming, Barnes Peter F. «Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to Mycobacterium tuberculosis» *Infection and Immunity* 66 (3), 1998: 1121–6.
- Liston H.L., Markowitz J.S., DeVane C.L. «Drug glucuronidation in clinical psychopharmacology» *J Clin Psychopharmacol* 21 (5), 2001: 500–15.
- Lu C., Onn A., Vaporciyan A.A., et al. 78: *Cancer of the Lung. Holland-Frei Cancer Medicine (8th ed.)*. People's Medical Publishing House.
- Lubin J.H., Blot W.J., Berrino F., Flamant R., Gillis C.R., Kunze M., Schmähl D. & Visco G. «Risk of developing cancer by changing habits of cigarette smoking» *Br Med J* 288, 1984: 1953-56.
- Luch A. «Nature and nurture – lessons from chemical carcinogenesis» *Nat Rev Cancer*, 2005: 113–125.
- Manenti G., Binelli G., Gariboldi M., Canzian F., De Gregorio L., Falvella F.S., Dragan T.A. and Pierotti M.A. «Multiple loci affect genetic predisposition to hepatocarcinogenesis in mice» *Genomics*, 23, 1994: 118-124.
- Manenti Giacomo, Galbiati Federica, Noci Sara and Dragani A. Tommaso. «Outbred CD-1 mice carry the susceptibility allele at the pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas1) locus» *Carcinogenesis vol.24 no.6* , 2003: 1143-1148.
- MarselosM., MalamasM. «Φαρμακολογία I & II» Ιωάννινα: Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο, 2004.
- Mayer U.A. «Overview of Enzymes of Drug Metabolism» *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 24(5), 1996: 449 – 459.

- Metha R. «The potential for the use of cell proliferation and oncogene expression as intermediate markers during liver carcinogenesis» *Cancer Lett* 93, 1995: 85–102.
- Mimura J., Ema M., Sogawa K., Fujii-Kuriyama Y. «Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function» *Genes Dev* 13, 1999: 20–25.
- Mirvish S.S. «Blocking the formation of N-nitroso compounds with ascorbic acid in vitro and in vivo» *Ann N Y Acad Sci.*258, 1975: 175–180.
- Moncoin A., Truong N.T., Garrone A., Beaune P., Barouki R., DeWaizers I. «Identification of a 16-nucleotide sequence that mediates post-transcriptional regulation of rat CYP2E1 by insulin» *Journal of Biological Chemistry* 277(48), 2002: 45904-45910.
- Mortensen P.B. «The occurrence of cancer in first admitted schizophrenic patients» *Schizophr. Res.* 12 (3), 1994: 185–194.
- Mortensen P.B. «The incidence of cancer in schizophrenic patients» *J. Epidemiol. Community Health* 43 (1), 1989: 43–47.
- Murphy P.J. «Xenobiotic metabolism: a look from the past to the future» *Drug Metab. Dispos.* 29 (6), 2001: 779–80.
- Murray G.I., Taylor M.C., McFadyen M.C.E., McKay J.A., Greenlee W.F., Burke M.D., Melvin W.T. «Tumor specific expression of cytochrome P450 CYP1B1» *Cancer Research* 53, 1997 : 3026-3031.
- Nadler S.G. and Strobe H.W. «Identification and characterization of an NADPHcytochrome P450 reductase derived peptide involved in binding to cytochrome P450» *Arch. Biochem. Biophys.* 290, 1991: 277-284.
- Nagase H., Bryson S., Fee F.& Balmain A. «Multigenic control of skin tumour development in mice» *Ciba Found Symp* 197, 1996: 156-168.
- Naheed M., Green B. «Focus on clozapine» *Current Medical Research and Opinion* 17 (3), 2001: 223–9.
- Nebert D.W. «The Ah locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation and birth defects» *Curr Rev Tox* 20, 1989: 153–174.
- Nebert D.W., Dalton T.D., Okey A.B., Gonzalez F.J. «Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Enviromental Toxicity and Cancer» *The Journal of Biological Chemistry* 279(23), 2004: 23847 – 23850.
- Nelson D. «Cytochrome P450 in Humans», 2004.
- Nelson D.R., Kamataki T., Waxman D.J., Guengerich F.P., Estabrook R.W., Feyereisen R., Gonzalez F.J., Coon M.J., Gunsalus I.C., Gotoh O., Okuda K. and Nebert D.W. «P450 superfamily: update on new sequences» *DNA Cell Biol.* 12, 1993: 1-5.
- Nesnow S., Ross J.A., Stoner G.D., Mass M.J. «Mechanistic linkage between DNA adducts, mutations in oncogenes and tumorigenesis of carcinogenic environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in strain A/J mice» *Toxicology* 105,1995: 403–13.

- Novak R.F., Woodcroft K.J. «The alcohol inducible form of cytochrome P450 (CYP2E1): role in toxicology and regulation of expression» *Archives of Pharmacal Research* 23(4), 2000: 267-282.
- Novartis Pharmaceuticals. «Prescribing Information» *Novartis Pharmaceuticals*, 2006: 36.
- Oliveira PA., Colaço A., Chaves R., Guedes-Pinto H., Luis F. De-La-Cruz P. and Lopes C. «*Chemical carcinogenesis*», 2007.
- Oscarson M. «Genetic Polymorphisms in the Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) Gene: Implications for Interindividual Differences in Nicotine Metabolism» *Drug Metabolism and Disposition* 29(2), 2001: 91-95.
- Pani L., Gessa G.L. «The substituted benzamides and their clinical potential on dysthymia and on the negative symptoms of schizophrenia» *Molecular Psychiatry* 7 (3) , 2002: 247–253. .
- Patten C.J., Smith T.J., Murphy S.E., Wang M.H., Lee J., Tynes R.E., Koch P., et al. «Kinetic analysis of the activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by heterologously expressed human P450 enzymes and the effect of P450-specific chemical inhibitors on this activation in human liver microsomes» *Arch Biochem Biophys* 333, 1996: 127–138.
- Pelkonen O., Rautio A., Raunio H., Pasanen M. «CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase» *Toxicology* 144 (1–3), 2000: 139–47.
- Pelkonen O., Maenpaa J., Taavitsainen P., Rautio A., Raunio H. «Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes» *Xenobiotica* 28(2), 1998: 1203 – 1253.
- Pelkonen O., Nebert D.W. «Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis» *Pharmacol Rev* 34: , 1982: 189–222.
- Pelkonen O., Raunio H. «Metabolic Activation of Toxins: Tissue-specific Expression and Metabolism in Target Organs» *Environmental Health Perspectives* 105(4), 1997: 767-774.
- Peng H.M., Coon M.J. «Regulation of rabbit cytochrome P450 2E1 expression in HepG2 cells by insulin and thyroid hormone» *Molecular Pharmacology* 54(4), 1998: 740-747.
- Peto R., Lopez A.D., Boreham J., et al. «Mortality from smoking in developed countries 1950–2000: Indirect estimates from National Vital Statistics» Oxford University Press.
- Peto R., Lopez A.D, Boreham J., Thun M., Heath C. Jr & Doll R. «Mortality from smoking worldwide» *Br Med Bull* 52, 1996: 12-21.
- Phillips D.H. «Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet» *Mutat Res* 443, 1999: 139-147.
- Piipari R., Savela K., Nurminen T., et al. «Expression of CYP1A1, CYP1B1 and CYP3A, and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in bronchoalveolar macrophages of smokers and non-smokers» *Int J Cancer* 86, 2000: 610–6.

- Porubsky P.R., Meneely K.M., Scott E.E. «Structures of human cytochrome P-450 2E1. Insights into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates» *The Journal of Biological Chemistry* 283 (48), 2008: 33698–707.
- Quattrochi L.C., Vu T., Tukey R.H. «The human CYP1A2 gene and induction by 3-methylcholanthrene: a region of DNA that supports Ah-receptor binding and promoter-specific induction» *J Biol Chem* 269, 1994: 6949–6954.
- Raaska K., Neuvonen P.J. «Ciprofloxacin increases serum clozapine and N-desmethylclozapine: a study in patients with schizophrenia» *European Journal of Clinical Pharmacology* 56 (8), 2000: 585–9.
- Rabstein L.S., Peters R.L. and Spahn G.J. «Spontaneous tumors and pathologic lesions in SWR-J mice» *J. Natl Cancer Inst.* 50, 1973: 751-758.
- Raucy J.L., Schultz E.D., Wester M.R., Arora S., Johnston D.E., Omdahl J.L., Carpenter S.P. «Human lymphocyte cytochrome P450 2E1, a putative marker for alcohol-mediated changes in hepatic chlorzoxazone activity» *Drug Metabolism and Disposition* 25 (12), 1997: 1429–35.
- Rendic S., Di Carlo F.J. «Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors» *Drug Metabolism Reviews* 29 (1-2), 1997: 413–580.
- Rendic S. «Summary of information on human CYP enzymes: Human P450 metabolism data» *Drug Metabolism Reviews* 34(1&2), 2002: 83-448.
- Rice M.C. and O'Brien, S.J. «Genetic variance of laboratory outbred Swiss mice» *Nature*, 283, 1980: 157-161.
- Richardson M. «*Environmental Xenobiotics*» Taylor & Francis Ltd.
- Rifkind A.B. «CYP1A1 in TCDD toxicity and physiology – with particular reference to CYP dependent arachidonic acid metabolism and other endogenous substrates» *Drug Metabolism Reviews* 38, 2006: 291 – 335.
- Rosti G., Bevilacqua G., Bidoli P., et al. «Small cell lung cancer» *Annals of Oncology* 17 (Suppl. 2), 2006: 5–10.
- Rubi B., Ljubcic S., Pournourmohammadi S., Carrobio S., Armanet M., Bartley C., Maechler P. «Dopamine D2-like receptors are expressed in pancreatic beta cells and mediate inhibition of insulin secretion» *Journal of Biological Chemistry* 280(44), 2005: 36824-3683.
- Rybakowski J.K., Skibinska M., Kapelski P., Kaczmarek L., Hauser J. «Functional polymorphism of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene in schizophrenia» *Schizophr. Res.* 109 (1–3), 2009: 90–93.
- Sarlis N.J., Gourgiotis L. «Hormonal Effects on Drug Metabolism Through the CYP System: Perspectives on their Potential Significance in the Era of Pharmacogenomics» *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders* 5, 2005: 439 – 448.
- Schiff Judith Ann. «An unsung hero of medical research» *Yale Alumni Magazine*, 2002.: Retrieved 2006-04-19.

- Schoedel K.A., Tyndale R.F. «Induction of nicotine-metabolizing CYP2B1 by ethanol and ethanol-metabolizing CYP2E1 by nicotine: summary and implications» *Biochimica et Biophysica Acta* 1619, 2003: 283-290.
- Scordo M.G., Caputi A.P., D' Arrigo C., Fava G., Spina E. «Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population» *Pharmacological Research* 50, 2004: 195-200.
- Sellakumar A., Shubik P. «Carcinogenicity of different polycyclic hydrocarbons in the respiratory tract of hamsters» *J Natl Cancer Inst* 53, 1974: 1713–9.
- Sheweita S.A. «Drug-Metabolizing Enzymes: Mechanisms and Functions» *Current Drug Metabolism* 1, 2000: 107 – 132.
- Shibata M., Sakaki T., Yabusaki Y., Murakami H. and Ohkawa H. «Genetically engineered P450 monooxygenases: construction of bovine P450C 17 yeast reductase fused enzymes» *DNA Cell Biol.* 9, 1990: 27-36.
- Shimada T., Gillam E.M., Oda Y., Tsumura F., Sutter T.R., Guengerich F.P., Inoue K. «Metabolism of benzo[a]pyrene to trans-7,8-dihydroxy-7, 8-dihydrobenzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 1B1 and purified liver epoxide hydrolase» *Chem Res Toxicol* 12, 1999: 623–629.
- Shimada T., Hayes CL, Yamazaki H., Amin S., Hecht S.S., Guengerich F.P. and Sutter T.R. «Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1» *Cancer Res* 56, 1996: 2979-2984.
- Shimada T., Inoue K., Suzuki Y., Kawai T., Azuma E., Nakajima T., Shindo M., Kurose K., Sugie A., Yamagishi Y., Fujii-Kuriyama Y. and Hashimoto M. «Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57Bl/6J mice» *Carcinogenesis* 23, 2002: 1199-1207.
- Shimada T., Martin M.V., Pruess-Schwartz D., Marnett L.J. & Guengerich F.P. «Roles of individual human cytochrome P-450 enzymes in the bioactivation of benzo(a)pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons», *Cancer Res* 49., 1989: 6304-6312.
- Shimada T., Yamazaki H., Foroozesh M., Hopkins N.E., Alworth W.L., Guengerich F.P. «Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1» *Chem Res Toxicol* 11, 1998: 1048–1056.
- Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Wakamiya N., Ueng Y.F., Guengerich F.P., Inui Y. «Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs» *Drug Metab Dispos* 24, 1996: 515–5.
- Shimada T., Hayes C.L., Yamazaki H., Amin S., Hecht S.S., Guengerich F.P., Sutter T.R. «Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1» *Cancer Res* 56, 1996: 2979–2984.
- Shimkin M.B. and Stoner G.D. «Lung tumors in mice: application to carcinogenesis bioassay» *Adv. Cancer Res.* 21, 1975: 1-58.

- Shindo S., Numazawa S., Yoshida T. «A physiological role of AMP-activated protein kinase in phenobarbital mediated constitutive androstane receptor activation and CYP2B induction» *The Biochemical Journal* 401, 2007: 735-741.
- Slaga T.J., Bracken W.J., Gleason G., Levin W., Yagi H., Jerina D.M. & Conney A.H. «Marked differences in the tumor-initiating activities of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo(a)pyrene 7,8,-diol-9,10-epoxides» *Cancer Res* 39 , 1979: 67-71.
- Smith G.B.J., Bend J.R., Bedard L.L., et al. «Biotransformation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in peripheral human lung microsomes» *Drug Metab Dispos* 31, 2003: 1134–41.
- Smith T.J., Guo Z., Guengerich F.P., Yang C.S. «Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by human cytochrome P450 1A2 and its inhibition by phenethyl isothiocyanate» *Carcinogenesis* 17, 1996: 809–813.
- Souket P., Gut I. «Chromosomes P-450 in Rats Structures, Functions, Properties and Relevant Human Forms» *Xenobiotica* 22(1), 1992: 83-103.
- Spatzenegger M. and Jaeger W. «Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism» *Drug Metab Rev* 27, 1995: 397–417.
- Straif Kurt, Baan Robert, Grosse Yann, Secretan Béatrice, Ghissassi Fatiha El, Cogliano Vincent. «On behalf of the WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons» 2006.
- Ström A., Westin S., Eguchi H., Gustafsson J.A., Mode A. «Characterisation of orphan nuclear receptor binding elements in sex-differentiated members of the CYP2C gene family expressed in rat liver» *The Journal of Biological Chemistry* 270(19), 1995: 11276-11281.
- Suchiya Y., Nakajima M., Kyo S., Kanaya T., Inoue M., Yokoi T. «Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor » *Cancer Res* 64, 2004: 3119–3125.
- Sueyoshi T., Kawamoto T., Zelko I., Honkakoski P., Negishi M. «The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene» *J Biol Chem* 274, 1999 : 6043-6046.
- Sutter T.R., Guzman K., Dold K.M., Greenlee W.F. «Targets for dioxin: genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1 β » *Science* 254, 1991: 415–418.
- Taavitsainen P. «Cytochrome P450 Isoform Specific in Vitro Methods to Predict Drug Metabolism and Interactions» Department of Toxicology and Pharmacology. University of Oulu, 2001.
- Tabares-Seisdedos R., Rubenstein J.L. «Chromosome 8p as a potential hub for developmental neuropsychiatric disorders: implications for schizophrenia, autism and cancer» *Mol. Psychiatry* 14 (6) , 2009: 563–589.
- Takahatsi T., Lasker J.M., Rosman A.S. et al. «Induction of cytochrome P450 2E1 in human liver by ethanol is caused by a corresponding increase in encoding messenger RNA» *Hepatology* 17, 1993: 236-245.

- Tannenbaum S.R., Wishnok J.S., Leaf C.D. «Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid» *The American Journal of Clinical Nutrition* 53 (1 Suppl), 1991: 247S–250S.
- Taylor D., Paton C., Shitij K. «*The Maudsley prescribing guidelines in psychiatry*» West Sussex: Wiley-Blackwell., 2012.
- Testa B. «The metabolism of drugs and other xenobiotics» London: Academic Press, 1995.
- Testa B., Krämer S. «The biochemistry of drug metabolism—an introduction: part 1. Principles and overview» *Chem Biodivers* 3 (10), 2006: 1053–101.
- Theocharidis T.K. «Βασικές αρχές και Φαρμακοκινητική: Φαρμακολογία, Βασικές έννοιες στην κλινική πράξη». Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 1997.
- Thun M.J., Hannan L.M., Adams-Campbell L.L., et al. «Lung cancer occurrence in never-smokers: an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies» *PLoS Medicine* 5 (9), 2008: e185.
- Tilloy-Ellul A., Raffalli-Mathieu F., Lang M. «Analysis of RNA-protein interactions of mouse liver cytochrome P4502A5 mRNA» *Biochem J* 339, 1999: 695-703.
- Tricker A.R., Preussmann R. «Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential» *Mutat Res.* 259, 1991 : 277–289
- Tsiftoglou A. «Βασική και Κλινική Τοξικολογία» Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις ArtotText, 1997.
- Tsuchiya Y., Nakajima M., Takagi S., Taniya T., Yokoi T. «MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1» *Cancer Res* 66, 2006: :9090–9098.
- Tuomisto J., Mannisto P. «Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones» *Pharmacological Reviews* 37, 1985: 249-332.
- Van Os J., Kapur S. «Schizophrenia» *Lancet* 374 (9690), 2009: 635–45.
- Wahlbeck K., Cheine M., Essali M.A. «Clozapine versus typical neuroleptic medication for schizophrenia» *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. (John Wiley and Sons, Ltd.) (2), 2007.
- Walker S. «Updates in non-small cell lung cancer» *Clin J Oncol Nurs* 12(4), 2008: 587–596.
- Wang J., Omori I.M., Fenton M., Soares B. «*Sulpiride augmentation for schizophrenia*» *The Cochrane Database of Systematic Reviews* (1), 2010.
- Waxman D.J. «P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: Central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPARA» *Archives of Biochemistry and Biophysics* 369(1), 1999: 11-23.
- Weinstein I.B., Jeffrey A.M., Jennette K.W., Blobstein S.H., Harvey R.G., Harris C., Auer H., Kasai H. & Nakanishi K. «Benzo[a]pyrene diol epoxides as intermediates in nucleic acid binding in vitro and in vivo» *Science* 193, 1976: 592-595.
- West K.A., Linnoila I.R., Belinsky S.A., Harris C.C., Dennis P.A. «Tobacco carcinogen-induced cellular transformation increases activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway in vitro and in vivo» *Cancer Res* 64, 2004: 446–451.

- Wiener D., Doerge D. R., Fang J.-L., Upadhyaya P. & Lazarus P. «Characterization of N-Glucuronidation of the lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-Butanol (NNAL) in human liver: importance of udp-glucuronosyltransferase 1A4» *Drug Metabolism and Disposition* 32, 2004: 72-79.
- Wiklund E.D., Catts V.S., Catts S.V., et al. «Cytotoxic effects of antipsychotic drugs implicate cholesterol homeostasis as a novel chemotherapeutic target» *Int. J. Cancer* 126 (1), 2010: 28–40.
- Wohak L.E., Kraus A.M., Kucab J.E., et al. «Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons induce CYP1A1 in human cells via a p53-dependent mechanism» *Toxicokinetics and Metabolism*, 2014: 291-304.
- Woodcroft K.J., Hafner M.S., Novak R.F. «Insulin signaling in the transcriptional and posttranscriptional regulation of CYP2E1 expression» *Hepatology* 35, 2002: 263–273.
- Woodcroft K.J., Novak R.F. «Insulin effects on CYP2E1, 2B, 3A and 4A expression in primary cultured rat hepatocytes» *Chemico-Biological Interactions* 107, 1997: 75-91.
- World Health Organization. «World Cancer Report 2014» Chapter 1.1. , 2014.
- Wrighton S.A., Stevens J.C. «The human hepatic cytochrome P450 involved in Drug Metabolism» *Drug Metabolism Reviews* 38, 2006: 291-335.
- Wyde M.E., Batrolucci E., Ueda A., Zhang H., Yan B., Negishi M., You L. «The Enviromental Pollutanat 1,1-Dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethylene Induces Rat Hepatic Cytochrome P450 2B and 3A Expression Through the constitutive Androstane Receptor and Pregnane X Receptor» *Molecular Pharmacology* 64, 2003: 474-481.
- Yamamoto J., Ihara K., Nakayama H., Hikino S., Satoh K., Kubo N., Iida T., Fujii Y., Hara T. «Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells» *Life Sci.* 74 (8), 2004: 1039–49.
- Yamazaki H., Oda Y., Funae Y., Imaoka S., Inui Y., Guengerich F.P., Shimada T. «Participation of rat liver cytochrome P450 2E1 in the activation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine nitrosodiethylamine to products genotoxic in an acetyltransferase-overexpressing Salmonella typhimurium strain (NM2009)» *Carcinogenesis* 13, 1992: 979–985.
- Yde C.W., Clausen M.P., Bennetzen M.V., Lykkesfeldt A.E., Mouritsen O.G., Guerra B. «The antipsychotic drug chlorpromazine enhances the cytotoxic effect of tamoxifen in tamoxifen-sensitive and tamoxifen-resistant human breast cancer cells» *Anticancer Drugs* 20 (8), 2009: 723–735.
- You L. «Steroid hormone biotransformation and xenobiotic induction of hepatic steroid metabolizing enzymes» *Chemico-Biological Interactions* 147, 2004: 233-246
- Zuber R., Anzenbacherová E., Anzenbacher P. «Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism» *The Journal of Cellular and molecular medicine* 6(2), 2002: 89 – 198

Συντμήσεις

3-MC:	3-μεθυλ-χολανθρένιο
AHH:	υδροξυλάση των αρυλ-υδρογονανθράκων
AhR:	υποδοχέας των αρυλ-υδρογονανθράκων
AhRR:	αναστολέας του υποδοχέα των αρυλ-υδρογονανθράκων
AR:	αδρενεργικοί υποδοχείς
ARNT:	πυρηνικός μετατοπιστής του AhR
B[α]P:	βενζο[α]πυρένιο
BPDE:	(7R,8S)-διϋδροξύ (9S,10R)-εποξυ-7,8,9,10-τετραϋδροβενζο[α]πυρένιο
CAR:	ιδιοστατικά ενεργός υποδοχέας των ανδροστανίων
CYPs:	ισοένζυμα του κυτοχρώματος P-450
DA:	ντοπαμίνη
DBD:	περιοχή πρόσδεσης στο DNA
DEN:	διαιθυλονιτροζαμίνη
DMBA:	7,12-διμεθυλβενζ[α]ανθρακένιο
DMN:	διμεθυλονιτροζαμίνη
EGFR:	υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
EH:	εποξειδική υδρολάση
EM:	επαρκείς μεταβολιτές
ER:	ενδοπλασματικό δίκτυο
GABA:	γ-αμινο-βουτηρικό οξύ
Glucs:	γλυκουρονικά παράγωγα
GSH:	γλουταθειόνη
GSTs:	τρανσφεράσες της γλουταθειόνης
HSP:	heat shock protein
5-HT:	5-υδροξυτρυπταμίνη (σεροτονίνη)
IM:	ενδιάμεσοι μεταβολιτές
i.p.:	ενδοπεριτοναϊκός
LBD:	τμήμα σύνδεσης του προσδέτη
MFO:	mixed function oxidase
miRNA:	microRNA
NAD(H):	νικοτιναμυδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (αναχθέν)
NADP(H):	φωσφορικό νικοτιναμυδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (αναχθέν)

NK cells:	κύτταρα φυσικοί φόννοι
NNK:	4-(μεθυλονιτροζαμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόνη
NNAL:	α-υδροξυ-4-(μεθυλονιτροζαμίνο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόλη
NR:	πυρηνικοί υποδοχείς
NSCLC:	μη-μικρό κυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα
PAHs:	πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ)
PCN:	πρεγνενολόνη 16α-καρβονιτρίλιο
P-gp:	P-γλυκοπρωτεΐνες
PI3K:	φωσφατιδυλινοσιτόλη 3-κινάση
PKC:	πρωτεΐνη κινάσης C
PM:	φτωχοί μεταβολιτές
PXR:	υποδοχέας X της πρεγνάνης
ROS:	ενεργά είδη οξυγόνου
RXR:	υποδοχέας X του ρετινοϊκού οξέος
s.c. :	υποδορίως
SCLC:	μικρό κυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα
SULP:	σουλπιρίδη
UM:	υπερταχείς μεταβολιτές
v/v:	όγκος κατ' όγκο
w/v:	βάρος κατ' όγκο
XAP2:	X associated protein 2
XREs:	στοιχεία απόκρισης στα ξενοβιοτικά