

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ
ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΤΟΥ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200099





Α
Δρ. 626 3305

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

1352

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ. Ε. ΛΩΛΗΣ

ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε. ΓΙΑΝΝΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ
ΤΗΣ ΑΡΥΛΑΜΙΝΟ-N-ΑΚΕΤΥΛΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΦΙΛΙΑΔΗΣ
ΟΥΡΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2000



262/2002



"Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα".

(Νόμος 5343/ 32, άρθρο 202, παράγραφος 2)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Δ. Λώλης

Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη:

Ξ. Γιαννακόπουλος

Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ι. Γεωργίου

Επίκουρος Καθηγητής Γενετικής
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Λώλης Δ.

Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αγνάντη Ν.

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καλινδέρης Α.

Καθηγητής Ουρολογίας
Ιατρικής Σχολής Α.Π.Θ.

Σεφεριάδης Κ.

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ευαγγέλου Α.

Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γιαννακόπουλος Ξ.

Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γεωργίου Ι.

Επίκουρος Καθηγητής Γενετικής
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	11
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ	15
1.1 Η επιδημιολογική έκταση του προβλήματος	15
1.1.1 Κάπνισμα και καρκίνος της ουροδόχου κύστης	15
1.1.2 Επαγγελματική έκθεση σε καρκινογόνα και καρκίνος της ουροδόχου κύστης	16
1.1.3 Έμμεση επιδημιολογική μαρτυρία του ρόλου της χημικής καρκινογένεσης στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης	16
1.2 Η βιοχημική προσέγγιση- ουροθηλιακά καρκινογόνα	17
1.2.1 Καρκινογόνα των αρυλαμινών	17
1.2.2 Ο ρόλος των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων	18
1.2.3 Διαιτητικοί παράγοντες και καρκίνος της ουροδόχου κύστης	18
1.2.4 Κατανάλωση φαρμάκων και καρκίνος της ουροδόχου κύστης	18
1.3 Μεταβολισμός των καρκινογόνων αρυλαμινών	20
1.3.1 Η N-ακετυλίωση	20
1.3.2 Η N- υδροξυλίωση	21
1.3.3 Η γλυκουρονιδίωση	21
1.3.4 Ο ρόλος των ιόντων αρυλνιτρενίου	21
2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΑΚΕΤΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΡΥΛΑΜΙΝΩΝ	22
2.1 Ο πολυμορφισμός της N-ακετυλτρανσφεράσης	22
2.1.1 Φαινοτυπικός προσδιορισμός του ακετυλιωτικού πολυμορφισμού	22
2.1.2 Παρενέργειες του πολυμορφικού ακετυλιωτικού φαινοτύπου.....	22
2.1.3 Η απομόνωση της N- ακετυλτρανσφεράσης	23
2.1.4 Η γενετική ανάλυση της N- ακετυλτρανσφεράσης	23
2.1.4.1 Τα γονίδια NAT1 και NAT2	24
2.1.4.2 Υποστρώματα των ισοενζύμων της N- ακετυλτρανσφεράσης	26
2.1.4.3 Εκφραση των γονιδίων της N- ακετυλτρανσφεράσης στον άνθρωπο	26
2.1.4.4 Η γενετική ποικιλομορφία του γονιδίου NAT-2	26
2.1.4.5 Λειτουργική ταξινόμηση των μεταλλακτικών αλληλομόρφων	30
2.1.4.6 Γενετική Επιδημιολογία του ακετυλιωτικού πολυμορφισμού	31
3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΕ ΠΑΡΟΜΟΙΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ	32
3.1 Μοριακή Επιδημιολογία	32
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	35
5. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	37
5.1 Ασθενείς και Μάρτυρες	37

5.2 Μεθοδολογία της μοριακής ανάλυσης	38
5.2.1 Συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης	38
5.3 Στατιστική ανάλυση	43
6.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	44
6.1 Αποτελέσματα	44
6.2 Πίνακες	45
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	54
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	55
SUMMARY	57
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	 59



Στους Γονείς μου



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Υγείας της Μητέρας, της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, με την επίβλεψη του Καθηγητή Δημητρίου Ε. Λώλη.

Το θέμα αφορά τη διερεύνηση του ενδεχόμενου ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ των γονοτύπων που ευθύνονται για την αργή ακετυλίωση με αυξημένο κίνδυνο νόσησης από καρκίνο ουροδόχου κύστης. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν άτομα που προέρχονταν από το χώρο ευθύνης του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, δηλαδή την Ήπειρο και τη Δυτική Στερεά Ελλάδα. Τον πληθυσμό της μελέτης αποτέλεσαν άτομα που προσήλθαν στην Ουρολογική Κλινική του ίδιου Νοσοκομείου, είτε για αντιμετώπιση διάφορων μη κακοήθων νοσημάτων του ουροποιητικού (μάρτυρες) είτε προκειμένου να υποβληθούν σε χειρουργική αντιμετώπιση καρκίνου ουροδόχου κύστης (ασθενείς).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τον επιβλέποντα Καθηγητή Κο Δ.Ε. Λώλη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ ερευνητικά στο χώρο της γενετικής.

Τον Επίκουρο Καθηγητή Κο Ξ. Γιαννακόπουλο, Διευθυντή της Ουρολογικής Κλινικής, για τη συνολική βοήθεια του στην εκπόνηση της μελέτης, ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής.

Τον Επίκουρο Καθηγητή Γενετικής Κο Ι. Γεωργίου, για την ανάθεση του θέματος και την καθοριστική καθοδήγησή του σε όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Τον Επίκουρο Καθηγητή της Υγιεινής Κο Ι. Αλαμάνο, για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και την επιδημιολογική προσέγγιση του θέματος.

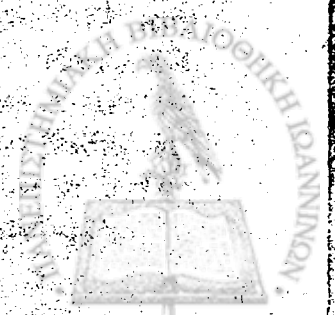
Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογικής Χημείας Κο Σεφεριάδη Κωνσταντίνο, για τις χρήσιμες παρατηρήσεις του αναφορικά με τους χημικούς τύπους και τις αντιδράσεις που αναφέρονται στην εργασία.

Τον Κο Β. Κρανά, Βιολόγο, για τη βοήθειά του στην εξαγωγή DNA και στην επεξεργασία της παρουσίασης των αποτελεσμάτων.

Την Κα Ε. Λογοθέτη, ιατρό, για την ουσιαστική βοήθειά της στην επιμέλεια του κειμένου και στο τελικό αποτέλεσμα.



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι ο τέταρτος συχνότερος τύπος καρκίνου στους άνδρες παγκοσμίως και η δεύτερη συχνότερη κακοήθεια του ουροποιητικού συστήματος στις ΗΠΑ¹. Σύμφωνα με πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα αποτελεί την έβδομη αιτία θανάτου στις Δυτικές χώρες^{2,3}. Υπολογίζεται ότι η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου της ουροδόχου κύστης κατά τη διάρκεια της ζωής ενός Καυκάσιου στις ΗΠΑ είναι 3% και 1% για τους άνδρες και τις γυναίκες, αντιστοίχως¹.

Παρά την πεποίθηση πως πολλοί αιτιολογικοί παράγοντες εμπλέκονται στην καρκινογένεση του μεταβατικού επιθηλίου στην ουροδόχο κύστη, η κακοήθεια αυτή συνδέεται αιτιολογικά, σε μεγαλύτερο βαθμό από οποιοδήποτε άλλο νεόπλασμα, με την έκθεση σε χημικά καρκινογόνα. Οι πρώτες παρατηρήσεις αυτής της συσχέτισης έχουν ιστορία 100 ετών⁴, ενώ εκτιμήσεις μεγάλων επιδημιολογικών μελετών υπολογίζουν ότι 60-70% των περιπτώσεων του καρκίνου της ΟΥΚ αποδίδονται στην έκθεση σε συγκεκριμένα χημικά καρκινογόνα⁵.

Αναμφίβολα, κάθε προσπάθεια να εξηγήσουμε αιτιολογικά το σύνολο των περιπτώσεων του καρκίνου της ουροδόχου κύστης περιπλέκεται, από τη στιγμή που η καρκινογένεση στην ουροδόχο κύστη είναι μία σύνθετη, πολυσταδιακή διεργασία. Αυτό που γίνεται πλέον αποδεκτό από την πλειονότητα των ερευνητών είναι ότι η χρόνια έκθεση στα χημικά καρκινογόνα, αν και αποτελεί προϋπόθεση της εμφάνισης καρκίνου στην ουροδόχο κύστη, αδυνατεί να εξηγήσει όλες τις περιπτώσεις εμφάνισης της νόσου και, πολύ περισσότερο, την απουσία της σε άτομα με ιστορικό μακροχρόνιας, βαριάς έκθεσης σε καρκινογόνα του ουροθηλίου⁵. Οι παρατηρήσεις αυτές αποτελούν τη βάση της υπόθεσης ότι σαφώς υπάρχουν και γενετικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην όλη διαδικασία. Επομένως, η δεδομένη ύπαρξη διαφορών από άτομο σε άτομο τόσο στον κίνδυνο για νόσηση από καρκίνο ουροδόχου κύστης όσο και στη συμπεριφορά της νόσου, μπορεί να αποδοθεί, εκτός από το βαθμό έκθεσης σε χημικά καρκινογόνα, και σε κληρονομούμενους (γενετικούς) παράγοντες. Με άλλα λόγια, άτομα με κληρονομούμενη μειωμένη ικανότητα μεταβολισμού των χημικών καρκινογόνων είναι σαφώς περισσότερο ευπαθή στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης⁶.

1.1 Η επιδημιολογική έκταση του προβλήματος.

Το κάπνισμα και η επαγγελματική έκθεση αποτελούν τις σημαντικότερες αιτίες καρκίνου ουροδόχου κύστης, ειδικά στις Δυτικές χώρες. Στους παράγοντες αυτούς αποδίδεται το 60-70% των περιπτώσεων^{5,6,7}.

1.1.1 Κάπνισμα και καρκίνος της ουροδόχου κύστης.

Συγκεκριμένα, το κάπνισμα θεωρείται υπεύθυνο για το 40-50% του συνόλου των περιπτώσεων καρκίνου ουροδόχου κύστης μεταξύ των ανδρών και για το 30% των περιπτώσεων στις γυναίκες^{1,2,8,9}. Οι καπνιστές παρουσιάζουν σχετικό κίνδυνο 2-4 για καρκίνο ουροδόχου κύστης^{1,7,10,11,12} και ο κίνδυνος αυτός σχετίζεται με τον αριθμό των τσιγάρων που καπνίζονται, τη διάρκεια καπνίσματος και το βαθμό εισπνοής του καπνού¹³. Πρώην καπνιστές παρουσιάζουν μειωμένο κίνδυνο σε σχέση με τους ενεργούς καπνιστές^{10,14,15}, ενώ, για όσους αποφασίζουν να διακόψουν το

κάπνισμα, ο κίνδυνος καρκίνου ουροδόχου κύστης θα μειωθεί σημαντικά μέσα σε 2 με 4 χρόνια, αλλά ποτέ δεν θα φθάσει στα επίπεδα όσων δεν κάπνισαν ποτέ¹.

1.1.2 Επαγγελματική έκθεση και καρκίνος της ουροδόχου κύστης.

Η επαγγελματική έκθεση σε χημικές ουσίες, που αποτελεί τον παλιότερο αιτιολογικό παράγοντα εμφάνισης καρκίνου του ουροθηλίου⁴, θεωρείται σήμερα ως υπεύθυνη για περίπου 19% και 6% των περιπτώσεων καρκίνου ουροδόχου κύστης, σε άνδρες και γυναίκες, αντιστοίχως¹⁶.

Ο αριθμός των επαγγεμάτων που ενοχοποιούνται για αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου ουροδόχου κύστης είναι μεγάλος. Επαγγέλματα που έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο νόσησης από καρκίνο ουροδόχου κύστης είναι οι εργάτες της αυτοκινητοβιομηχανίας ή των συνεργείων αυτοκινήτων, οι ζωγράφοι, οι μπογιατζήδες, οι οδηγοί φορτηγών, οι χειριστές τρυπανίων, οι εργάτες επεξεργασίας δέρματος, οι μηχανικοί μετάλλων, όσοι εκτίθενται σε στεγνά καθαριστικά ρούχων, οι εργαζόμενοι στην επεξεργασία του χαρτιού, οι παρασκευαστές σκοινιών και νημάτων, οι οδοντοτεχνίτες, οι κουρείς, οι εργάτες βιομηχανίας ένδυσης και υδραυλικοί^{16,17,18,19,20}. Παραμένει επίσης υπό διερεύνηση, εάν η έκθεση στα εντομοκτόνα (σε αγρότες και εργάτες στη βιομηχανική παραγωγή των ουσιών αυτών) αποτελεί και αυτή παράγοντα κινδύνου στην εμφάνιση καρκίνου ουροδόχου κύστης²¹.

Η ποικιλία των επαγγεμάτων που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου ουροδόχου κύστης καθιστά δύσκολη την εκτίμηση του σχετικού κινδύνου για καρκινογένεση στην ουροδόχο κύστη λόγω της επαγγελματικής έκθεσης. Παρόλα αυτά διάφορες αδρές εκτιμήσεις έχουν δείξει σχετικό κίνδυνο 3-6 για όσους εκτίθεντο λόγω επαγγέλματος σε ουροθηλιακά καρκινογόνα^{16,22}. Ο κίνδυνος αυξάνεται ανάλογα με το χρόνο έκθεσης στις ουσίες αυτές²². Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι το κάπνισμα σε συνδυασμό με την επαγγελματική έκθεση σε ουροθηλιακά καρκινογόνα έχει πολλαπλασιαστική και όχι αθροιστική επίδραση στον κίνδυνο καρκίνου ουροδόχου κύστης¹⁴.

Είναι γεγονός ότι η βιομηχανική επεξεργασία και η χρήση πολλών από τις ουσίες που ενοχοποιούνται για εμφάνιση καρκίνου της ουροδόχου κύστης έχει εγκαταλειφθεί ή περιορίστηκε μόνο σε ορισμένα εργοστάσια με ειδικές προδιαγραφές ασφάλειας. Καθώς όμως οι επαγγελματικοί ουροθηλιακοί καρκίνοι συνήθως γεννώνται μετά από μακροχρόνια λανθάνουσα περίοδο που φθάνει μέχρι και τα 40 χρόνια από την πρώτη έκθεση (Μέσος όρος 25 χρόνια)^{5,16,23,24}, συνεχίζουν μέχρι και σήμερα να διαγιγνώσκονται νέοι ασθενείς με επαγγελματικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

1.1.3 Έμμεση επιδημιολογική μαρτυρία του ρόλου της χημικής καρκινογένεσης στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

Παρά το γεγονός ότι η επίπτωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης παροισιάζει τη μικρότερη, συγκριτικά με άλλες νεοπλασίες, διακύμανση από χώρα σε χώρα, η αναλογία επίπτωσης μεταξύ των χωρών υψηλής και χαμηλής συχνότητας εμφάνισης της νόσου φθάνει το 6:1. Οι διαφορές αυτές αποδίδονται στη συνδυασμένη δράση περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Εντός της ίδιας χώρας, έχει παρατηρηθεί υψηλότερη επίπτωση καρκίνου ουροδόχου κύστης σε βιομηχανικές περιοχές και ειδικά σε περιοχές με μονάδες χημικής βιομηχανίας²⁵. Έχει παρατηρηθεί μία πιθανή συσχέτιση μεταξύ υψηλής συχνότητας καρκίνου ουροδόχου κύστης σε χαμηλές κοινωνικοοικονομικές ομάδες πληθυσμού. Αναμφισβήτητα, όμως, η επαγγελματική

τική έκθεση στα καρκινογόνα και πιθανόν το κάπνισμα χαρακτηρίζει τις ομάδες αυτές πληθυσμού και, πιθανότατα, συμβάλλει στην παρατήρηση των διαφορών αυτών²⁵.

Οι άνδρες παρουσιάζουν συχνότερα τη νόσο και μία αναλογία 2.7-3.1/1 μεταξύ των Λευκών ανδρών και γυναικών γίνεται πλέον σήμερα παγκοσμίως αποδεκτή¹. Αν και είναι πιθανή η γενετική εμπλοκή στη διαφορά αυτή, αποτελεί κοινή παραδοχή ότι η επίπτωση του καπνίσματος είναι υψηλότερη στους άνδρες και, επιπρόσθετα, τα επαγγέλματα που ενοχοποιούνται για βαριά έκθεση σε χημικά καρκινογόνα αποτελούν θλιβερό "προνόμιο" του ανδρικού πληθυσμού μέχρι σήμερα.

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι σε μεγάλο βαθμό νόσος της τρίτης ηλικίας. Η διαπίστωση αυτή συμβαδίζει με την αντίληψη ότι το ουροθήλιο πρέπει να εκτεθεί σε χημικά καρκινογόνα για ικανό χρονικό διάστημα πριν την έναρξη της διαδικασίας της καρκινογένεσης^{16,23,24}. Παρατηρήθηκε μάλιστα ότι η λανθάνουσα περίοδος από την αρχική έκθεση σε καρκινογόνα μέχρι το σχηματισμό καρκίνου ουροδόχου κύστης πλησιάζει τα 30 με 40 έτη. Επιπρόσθετα η προχωρημένη ηλικία επιφέρει αλλαγές στη φυσιολογία του κατώτερου ουροποιητικού με αποτέλεσμα την αδυναμία της ουροδόχου κύστης να συσπασθεί επαρκώς και, βεβαίως, την εμφάνιση της καλοήγου υπερτροφίας του προστάτη στους άνδρες²⁶. Οι αλλαγές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τη μακροχρονιότερη έκθεση του ουροθηλίου στους μεταβολίτες των καρκινογόνων των ούρων.

Ο οικογενής καρκίνος της ουροδόχου κύστης θεωρείται ότι είναι υπεύθυνος για 3-5% του συνόλου των περιπτώσεων στους Καυκάσιους. Ατομα με ιστορικό συγγενών α' βαθμού με καρκίνο ουροδόχου κύστης, παρουσιάζουν σχετικό κίνδυνο 1.5 - 2.0 για τη νόσο^{27,28,29}. Αν και είναι σαφές ότι άγνωστοι γενετικοί παράγοντες συμβάλλουν σε αυτή τη μικρής έκτασης οικογενή προδιάθεση, μία λογική εξήγηση είναι ότι άτομα της ίδιας οικογένειας εκτίθενται στα ίδια περιβαλλοντικά καρκινογόνα και φέρουν κοινές κληρονομούμενες αλλαγές του γενετικού υλικού που τα καθιστούν μη επαρκώς ικανά να μεταβολίζουν τα χημικά καρκινογόνα σε αθώους μεταβολίτες.

1.2 Η βιοχημική προσέγγιση- καρκινογόνα του ουροθηλίου.

1.2.1 Καρκινογόνες αρυλαμίνες.

Οι αρώματικές αμίνες αποτελούν τις μόνες ουσίες που αποδεδειγμένα εμπλέκονται στη διαδικασία της χημικής καρκινογένεσης του ουροθηλίου. Το κοινό στοιχείο των ουσιών αυτών, από χημική άποψη, είναι η ύπαρξη αμινο-ομάδων, οι οποίες θεωρείται ότι διαδραματίζουν ενεργό ρόλο στην έναρξη της καρκινογένεσης^{30,31,32,22,33,34,35}. Παραδείγματα αρυλαμινών με καρκινογόνο δράση είναι οι ουσίες της Εικόνας 1.

Μεταξύ των διαφόρων αρυλαμινών οι ουσίες που, μέσω της βασικής έρευνας και των επιδημιολογικών συσχετίσεων, απέδειξαν την καρκινογόνο δράση τους είναι η 2-να-φθυλαμίνη, η βενζιδίνη και τα παράγωγά της, και η 4-αμινοδιφαινύλη (Ξενυλαμίνη)^{36,37,38}. Με βάση τα ευρήματα αυτά, η βιομηχανική παραγωγή της 2-ναφθυλαμίνης και της 4-αμινοδιφαινύλης σταμάτησε στη Μ. Βρετανία από τη δεκαετία του 1950 και η παραγωγή βενζιδίνης από το 1962^{22,38,39}. Το μέτρο αυτό ακολούθησε η πλειονότητα των δυτικών χωρών κατόπιν, και, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη συγκεκριμένων προδιαγραφών ασφαλείας για ελαχιστοποίηση κάθε πιθανής έκθεσης στους επαγγελματικούς χώρους, οι προσπάθειες αυτές οδήγησαν στη μείωση της συχνότητας του επαγγελματικού καρκίνου της ουροδόχου κύστης^{1,2,8}.

Δυστυχώς όμως, δύο από τις παραπάνω ουσίες που ενοχοποιήθηκαν ως καρκινογόνα του επαγγελματικού ουροθηλιακού καρκίνου στο πρώτο μισό του αιώνα, η 4-αμινοδιφαινύλη και η 2-ναφθυλαμίνη, βρέθηκε, στα τέλη του αιώνα μας, ότι παράγονται από την πυρόλυση διαφόρων ουσιών του καπνού του τσιγάρου, και, επομένως, μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού συνεχίζει να εκτίθεται σε αυτές^{9,10,12,14,23}.

Άλλες ουσίες από την οικογένεια των αρυλαμινών, όπως η 4,4'-μεθυλενο-bis (2-χλωροανιλίνη) (MOCA) και η 3,3'-διχλωροβενζιδίνη (DCB), που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία των πλαστικών,⁴⁰ ή η 2-μεθοξυ-5-μεθυλανιλίνη (p-cresidine), που αποτελεί χρωστική των μαλλιών και στην οποία εκτίθενται οι κομμωτές⁴¹, ενδέχεται να ασκούν καρκινογόνο δράση στο ουροθήλιο, αν και η σχετικά μικρή διάρκεια έκθεσης στις ουσίες αυτές δεν μας επιτρέπει να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα.

1.2.2 Ο ρόλος των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων.

Εκτός από τις αρυλαμίνες, μία άλλη κατηγορία χημικών ουσιών, τα εποξειδίου που προέρχονται από τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ) έχουν επίσης ανιχνευθεί στον καπνό του τσιγάρου και θεωρείται ότι ασκούν καρκινογόνο επίδραση στο ουροθήλιο.⁴² Θεωρητικά, μάλιστα, υπάρχει ο φόβος ότι οι ουσίες αυτές μπορούν να αποδειχθούν ακόμη περισσότερο επιβλαβείς από τις αρυλαμίνες στο μέλλον, καθώς η έκθεση των ανθρώπων σε αυτές μπορεί να συμβεί όχι μόνο από το κάπνισμα και την ενδεχόμενη επαγγελματική έκθεση, αλλά επίσης από τη εισπνοή καυσαερίων και συγκεκριμένο τύπο δίαιτας. Μεταξύ των ουσιών αυτής της κατηγορίας, το βενζοπυρένιο (benzo (a) pyrene- 7,8- diol- 9,10- oxide), θεωρείται ότι έχει καρκινογόνο δράση επί του ουροθηλίου^{42,43}.

1.2.3 Διαιτητικοί παράγοντες και καρκίνος της ουροδόχου κύστης.

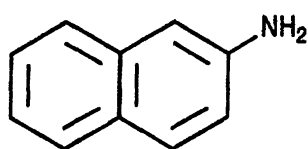
Οι διαιτητικές συνήθειες, ως παράγοντας κινδύνου για καρκίνο της ουροδόχου κύστης, παραμένουν υπό αμφισβήτηση. Αν και διάφορες ουσίες έχουν καταδειχθεί είτε ως αιτιολογικοί (λιπαρά, χοληστερόλη), είτε ως προστατευτικοί (λαχανικά, καροτίνη, φρούτα, τροφές πλούσιες σε βιταμίνη Α) παράγοντες ανάπτυξης καρκίνου τα υπάρχοντα στοιχεία εξακολουθούν να παραμένουν ασαφή αναφορικά με τον ρόλο της δίαιτας στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης². Η κατανάλωση καφεΐνης, γλυκαντικών ουσιών και αλκοόλ, αν και αρχικά θεωρήθηκαν ως αιτιολογικοί παράγοντες καρκίνου ουροδόχου κύστης, δεν σχετίστηκαν αιτιολογικά με καρκίνο του ουροθηλίου σε μεγάλες μελέτες^{44,45}. Η μόνη πιθανή συσχέτιση μεταξύ διαιτητικού παράγοντα και καρκίνου ουροδόχου κύστης μπορεί, με επιφυλάξεις, να θεωρηθεί πολλή υψηλή κατανάλωση καφεΐνης^{2,46,47}.

1.2.4 Κατανάλωση φαρμάκων και καρκίνος της ουροδόχου κύστης.

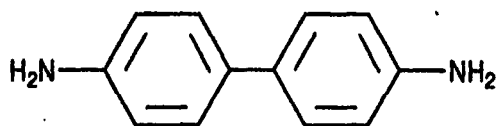
Διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα έχουν προταθεί ως καρκινογόνα της ουροδόχου κύστης χωρίς όμως να επιβεβαιωθεί μία τέτοια συσχέτιση. Η χρόνια κατανάλωση της κυκλοφωσφαμίδης, για την αντιμετώπιση λεμφοβλαστικών διαταραχών και της πολλαπλής σκλήρυνσης, θεωρείται ως προδιαθεσικός παράγοντας για την ανάπτυξη καρκίνου ουροδόχου κύστης. Πρόσφατα, μάλιστα, προτάθηκε ως πιθανή μία συνεργική δράση της λήψης κυκλοφωσφαμίδης και του χρόνιου καθετηριασμού στην ευπάθεια καρκίνου της ουροδόχου κύστης⁴⁸. Η κατάχρηση του αναλγητικού φαινακετίνη έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου της νεφρικής πυέλου. Η συσχέτιση όμως αυτή είναι ασαφής αναφορικά με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης⁴.

Φάρμακα που έχουν ως χημική βάση μία αρωματική αμίνη, όπως η σουλφα-σαλαζίνη που χορηγείται για την αντιμετώπιση της ελκώδους κολίτιδας, έχουν επίσης ενοχοποιηθεί για καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Όμως ο ρόλος των ουσιών αυτών παραμένει υπό διερεύνηση⁵⁰.

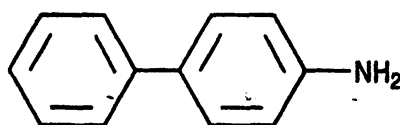
Εικόνα 1 Τα γνωστά ουροθηλιακά καρκινογόνα



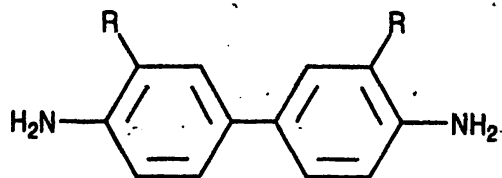
2- ναφθυλαμίνη



βενζιδίνη (4,4'-διαμινοδιφαινύλη).



4-αμινοδιφαινύλη



$R=Cl$ 3,3' Διχλωροβενζιδίνη
 $R=CH_3$ 3,3' Διμεθυλβενζιδίνη
 $R=OCH_3$ 3,3' Διμεθοξυβενζιδίνη

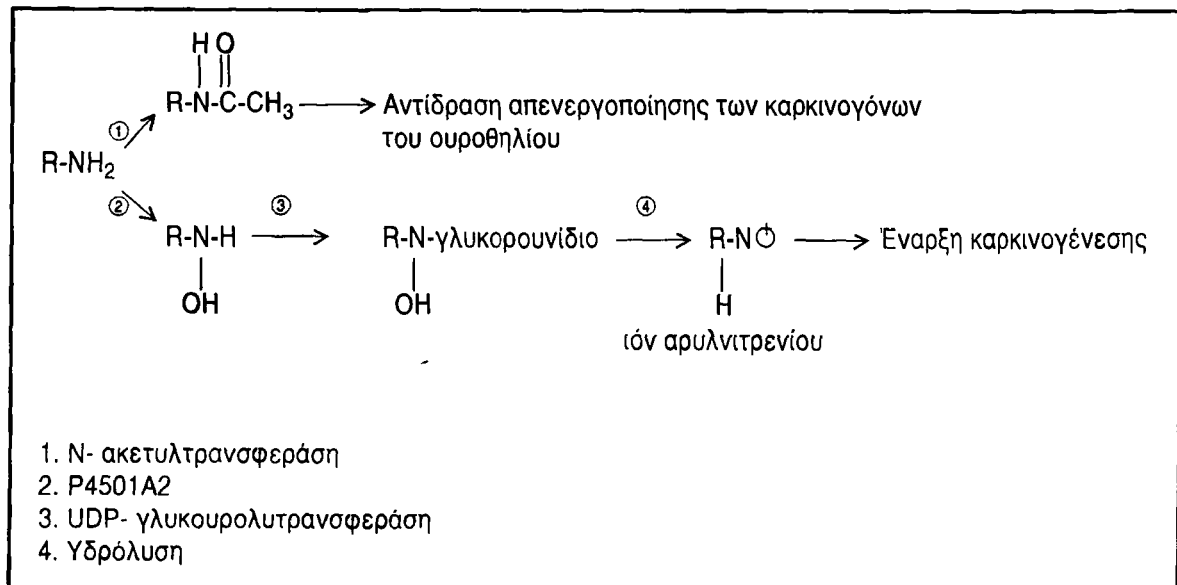


1.3 Μεταβολισμός των καρκινογόνων αρυλαμινών

Όπως για την μεγάλη πλειονότητα των χημικών καρκινογόνων, έτσι και για τις αρυλαμίνες απαιτείται η μεταβολική ενεργοποίησή τους σε ηλεκτρονιόφιλα μόρια με ικανότητα αντίδρασης με ορισμένες καίριες θέσεις της νουκλεοτιδικής αλυσίδας προκειμένου να ασκήσουν την καρκινογόνο δράση τους. Αυτή η αντίδραση ενεργοποίησης θεωρείται το καθοριστικότερο βήμα για την έναρξη (initiation) της διαδικασίας καρκινο-γένεσης³⁰.

Οι μεταβολικές διεργασίες, που εμπλέκονται στη βιομετατροπή των ξеноβιοτικών, και τα ενζυμικά συστήματα, που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές, έχουν περιγραφεί λεπτομερώς και έχουν ταξινομηθεί σε αντιδράσεις (ένζυμα) ενεργοποίησης α_ φάσης και σε αντιδράσεις (ένζυμα) αποτοξίκωσης ή β_ φάσης^{6,51,52,53}. Παρομοίως, η οδός τόσο της μεταβολικής ενεργοποίησης, όσο και της απενεργοποίησης των αρυλαμινών έχει πλέον περιγραφεί με λεπτομέρειες (Εικόνα 2).

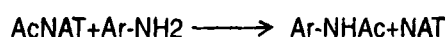
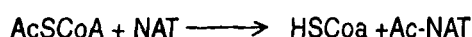
Εικόνα 2. Μεταβολική ενεργοποίηση των αρυλαμινών.



1.3.1 Η N-ακετυλίωση των αρυλαμινών

Η N-ακετυλίωση των αρυλαμινών επιτελείται με τη βοήθεια της N-ακετυλτρασφεράσης (NAT, EC. 2.3.1.5) κυρίως στο ήπαρ και θεωρείται βήμα απενεργοποίησης (αποτοξίκωσης) και εξάλειψης των καρκινογόνων αρυλαμινών, καθώς το τελικό προϊόν της αντίδρασης, δηλαδή η ακετυλιωμένη αρυλαμίνη (Αρυλαμίδιο), είναι εντονώς υδρόφιλη ουσία και, επομένως, εύκολα αποβαλλόμενη από το κύτταρο^{6,54}.

Η αντίδραση εξελίσσεται σύμφωνα με έναν μηχανισμό διπλής αντικατάστασης (διπλού υποστρώματος), στην οποία το ένζυμο ταλαντεύεται μεταξύ ελεύθερων και ακετυλιωμένων μορφών. Λεπτομερείς μελέτες του μηχανισμού έγιναν με κεκαθαμένα ένζυμα από ηπατικό ιστό γρήγορων και αργών ακετυλιωτών, κουνελιών και ανθρώπων, με ακετυλο-συνενζυμο Α και διάφορες αρυλαμίνες και υδραζίνες^{55,56,57,59,60,61}, όπως δείχνεται παρακάτω. Το ένζυμο πρέπει πρώτα να ακετυλιωθεί από το AcSCoA ⁵⁷, προκειμένου κατόπιν να ακετυλιώσει τις αρυλαμίνες- υποστρώματα της αντίδρασης⁶⁰. Η συνολική, επομένως, αντίδραση μπορεί να γραφθεί με συμβατικό τρόπο σαν δύο διαδοχικές αντιδράσεις⁶¹:



1.3.2 Η Ν-υδροξυλίωση ή ενζυματική οξείδωση των αρυλαμινών.

Εφόσον η Ν-ακετυλίωση δεν συμβεί ή συμβεί με αργό ρυθμό, οι αρυλαμίνες εκτρέπονται προς Ν-υδροξυλίωση και τα μεταβολικά προϊόντα αυτού του δρόμου είναι εντόνως καρκινογόνα. Η αντίδραση καταλύεται από τα ένζυμα του ηπατικού κυτοχρώματος (CYP, EC.1.14.14.1) και, κυρίως, το ισοένζυμο P4501A2 προσδίδοντας Ν-υδροξυαρυλαμίνες (αρυλυδροξαμικά οξέα), που θεωρούνται "εγγύς καρκινογόνα" της ουροδόχου κύστης, δηλαδή καρκινογόνα ισχυρότερα από την αρχική ουσία, αλλά όχι ιδιαίτερα αντιδρώντα με κυτταρικά μακρομόρια^{51,62,63,64,65}.

1.3.3 Η γλυκουρονιδίωση.

Τα Ν-υδροξυπαράγωγα υπόκεινται κατόπιν σε σύζευξη (εστεροποίηση) με γλυκουρονικό οξύ. Η αντίδραση αυτή πρόσδεσης του γλυκουρονικού οξέος από το μόριο-δότη του UDP-γλυκουρονικού οξέως (UDPGlcA) στις υδροξυαρυλαμίνες ονομάζεται και γλυκουρονιδίωση και καταλύεται από τις UDP-γλυκουρο-νυλο-τρανσφεράσες (UDP-GT, EC 2.4.1.17)^{66,67}, που βρίσκονται κυρίως στο ήπαρ, ενώ άλλα όργανα όπως ο νεφρός, το έντερο, το δέρμα ή ο εγκέφαλος συνεισφέρουν επίσης, σε διαφορετική έκταση, στη γλυκουρονιδίωση διαφόρων ουσιών^{68,69}. Η αντίδραση οδηγεί στο σχηματισμό υδατοδιαλυτών β-D-γλυκουρονιδίων, (Ν-υδροξυ-Ν-γλυκουρο-νιδίων), τα οποία εκκρίνονται στα ούρα ή στη χολή. Οι εστέρες αυτοί είναι εντόνως μεταλλαξιογόνοι και εύκολα δημιουργούν συσσωματώματα με DNA (DNA adducts) in vitro. Θεωρούνται, επομένως, μαζί με τα ιόντα αρυλνιτρενίου (βλ. παρακάτω) ως τα τελικά καρκινογόνα στο μοντέλο της χημικής καρκινογένεσης στην ουροδόχο κύστη^{70,71}. Η ακετυλίωση, η υδροξυλίωση και η γλυκουρονιδίωση των παραγώγων των αρυλαμινών επιτελούνται στο ήπαρ, ενώ τα προϊόντα των αντιδράσεων εκκρίνονται στα ούρα και τη χολή.

1.3.4 Ο ρόλος των ιόντων αρυλνιτρενίου.

Στο ελαφρά όξινο pH των ούρων, τόσο το γλυκουρονίδιο με την επίδραση της β-γλυκουρονιδάσης, όσο και απευθείας οι Ν-υδροξυαρυλαμίνες, μπορούν να υδρολυθούν και να αποδώσουν ένα εντόνως αντιδρών ηλεκτρονιόφιλο κατιόν, το αρυλνιτρένιο, το οποίο προσδένεται εύκολα στα επιθηλιακά μακρομόρια του αυλού της ουροδόχου κύστης⁵¹.

Με δεδομένη την καρκινογόνο δράση τους στο ουροθήλιο, τα ιόντα αρυλνιτρενίου αποτέλεσαν αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας, που κατέδειξε ότι η καταστροφή του DNA και, συνεπώς, η έναρξη της καρκινογένεσης προκαλείται έπειτα από αντίδραση των ιόντων αυτών με τη θέση 8 (C-8) των βάσεων της γουανίνης^{72,73,74}. Πρόσφατα, μάλιστα, έχει προταθεί ότι όσο πιο όξινο είναι το pH των ούρων, τόσο πιο εύκολος είναι ο σχηματισμός ιόντων αρυλνιτρενίου στα ούρα και τόσο μεγαλύτερος ο κίνδυνος έναρξης της διαδικασίας της καρκινογένεσης από τις αρυλαμίνες στο ουροθήλιο⁷⁵.



2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΑΚΕΤΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΡΥΛΑΜΙΝΩΝ

2.1 Ο Πολυμορφισμός της N-ακετυλοτρανσφεράσης (NAT)

2.1.1. Φαινοτυπικός προσδιορισμός του ακετυλιωτικού πολυμορφισμού.

Οι πρώτες μαρτυρίες, πριν 40 περίπου χρόνια, ότι η δραστηριότητα της NAT στον άνθρωπο είναι πολυμορφική αφορούν μελέτες του μεταβολισμού της ισονιαζίδης (INH) σε ασθενείς με φυματίωση⁷⁶. Ο χαρακτηρισμός, επομένως, ότι η NAT είναι πολυμορφική προέκυψε αρχικά από παρατηρήσεις για τη διαφορετική από άτομο σε άτομο ικανότητα και ρυθμό ακετυλίωσης συγκεκριμένων αρυλαμινών και υδραζινών, οι οποίες είναι γνωστά υποστρώματα της NAT, καθώς, επίσης, και από το γεγονός ότι οι αργοί ακετυλιωτές εμφάνιζαν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης παρενεργειών μετά από λήψη φαρμάκων με βάση την αρυλαμίνη και υδραλαζίνη. Τέτοια σκευάσματα είναι η INH, διάφορες σουλφοναμίδες, φάρμακα όπως η αμινογλουτεθιμίδα, η δαψόνη, η κλωναζεπάμη και η καφεΐνη^{77,78,79}.

Χρησιμοποιώντας in vivo χορήγηση σκευασμάτων-δεικτών (κυρίως την ισονιαζίδη), όπου ως γρήγοροι ακετυλιωτές θεωρήθηκαν όσοι ακετυλίωσαν την INH σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80%, διαπιστώθηκε ότι, μεταξύ ατόμων της ίδιας φυλής, οι ρυθμοί ακετυλίωσης ήταν τέτοιοι, ώστε, ακόμη και με φαινοτυπικές μεθόδους, γινόταν εύκολη διάκριση μεταξύ "αργών" και "γρήγορων" ακετυλιωτών^{80,81,82,83}.

2.1.2 Συσχέτιση του ακετυλιωτικού φαινοτύπου με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

Καθώς η ενζυμική δραστηριότητα της N-ακετυλοτρανσφεράσης περιλάμβανε την αποτοξίκωση των αρυλαμινών που προκαλούν καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ο Lower και συν. το 1979⁸⁴ επιχείρησε να συσχετίσει την ύπαρξη αργού ακετυλιωτικού φαινοτύπου με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου ουροδόχου κύστης. Ακολούθησαν παρόμοιες μελέτες^{85,86} που κατέδειξαν ότι τα ένζυμα αυτά έχουν, πιθανά, ένα σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και αποενεργοποίηση των καρκινογόνων των αρυλαμινών, άλλες όμως μελέτες δεν επιβεβαίωσαν την παρατήρηση αυτή^{87,88}.

Με τη χρήση φαινοτυπικών μεθόδων προσδιορισμού της ακετυλιωτικής ικανότητας σε οικογένειες καταδείχθηκε ότι η ποικιλομορφία στην ικανότητα ακετυλίωσης ρυθμιζόταν γενετικά και ότι οι "αργοί ακετυλιωτές" ήταν πιθανότατα ομόζυγοι για ένα υπολοιπόμενο γονίδιο, ενώ οι "γρήγοροι ακετυλιωτές" ήταν είτε ομόζυγοι ή ετερόζυγοι του φυσιολογικού γονιδίου (wild type). Οι μελέτες όμως του τύπου αυτού εγκαταλείφθηκαν, καθώς διαπιστώθηκε ότι, σε μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού, η χρήση παρόμοιων μεθόδων είναι δυνατό να οδηγήσει σε ψευδή συμπεράσματα. Συγκεκριμένα, ηλικιωμένοι και μικρά παιδιά^{89,90}, ασθενείς με ηπατική νόσο ή με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια⁸⁹ ή με νεφρική ανεπάρκεια⁹¹, όσοι λαμβάνουν βαρβιτουρικά ή όσοι έχουν υποβληθεί πρόσφατα σε γενική νάρκωση δεν μπορούν να συμμετέχουν σε παρόμοιες μελέτες. Επιπρόσθετα, ο προσδιορισμός της ακετυλιωτικής ικανότητας ενός ατόμου με τη χρήση φαινοτυπικών μεθόδων απαιτεί τη διακοπή της λήψης κάθε φαρμακευτικής αγωγής για τουλάχιστον τρεις ημέρες⁸⁹. Τελικά, γινόταν εμφανές ότι οι μέχρι τότε διαθέσιμες μέθοδοι για καθορισμό του ανθρώπινου φαινότυπου ήταν μη πρακτικές στη χρήση τους σε μεγάλη έκταση. Ήδη, επομένως, από τα τέλη της δεκαετίας του 1980 γινόταν επιτακτική η ανάγκη καθορισμού του

ακετυλιωτικού γονότυπου, έτσι ώστε να υπάρξει γρήγορη εξέλιξη στον προσδιορισμό του ρόλου του ακετυλιωτικού πολυμορφισμού σε φαρμακοπροκαλούμενη και αυτόματη ανθρώπινη νόσηση⁶¹.

Ένα σημαντικό βήμα στη μελέτη του ενζυμικού συστήματος της N-ακετυλτρανσφεράσης αποτέλεσαν οι μελέτες απομόνωσης του ενζύμου από ανθρώπινο ηπατικό ιστό. Μερικές αρυλαμίνες, όπως το ρ-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA) και το ρ-αμινοσαλικυλικό οξύ (PAS), ακετυλιώνονταν ευχερώς, τόσο από τους αργούς όσο και από τους γρήγορους ακετυλιωτές, και, επομένως, χαρακτηρίστηκαν ως μονομορφικές, σε αντίθεση με πολυμορφικά υποστρώματα, όπως η ισονιαζίδη, και η σουλφαμεθαζίνη⁹². Ο Jenne⁹³ πραγματοποίησε την πρώτη λεπτομερή βιοχημική μελέτη της ακετυλίωσης φαρμάκων σε ηπατικό ιστό αργών και γρήγορων ακετυλιωτών και κατέδειξε ότι δύο διαφορετικά ένζυμα ήταν υπεύθυνα για το μεταβολισμό των μονομορφικών και πολυμορφικών αρυλαμινών, με το ένα από αυτά να μειώνεται ποσοτικά στα άτομα με "αργό" ακετυλιωτικό φαινότυπο. (NAT; ακετυλο-CoA: αρυλαμινο-N-ακετυλοτρανσφεράση)

2.1.3 Η απομόνωση της N- ακετυλοτρανσφεράσης.

Μεγάλη πρόοδος στην απομόνωση της ανθρώπινης ηπατικής ακετυλ-τρανσφεράσης, που μπορεί να ακετυλιώνει τη σουλφαμεθαζίνη, και στην ανάπτυξη πολυκλωνικών αντισωμάτων, που αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη αυτή, επιτεύχθηκε το 1989.⁹⁴ Σε βιοψίες ήπατος ασθενών, που είχαν χαρακτηριστεί φαινοτυπικά με τη δοκιμασία της καφεΐνης, η αργή ακετυλίωση σχετίστηκε με σημαντική μείωση, σε ποσά όμως ανιχνεύσιμα, της ανοσοαντιδρούσας NAT πρωτεΐνης⁹⁵, γεγονός που ενίσχυσε την αρχική υπόθεση του Jenne⁹³. Περαιτέρω μελέτες⁹² έδειξαν ότι μία πρώιμη ασταθής κορυφή της δραστηριότητας του NAT στη χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων με μικρή συγγένεια στη σουλφαμεθαζίνη, αλλά με υψηλή συγγένεια στα μονομορφικά υποστρώματα PABA και PAS, είχε περάσει απαρατήρητη. Η δραστηριότητα αυτή αντιστοιχεί σε αυτό που τώρα αναγνωρίζουμε ως το διαφορετικό, αλλά συγγενές ένζυμο NAT1, ενώ η αρχικά απομονωθείσα πρωτεΐνη⁹⁴ αντιστοιχεί στο πολυμορφικό NAT (NAT2). Συνεκτιμώντας τις μέχρι τότε παρατηρήσεις, γινόταν εμφανές ότι η δραστηριότητα της αρυλαμινο-N-ακετυλο-τρανσφεράσης στο ανθρώπινο ηπατικό κύτταρο σχετιζόταν με την παρουσία δύο πρωτεϊνών με πολλή όμοια, αλλά ευδιακρίτως διαφορετική δομή, παρόμοια μοριακά βάρη (31KD), και διαφορετικές λειτουργικές ιδιότητες.

2.1.4 Η Γενετική ανάλυση της N- ακετυλτρανσφεράσης.

Ενώ όμως οι κλινικές και βιολογικές συνέπειες του ανθρώπινου ακετυλιωτικού πολυμορφισμού είχαν, ως το 1989, μελετηθεί με εκτεταμένη λεπτομέρεια, υπήρχαν μόνο περιορισμένα στοιχεία αναφορικά με τη μοριακή και γενετική βάση του ενζύμου. Έγινε, τότε, κατανοητό ότι η λεπτομερής κατανόηση των μηχανισμών, επί των οποίων βασίζεται η πολυμορφική ακετυλίωση φαρμάκων και ξеноβιοτικών στον άνθρωπο, έγκειται σε μεγάλο βαθμό στην προέκταση των αποτελεσμάτων μοντέλων πειραματοζώων⁶¹.

Τα NZW- κουνέλια που είναι γρήγοροι ακετυλιωτές, η πρωτεΐνη NAT και το mRNA μπορούν να βρεθούν σε αφθονία. Η διαπίστωση αυτή επέτρεψε στον Andres και συνεργάτες⁹⁶ να απομονώσει και να παρασκευάσει στην καθαρή μορφή του το ένζυμο NAT. Οι πληροφορίες της αλληλουχίας των αμινοξέων του ενζύμου αυτού χρη-

σιμοποιήθηκαν από τον Blum και συνεργάτες⁹⁷, ώστε να συνθέσουν ένα ολιγονουκλεοτιδικό ανιχνευτή και, σε συνδυασμό με αντισώματα που παρασκευάστηκαν για την ανίχνευση του καθαρού NAT κουνελιού, τελικά να κλωνοποιήσουν ένα cDNA κουνελιού, το οποίο κωδικοποιούσε ένα ένζυμο με μεγάλη εξειδικευμένη δράση στην ακετυλίωση της σουλφαμεθαζίνης. Περαιτέρω ανοσοϊστοχημικές μελέτες κατέδειξαν πλήρη απουσία της πρωτεΐνης αυτής σε κουνέλια που ήταν αργοί ακετυλιωτές, σε αντίθεση με τη μερική μείωση της πρωτεΐνης NAT2 σε ηπατικό ιστό των ανθρώπων που ήταν αργοί ακετυλιωτές. Ετσι, η απουσία της πρωτεΐνης NAT στα κουνέλια που ήταν αργοί ακετυλιωτές αποδόθηκε σε ένα γονιδιακό έλλειμμα⁹⁷.

Η δυνατότητα που προσέφερε ο κλώνος DNA του κουνελιού οδήγησε στην απομόνωση ενός ανθρώπινου γενωμικού κλώνου⁹⁸, ως ένα πρώτο βήμα στην κατανόηση του ανθρώπινου πολυμορφισμού και των πολλαπλών επιπτώσεων αυτού στη φαρμακευτική θεραπεία και στην τοξικότητα απο ξενοβιοτικά.

2.1.4.1 Τα γονίδια NAT1 και NAT2.

Τα ανθρώπινα γονίδια των ακετυλτρανσφερασών κλωνοποιήθηκαν από τον Blum⁹⁹, που χρησιμοποίησε το cDNA του κουνελιού από γενομικό DNA ενός ετερόζυγου γρήγορου ακετυλιωτή. Οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι καθόριζαν τρία διαφορετικά, αλλά στενά σχετιζόμενα ανθρώπινα NAT γονίδια: NAT1, NAT2 και το ψευδογονίδιο NATP. Σύμφωνα με μία πρόσφατη προταθείσα ονοματολογία, το NAT1 αντιστοιχεί στο NAT1*3, και το NAT2 αντιστοιχεί στο NAT2*4¹⁰⁰. Το παράγωγο του NAT2 (NAT2*4) γονιδίου εκφράσθηκε σε κύτταρα νεφρών πιθήκου, έτσι ώστε να παραχθεί μια πρωτεΐνη με ανοσοαντίδραση και κινητικές ιδιότητες όμοιες με αυτές του ανθρώπινου NAT2 (NAT2*4)^{92,95,99}, του οποίου η ποσότητα στο ανθρώπινο ήπαρ ποικίλλει με τον ακετυλιωτικό φαινότυπο. Οι μελέτες αυτές καθιέρωσαν τη γονιδιακή θέση NAT2 ως τη θέση του κλασσικού ανθρώπινου ακετυλιωτικού πολυμορφισμού. Το γονίδιο NAT1 (NAT1*3) παράγει σε μία NAT πρωτεΐνη με διαφορετικές ηλεκτροφορητικές και κινητικές ιδιότητες. Η πρωτεΐνη αυτή αντιστοιχεί στο μονομορφικό ένζυμο NAT1 (NAT1*3), με υψηλή συγγένεια για υποστρώματα όπως το PA-BA και το PAS⁹².

Καθένα από τα δύο ανθρώπινα αυτοσωματικά αλληλόμορφα, τα οποία συμβολίσθηκαν NAT1= AAC-1= mNAT (μονομορφικό) και NAT2 = AAC-2= pNAT (πολυμορφικό), ίδιου μεγέθους με το NAT-1, κλωνοποιήθηκαν. Και τα δύο γονίδια βρέθηκε ότι έχουν ένα εξώνιο χωρίς ιντρόνια με ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 870 ζευγών βάσεων, που εκφράζει μία πρωτεΐνη 290 αμινοξέων (33-34KD). Αμφότερα, επομένως, τα γονίδια είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση δύο πρωτεϊνών NAT (λειτουργικά ακετυλιωτικά ισοένζυμα). Ενώ όμως το γονίδιο NAT1 μεταγράφεται από ένα μόνο εξώνιο, το NAT2 mRNA προέρχεται από δύο εξώνια, εκ των οποίων το δεύτερο, το οποίο απέχει 8Kb από το σημείο έναρξης της μετάφρασης, αποτελείται από 100 ζεύγη βάσεων και δεν μεταφράζεται σε πρωτεΐνη^{99,101}. Η νουκλεοτιδική ομολογία μεταξύ του NAT1 και του NAT2 είναι 87% στην κωδικοποιούσα περιοχή. Μεταξύ NAT1 και NAT2 υπάρχει διαφορά μόνο 55 αμινοξέων, εκ των οποίων μόνο 28 αποτελούν μη εξελικτικά διατηρημένες περιοχές, ενώ η ομολογία των ανθρώπινων ισοενζύμων NAT1 και NAT2 με τα αντίστοιχα του κουνελιού ανέρχεται στο 82%.⁹⁹ Το ψευδογονίδιο NATP έχει υψηλή ομολογία με το NAT1 και το NAT2, σε ποσοστό 79%, αλλά περιέχει πολλαπλές μετατοπίσεις του αναγνωστικού πλαισίου (frameshifts) και κωδικόνια στάσης. Τα γονίδια NAT1 και NAT2 βρίσκονται στο χρωμόσωμα 8, στην περιοχή 8p21.3-23.1¹⁰².

Νουκλεοτιδική αλληλουχία του NAT2 γονιδίου⁹⁸.

GAATTCAGTGCTCTCCCTGTGCACCCACTAACCCCTCTTTTTGTTTTTCACCAGGC
 ACTTACCACAATCTAATCTAACAGACTGCATGTTTTATCC 90.
 ATTTATTCAGTTTCCTATTTGTGTCCCTTCAACTCCCATTAATAATATTTTTG
 AGGGCAAGCAAGTACTAGAACAAATAGGAAACAC 180.
 ATCAAGAGTAGTCTGTAAACTATTTCTTGAATCAATCAGTGAATGAATGAATTCA
 ATATATTTTTTGAGTGAGGAGCTTTGTGTTAG 270.
 GTACAGCTAAACGGGAAATCAAGTGGGTCATGTACCATGAATACCATATACTCT
 ACTGTATAATTCTCCTTCTTATATCAGAACTGTTT 360.
 ATAAGCCTATTATAATTGATACCAATTGGAATCTCTTTTTTACTCATCACCAAGA
 ACACCACAAACAAGTTGTTTACCATTGGCTCCTT 450,
 ATTTAATCTGGATTTCCAACCTCATGCCCTGGACCAAATCAGTACAATAATAC
 TTTCCTTACAGGGTTCTGAGACTACTAAGACAAC 540.
 TATGCATGTAAAAGGGATTCATGCAGTAGAAATAAATGCGAACTTGGAGGTATG
 ACAGATACTTATAACCATTTGTGTTTTTACGTATTTA 630.
 AATACGTTATACCTATAATTAGTCACACACGAGGAAATCAAATGCTAAAGTATG
 ATATGTTTTTATGTTTTGTTTTTCTTGCTTAGGGGAT 720.
 CATGGACATTGAAGCATATTTTGAAAGAATTGGCTATAAGAAGCTCTAGGA
 ACAAATTGGACTTGGAAACATTAAGTACATTATTGAGCA 810.
 CCAGATCCGGGCTGTTCCCTTTGAGAACCTTAACATGCATTGTGGGGATCCCTTA
 CTATTGGGCTTAGAGGCTATTTTTGATCACATTGT 900.
 AAGAAGAAACCGGGGTGGGTGGTGTCTCCAGGTCAATCAACTTCTGTAC
 TGGGCTCTGACCACAATCGGTTTTTCAGACCACAATGTTAGG 990.
 AGGGTATTTTTACATCCCTCCAGTTAACAAATACAGCACTGGCATGGTTC
 ACCTTCTCCTGCAGGTGACCATTGACGGCAGGAATTACAT 1080.
 TGTCGATGCTGGGTCTGGAAGCTCCTCCCAGATGTGGCAGCCTCTAGA
 ATTAATTTCTGGGAAGGATCAGCCTCAGGTGCCTTGCATTTT 1170.
 CTGCTTGACAGAAGAGAGAGGAATCTGGTACCTGGACCAAATCAGGAG
 AGAGCAGTATATTACAAACAAAGAATTTCTTAATTCTCTCATCT 1260.
 CCTGCCAAAGAAGAAACACCAAAAAATATACTTATTTACGCTTGAACCTC
 GAACAATTGAAGATTTTGAGTCTATGAATACATACCTGCA 1350
 GACGTCTCCAACATCTTCATTTATAACCACATCATTTTGTTTCCTTGCAGA
 CCCCAGAAGGGGTTTACTGTTTGGTGGGCTTCATCCTCAC 1440.
 CTATAGAAAATTCAATTATAAAGACAATACAGATCTGGTCGAGTTTAAAA
 CTCTCACTGAGGAAGAGGTTGAAGAAGTGCTGAAAAATAT 1530.
 ATTTAAGAATTTCTTGGGGAGAAATCTCGTGCCCAAACCTGGTGATGG
 ATCCCTTACTATTTAGAAATAAGGAACAAAATAAACCTTGTG 1620.
 TATGTATACCCAACTCACTATTATCAACTTATGTGCTATCAGATATCCTCTCTAC
 CCTCACGTTATTTTGAAGAAAATCCTAAACATC 1710.
 AAATACTTTCATCCATAAAAATGTCAGCATTTATTAATAAAACAATAACTTTTTAA
 AGAAACATAAGGACACATTTTCAAATTAATAAAAA 1800.
 TAAAGGCATTTTAAGGATGGCCTGTGATTATCTTGGGAAGCAGAGTGATTCATGC
 TAGAAAACATTTAATATTGATTTATTGTTGAATTC 1890.



2.1.4.2. Υποστρώματα των ισοενζύμων της N- ακετυλτρανσφεράσης.

Η ανακάλυψη δύο διαφορετικών γονιδίων, που κωδικοποιούν τα NAT1 και NAT2, έλυσε το παλιό ερώτημα των μονομορφικών και πολυμορφικών υποστρωμάτων⁹². Αν και τα προϊόντα αμφοτέρων των γονιδίων είναι ικανά να καταλύουν την N-ακετυλίωση των καρκινογόνων αρυλαμινών, όπως η 2-αμινοφλουορένη, η 4-αμινοδιφαινύλη και η βενζιδίνη, και φαρμάκων με βάση την αρυλαμίνη και την υδραζίνη (σουλφομεθοξαζόλη, ανισιδίνη)¹⁰³, έχουν επίσης και ξέχωρη, εξειδικευμένη δράση. Έτσι, μόνο το NAT1 μεταβολίζει το π-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA) και το π-αμινοσαλικυλικό οξύ (PAS)^{102,104,105}. Αμφότερα τα ισοένζυμα ακετυλιώνουν τα N-υδροξυπαράγωγα των αρυλαμινών αυτών. Επίσης, η NAT-2 (πολυμορφική) συμμετέχει, σε αντίθεση με τη μονομορφική NAT, στη N-ακετυλίωση και των ετεροκυκλικών αμινών^{100,106,107}, ενώ η διαφορετική εξειδίκευση του υποστρώματος μεταξύ του NAT1 και του NAT2 φαίνεται πως σχετίζεται με διαφορές στα τελικά τμήματα των ενζυμικών αλυσίδων¹⁰⁸. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η λειτουργία του NAT1 μπορεί επίσης να παρουσιάζει γενετική ποικιλομορφία (βλ. παρακάτω).

2.1.4.3 Εκφραση των γονιδίων της N-ακετυλτρανσφεράσης στον άνθρωπο.

Αμφότερα τα ένζυμα εκφράζονται στο ανθρώπινο ήπαρ, όπου όμως φαίνεται ότι κυριαρχεί πιθανότατα το NAT-2^{109,110,111}. Αντίθετα, στα κύτταρα του περιφερικού αίματος φαίνεται πως κυρίως εκφράζεται το μονομορφικό NAT-1^{112,113,114}. Τα κύτταρα του ουροθηλίου περιέχουν τόσο NAT-1 όσο και NAT-2 σύμφωνα με μία μελέτη, τα αποτελέσματα της οποίας έδειξαν ότι η ευπάθεια στον προκαλούμενο από αρυλαμίνες καρκίνο της ουροδόχου κύστης μπορεί να επηρεαστεί τόσο από το ηπατικό όσο και από το κυστικό NAT¹¹⁵.

2.1.4.4 Η Γενετική ποικιλομορφία του NAT2.

Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ο αργός ακετυλιωτικός φαινότυπος σχετίζεται με μείωση 10 με 20% της ποσότητας του NAT2 στο ηπατικό κύτταρο⁹⁵, ενώ το περιεχόμενο του mRNA παραμένει αναλλοίωτο¹¹⁶. Ο κληρονομούμενος υπολειπόμενος ακετυλιωτικός φαινότυπος θεωρείται πλέον προϊόν έκφρασης συγκεκριμένων αλληλομόρφων "μειωμένης λειτουργικότητας", οι οποίοι, με άλλα λόγια, προκαλούν την προαναφερθείσα μείωση στην πρωτεΐνη NAT2^{100,116,117,118,119,120}.

Αλληλόμορφοι μειωμένης λειτουργίας. Η ακριβής φύση των ελλειμμάτων του γονιδίου NAT2, που προκαλεί αργή ακετυλίωση σε ανθρώπινους πληθυσμούς, αποτελεί ως σήμερα αντικείμενο μείζονος σημασίας στη φαρμακογενετική. Αρχικά, η προσοχή των ερευνητών εστιάστηκε στην ανίχνευση μεταλλαγμένων αλληλομόρφων, που περιέχουν διακριτές υποκαταστάσεις νουκλεοτιδίων, τα οποία αλλάζουν την ικανότητα της μεταγραφής και της μετάφρασης mRNA ή την ενζυμική σταθερότητα. Ο στόχος αυτός επιτεύχθηκε μετά από τη λήψη γενομικού DNA από το περιφερικό αίμα υγιών ατόμων, των οποίων ο ακετυλιωτικός φαινότυπος είχε προσδιορισθεί με τη δοκιμασία της καφεΐνης¹¹⁶, ή της ισονιαζίδης¹²¹ και την απομόνωση DNA από ηπατικό ιστό ανθρώπων με γνωστή NAT2 ενζυμική δραστηριότητα^{116,121}. Χρησιμοποιώντας ένα σύνδυασμό της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές, συγκεκριμένα για την πολυμορφική NAT, ακολουθούμενη από ανάλυση με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων, ανιχνεύθηκε η ύπαρξη τριών με-

ταλλαγμένων αλληλόμορφων της πολυμορφικής αρυλαμινο-N-ακετυλοτρανσφεράσης ως υπεύθυνων της αργής ακετυλίωσης^{116,121}, που αρχικά ονομάσθηκαν M1, M2 και M3¹¹⁶. Οι ανευρεθείσες ποικιλίες της πολυμορφικής N-ακετυλοτρανσφεράσης διαφέρουν σε συγκεκριμένες σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες τροποποιούν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων. Ο γονότυπος των ήδη μελετηθέντων πληθυσμών ήταν άμεσα συγκρίσιμος με τον ακετυλίωτικό φαινότυπο, που είχε προκαθορισθεί.

Προκειμένου να διερευνηθεί ο μοριακός μηχανισμός της αργής ακετυλίωσης, τα μεταλλαγμένα γονίδια NAT2, δηλαδή τα υπεύθυνα της αργής ακετυλίωσης, κλωνοποιήθηκαν και η γονιδιακή αλληλουχία τους καθορίσθηκε και συγκρίθηκε με τη αλληλουχία του βασικού, μη μεταλλαγμένου αλληλόμορφου^{116,117}. Το αλληλόμορφο M1 είχε μεταλλάξεις στις θέσεις 341 και 481 (Πίνακες 1 και 2), το M2 στις θέσεις 282 και 590 και το M3 στη θέση 857¹¹⁷. Σύμφωνα με μία πρόσφατη ονοματολογία¹⁰⁰, το M1 αντιστοιχεί στο NAT2*5A, το M2 στο NAT2*6A, και το M3 στο NAT2*7A^{100,117}. Πιο πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν τώρα την ύπαρξη δύο μεταλλάξεων στα περισσότερα, αν όχι σε όλα τα αλληλόμορφα NAT*7, μία στη θέση 857 και την άλλη στη θέση 282¹¹⁸. Τα στοιχεία αυτά επιβεβαιώθηκαν και επεκτάθηκαν από τους Vatsis¹²² και Hickman¹¹⁹, οι οποίοι μελέτησαν περαιτέρω την αλληλουχία του ενζύμου, όπως αυτό απομονώθηκε από ηπατικούς ιστούς και λεμφοκύτταρα αργών ακετυλιωτών, χρησιμοποιώντας τις πληρο-φορίες της αλληλουχίας του Blum⁹⁹.

Ο Vatsis¹²² παρατήρησε ένα αλληλόμορφο με μεταλλάξεις στις θέσεις 341, 481 και 803 (NAT2*5B), ενώ άλλες μελέτες έδειξαν ότι το αλληλόμορφο αυτό υπάρχει τόσο σε μεγάλο ποσοστό των Καυκάσιων, όσο και στους Ιάπωνες, αλλά σε πολύ μικρότερη συχνότητα (1%)¹¹¹. Πιθανότατα, η φυλετική διαφορά στη συχνότητα των αργών ακετυλιωτών μεταξύ των Ιαπώνων (10%) και των Καυκασίων (50-70%) οφείλεται κυρίως στη μεγάλη διαφορά συχνότητας του αλληλόμορφου NAT2*5B¹¹¹. Οι μελέτες Ιαπώνων ερευνητών στο θέμα κατέδειξαν μάλιστα την ύπαρξη του αλληλόμορφου NAT2*6A σε 78% και του αλληλομόρφου NAT2*7B σε 21% των Ιαπώνων^{101,117,121}.

Ο Hickman και οι συνεργάτες του¹¹⁹ διαπίστωσαν την ύπαρξη ενός άλλου αλληλομόρφου με μεταλλάξεις στις θέσεις 341 και 803 (NAT2*5C). Επιπρόσθετα, ο Bell¹²⁰ περιέγραψε μία μετάλλαξη στη θέση 191, η οποία συμβαίνει σχεδόν αποκλειστικά στους Αφρικανούς. Οι μεταλλάξεις του NAT2 και οι λειτουργικές επιπτώσεις τους αναφέρονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Μεταλλάξεις του γονιδίου NAT 2

Μετάλλαξη	Υποκατάσταση Αμινοξέως	Δραστηριότητα της NAT		Αναφορές
		in vivo	in vitro	
G191A	R64Q	Μειωμένη	Μειωμένη	120
C282T	Silent (Y94)	Μειωμένη	Φυσιολογική	123, 116, 118, 124
T341C	I 114T*	Μειωμένη	Μειωμένη	123, 124
C481T	Silent (L161)	Άγνωστη	Φυσιολογική	116, 125
G590A	R197Q**	Άγνωστη	Μειωμένη	116, 124
A803G	K268R	Φυσιολογική	Φυσιολογική	125, 124
G857A	G286E	Άγνωστη	Αμφίβολη	118, 124

Από τις επτά σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες συνίστανται σε υποκαταστάσεις νουκλεοτιδίων στις θέσεις 191,282,341,481,590,803 και 857 της κωδικοποιούσας περιοχής, οι πέντε προκαλούν αλλαγές στην αλληλουχία των αμινοξέων ενώ οι δύο είναι σιωπηλές. Τρεις μεταλλάξεις (G191A, C282T, και T341C), όταν είναι παρούσες σε αμφότερα τα αλληλόμορφα (ομοζυγωτία), προκαλούν εμφανώς τον αργό ακετυλιωτικό φαινότυπο *in vivo*^{120,123}, ενώ οι ομοζυγώτες που φέρουν μία μετάλλαξη A803G είναι γρήγοροι ακετυλιωτές¹²⁶.

Γίνεται επομένως εμφανές ότι η AAC-2 θέση είναι πολυαλληλομορφική, με τουλάχιστον 10 αλληλόμορφα τα οποία διαφέρουν σε ένα συνδυασμό μέχρι τριών σημειακών μεταλλάξεων εντός της κωδικοποιητικής περιοχής. Δύο από τα αλληλόμορφα παρέχουν το γρήγορο ακετυλιωτικό φαινότυπο, ενώ τα άλλα αλληλόμορφα σχετίζονται με την αργή ακετυλίωση.

Τα συνήθη αργά ακετυλιωτικά αλληλόμορφα φέρουν πολλαπλές μεταλλάξεις, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2. Τα αλληλόμορφα NAT2*5 A, B, C παρουσιάζουν ως κοινή μετάλλαξη τη T341C, ενώ τα NAT2* 6A, *7B, και *13 παρουσιάζουν ως κοινή τη μετάλλαξη C282T. Όλα τα προαναφερθέντα αλληλόμορφα συνιστούν περισσότερο από 99% των μεταλλακτικών αλληλομόρφων στους Λευκούς αργούς ακετυλιωτές^{123,127,128}. Πρόσθετα, σπάνια, αλληλόμορφα είναι τα NAT2* 12A και τα εξαιρετικά σπάνια NAT2* 5D, *5E, *12B, *12C, *14B, *14C, *14D, και *14E^{123,126,127,128,129}.

Η γνώση πρακτικά όλων των μεταλλάξεων του NAT2, που συμβαίνουν σε συχνότητες μεγαλύτερες του 0.1%, και οι πληροφορίες αναφορικά με την *in vivo* συσχέτιση τους με τον αργό ακετυλιωτικό φαινότυπο οδήγησαν στην ανάπτυξη γονοτυπικών δοκιμασιών (tests) υψηλής ακρίβειας, που περιλαμβάνουν ειδική ενίσχυση αλληλομόρφου (ARMS) με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ή ανάλυση με χρήση περιοριστικών ενζύμων, ή, στην ιδανική περίπτωση, συνδυασμό των άνωθι μεθόδων^{122,125,126,127,128,130}.



Πίνακας 2. Συνήθη NAT2 αλληλομόρφοφα και οι συχνότητες τους στους Καυκάσιους (100,120,122,123,125)

Μεταλλάξεις	Κωδικοί αλληλομόρφων	Φαινότυπος	Συχνότητα στους Λευκούς(%)
None	NAT2*4 (wild-type)	Γρήγορος	23
T341C, C481T, A803G	NAT2*5B (r ₃ , Sla)	Αργός	40
C282T, G590A	NAT2*6A (M2)	Αργός	25
T341C, C481T	NAT2*5A (M1)	Αργός	3
T341C, A803G	NAT2*5C (Slc)	Αργός	3
C282T, G857A	NAT2*7B (M3)	Αργός	1
C282T	NAT2*13 (S4)	Αργός	1,5
G590A	NAT2*6B (R2)	Άγνωστος	0,5
G191A	NAT2*14A (M4)	Αργός	0,5
A803G	NAT*12A	Γρήγορος	0,5-1

2.1.4.5 Λειτουργική ταξινόμηση των μεταλλακτικών αλληλομόρφων.

Δεν είναι ακόμη απολύτως σαφής ο μηχανισμός μέσω του οποίου οι προαναφερθείσες μεταλλάξεις προκαλούν μειωμένη ποσότητα της πρωτεΐνης NAT2 στο ήπαρ των αργών ακετυλιωτών. Πρώιμες μελέτες σε ηπατικό ιστό¹¹⁶ έδειξαν ότι οι γονότυποι NAT2 *5A/ *5A και *6A/*6A παράγουν φυσιολογικά ποσά NAT2 mRNA στο ήπαρ, ενώ η ποσότητα της NAT2 ανοσοαντιδρώσας πρωτεΐνης ήταν σημαντικά μειωμένη ή απύσχα. Κανένας από τους αλληλομόρφους αυτούς δεν φαίνεται να προκαλεί πλήρη απουσία της πρωτεΐνης NAT2 στο ήπαρ.⁹⁵ Η έκφραση του μη μεταλλαγμένου τύπου του ενζύμου (wild-type) σε κύτταρα νεφρού πιθήκου¹¹⁶, παρολαυτά, κατέληξε σε αντιφατικά αποτελέσματα. Έτσι, στη μελέτη του Blum¹¹⁶, αμφότερες οι μεταλλάξεις *5A ήταν απαραίτητες, ενώ, αντίθετα, στη μελέτη του Abe¹³¹, η μετάλλαξη T341C, μόνη της, μείωσε το ποσό της ενζυμικής πρωτεΐνης. Η μετάλλαξη G590A, που προκαλεί Arg197Glu στον αλληλόμορφο NAT2*6A, και η μετάλλαξη G857A, που προκαλεί Glu286Glu στον NAT2*7B, προκάλεσαν εμφανή μείωση της ενζυμικής σταθερότητας^{116,132}. Περαιτέρω μελέτες του Hein με ανασυνδυασμένες NAT2 αλληλομορφές ποικιλομορφίες, που εκφράστηκαν σε *E. coli*, έδωσαν πρόσθετες *in vitro* πληροφορίες. Τα εκφρασθέντα προϊόντα των NAT2*5A, *5B και *5C παρουσίασαν μικρότερη δραστηριότητα από τα *6A και *7B, ενώ το *13 (C282T) είχε φυσιολογική δραστηριότητα. Παρομοίως, η *in vitro* έκφραση σε συστήματα κυττάρων θηλαστικών κατέδειξε φυσιολογική δραστηριότητα του εκφρασθέντος ανασυνδυασμένου NAT2 με C282T^{116,118,132}. Αυτά τα *in vitro* αποτελέσματα βρίσκονται σε αντίθεση με πρόσφατα *in vivo* δεδομένα από συγκρίσεις του ρυθμού μεταβολισμού της καφεΐνης με τους γονότυπους¹²³. Το αλληλόμορφο NAT2*13 αποτελεί ένα σαφώς αργό ακετυλιωτικό αλληλόμορφο σε ομοζυγώτες φορείς, και το *5B παρουσίαζε μία εμφανώς μεγαλύτερη δραστηριότητα από το *6A. Επομένως, η ετερόλογη έκφραση των αλληλομόρφων NAT2 σε *E. coli* ή σε κύτταρα νεφρού πιθήκου δεν αντικατοπτρίζει την επίδραση των μεταλλάξεων στη σταθερότητα ή στη χημική συγγένεια προς διάφορα υποστρώματα του ενζύμου στο ανθρώπινο ήπαρ. (Πίνακας 1).

Αλληλόμορφα του NAT1. Πρόσφατες μελέτες του Cribb¹³³, του Ward¹³⁴ και των Vatsis και Weber¹³⁵ έχουν δείξει ότι και η λειτουργία του NAT1 ποικίλλει ευρέως στους ανθρώπους. Στην ίδια κατεύθυνση, η ακετυλίωση του PAS (από την αναλογία των μεταβολιτών του στα ούρα) σε 130 άτομα παρουσίαζε ποικιλία και υποδείκνυε μία δικόρυφη κατανομή¹³⁶. Στη μελέτη του Ward¹³⁴, η σύγκριση των αλληλουχιών των γονιδίων NAT1 σε μία οικογένεια 13 ατόμων έδειξε δύο ποικιλίες: τον αλληλόμορφο V2 (NAT1*10), με δύο μεταλλάξεις στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR), και τον αλληλόμορφο V3 (NAT1*11), με πέντε σημειακές μεταλλάξεις και ένα έλλειμμα στην 3' UTR. Διαφορές στην αλληλουχία παρατηρήθηκαν, επίσης, μεταξύ του βασικού (V1) αλληλομόρφου και μίας προηγούμενης δημοσιευθείσας αλληλουχίας NAT1 ενός Ιάπωνα¹¹⁷. Η λειτουργική σημασία αυτών των ποικιλομορφιών του NAT1 δεν έχει εξακριβωθεί. Επομένως, παραμένει άγνωστο το κατά πόσο οι περιγραφόμενες ποικιλίες είναι υπεύθυνες για τις εμφανείς διαφορές κατάλυσης, που παρατηρούνται σε συγκεκριμένα NAT1 υποστρώματα. Τα ευρήματα αυτά, αν και ασαφή, θέτουν τον όρο "μονομορφικό" για το NAT1 υπό αμφισβήτηση. Με άλλα λόγια, αν και το NAT-1 έχει πάψει να θεωρείται μονομορφικό, ο πολυμορφισμός του γονιδίου NAT1 έχει μικρή ως καθόλου επίδραση στην ενζυμική έκφραση του NAT¹³⁷.

Με δεδομένα τα άνωθεν ευρήματα και το γεγονός ότι το γονίδιο NAT-2 είναι αντισωματικό υπολειπόμενο καταδείχθηκε ότι οι πιθανοί γονότυποι ή αλλιώς οι πιθανοί συνδυασμοί αλληλομόρφων της NAT καθορίζουν και τον πιθανό ακετυλιωτικό

φαινότυπο ανάλογα με την ομοζυγωτία στο wt (= γρήγοροι ακετυλιωτές), την ετεροζυγωτία wt/ οποιοδήποτε μεταλλακτικό αλληλόμορφο (= μέσοι ακετυλιωτές) και την ομοζυγωτία σε δύο μεταλλακτικά αλληλόμορφα (=αργοί ακετυλιωτές).

2.1.4.6 Γενετική Επιδημιολογία του ακετυλιωτικού πολυμορφισμού.

Η συχνότητα του αργού ακετυλιωτικού φαινότυπου ποικίλλει ευρέως μεταξύ των διαφόρων φυλών¹²⁸. Γονοτυπικά στοιχεία των συνηθισμένων NAT2 αλληλομόρφων μας επιτρέπουν πλέον να χαρτογραφήσουμε τη Μοριακή ιστορία του ακετυλιωτικού πολυμορφισμού^{120,121,127,128,138,139}. Δύο ομάδες μπορούν να διαφοροποιηθούν από τη συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων T341C/ C481T και G857A. Οι Λευκοί και οι Αφρικανοί είναι πολύ παρόμοιοι και έχουν υψηλές συχνότητες του T341C/ C481T (>28%) και χαμηλές συχνότητες της μετάλλαξης G857A (<5%). Οι Ιάπωνες, οι Κορεάτες και άλλοι ασιατικοί πληθυσμοί παρουσιάζουν χαμηλή συχνότητα των μεταλλάξεων T341C/ C481T (<7%) και υψηλότερη συχνότητα της G857A μετάλλαξης (10-18%). Η διαφορά στην επίπτωση του αργού ακετυλιωτικού φαινότυπου μεταξύ των Λευκών και Αφρικανών από τη μία (40-70%) και των Ασιατικών πληθυσμών (10-30%) από την άλλη^{108,121} είναι αποτέλεσμα της χαμηλής συχνότητας του T341C/ C481T αλληλομόρφου (NAT2*5A, B, C) στους Ασιάτες^{140,141,142,143}. Οι Ινδιάνοι της Αμερικής και οι Εσκιμώοι του Καναδά φαίνεται πως είναι παρόμοιοι με τους Ασιατικούς πληθυσμούς, αναφορικά με την υψηλή αναλογία των γρήγορων ακετυλιωτών και της σχέσης T341C/ C481T προς G857A, εύρημα που αποδίδεται στην κοινή Μογγολοειδή προέλευση των πληθυσμών αυτών.^{138,144,145} Επιλεκτικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες ενήργησαν πιθανόν προς την επικράτηση μεταλλάξεων σε ένζυμα μεταβολίζοντα διάφορα φάρμακα μετά την απομάκρυνση (απόκλιση/διάσπαση) μεταξύ των Λευκών και Μογγολικών φυλών πριν 40.000 χρόνια¹⁴⁴. Οι Ισπανοί εκφράζουν μία ενδιαμέση κατάσταση μεταξύ των Λευκών/Αφρικανών και των Ασιατών^{128,129}, ενώ οι υψηλότερες συχνότητες αργών ακετυλιωτών έχουν παρατηρηθεί στους Αιγύπτιους¹⁴⁶ και στους Μαροκινούς¹⁴⁷, σε ποσοστά 80% και 90% αντιστοίχως. Τα υπάρχοντα στοιχεία καταδεικνύουν ότι ο ακετυλιωτικός πολυμορφισμός έχει αρχαία Αφρικανική προέλευση, πριν τη διασπορά των πληθυσμών στον πλανήτη. Η σχεδόν πλήρης απουσία των αλληλομόρφων NAT2* 12 και *14 (A803G και G191A) στους Λευκούς, συγκρινόμενη με την μεγαλύτερη από 8% επίπτωση του G191A στους Αφρικανούς, καταδεικνύει ότι οι μεταλλάξεις αυτές συνέβησαν μετά τη διάσπαση Αφρικανών/μη Αφρικανών που υπολογίζεται ότι έλαβε χώρα πριν 90.000 χρόνια¹²⁹.



3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΕ ΠΑΡΟΜΟΙΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

3.1 Μοριακή Επιδημιολογία

Η Μοριακή Επιδημιολογία συνδυάζει τις μεθόδους της κλασσικής Επιδημιολογίας με τις τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας. Σκοπός της είναι ο ακριβέστερος προσδιορισμός των ατόμων ή των πληθυσμιακών ομάδων, που εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση συγκεκριμένων παθήσεων¹.

Πρόκειται για έναν επιστημονικό κλάδο που βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο στάδιο, θεωρείται όμως ότι στα επόμενα χρόνια θα αναπτυχθεί ιδιαίτερα. Μέχρι στιγμής αφορά κυρίως τη διευκρίνιση ενδιάμεσων σταδίων από την έκθεση σε περιβαλλοντικούς καρκινογόνους παράγοντες μέχρι και την εμφάνιση κακοήθων νεοπλασιών^{1,6,31}.

Ιδιαίτερη σημασία έχει δοθεί στην ταυτοποίηση βιολογικών δεικτών (biomarkers), που υποδεικνύουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, στα πλαίσια της επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων. Η ανακάλυψη τέτοιων δεικτών μπορεί να οδηγήσει μελλοντικά στον εντοπισμό πληθυσμιακών ομάδων ή ατόμων που χρειάζονται ειδικό προληπτικό έλεγχο και προληπτικές παρεμβάσεις^{6,31}.

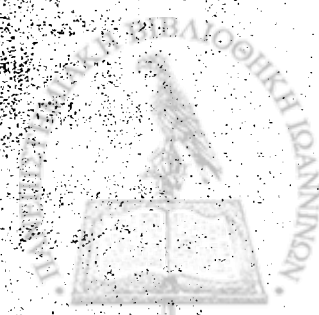
Τα βιολογικά σημεία μπορεί να αφορούν μεταβολές σε γονιδιακό επίπεδο ή και σε κυτταρικό επίπεδο, και είναι δυνατό να σημαίνουν υψηλή έκθεση σε καρκινογόνους παράγοντες ή πιθανή έναρξη καρκινογενετικής διαδικασίας. Σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να υποδεικνύουν αυξημένη ευαισθησία (ή μειωμένη αντίσταση) στην επίδραση εξωτερικών καρκινογόνων παραγόντων^{6,52,128}.

Τέτοια παραδείγματα βιολογικών δεικτών αποτελούν η εμφάνιση συσσωματωμάτων (adducts) πολυκυκλικών υδρογονανθράκων (κλασσικού καρκινογόνου) στο DNA ορισμένων κυττάρων, ή μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια ή ανωμαλίες στην ανάπτυξη ορισμένων κυττάρων.

Η Μοριακή Επιδημιολογία αναζητά, επίσης, κληρονομικούς παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν τη συχνότητα εμφάνισης ορισμένων παθήσεων. Κλασσικό παράδειγμα αποτελεί η πρόσφατη παρατήρηση ότι γυναίκες που γεννιούνται με μεταλλαγμένο γονίδιο BRCA1 έχουν έναν εξαιρετικά υψηλό κίνδυνο (πάνω από 70%) να εμφανίσουν καρκίνο μαστού. Περίπου 5% του συνόλου των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού θεωρείται ότι οφείλεται στην κληρονομική μετάδοση αυτού του μεταλλαγμένου γονιδίου⁶.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η έκθεση στις αρυλαμίνες είναι ένας από καιρό γνωστός παράγων κινδύνου στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης^{2,23}. Όπως καταδεικνύεται από εκτεταμένες επιδημιολογικές μελέτες, οι καπνιστές και συγκεκριμένες επαγγελματικές ομάδες, όπως εργάτες που έρχονται σε επαφή με χρωστικές ουσίες και αγρότες, περιλαμβάνονται μεταξύ αυτών που θεωρούνται ως ομάδες υψηλού κινδύνου για νόσηση από καρκίνο ουροδόχου κύστης^{2,23}.

Η N-ακετυλίωση των αρυλαμινών, αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο N-ακετυλτρανσφεράση, θεωρείται ένα μείζον βήμα αποτοξίκωσης των καρκινογόνων των αρυλαμινών στους ανθρώπους.¹⁴⁸ Η N-ακετυλτρανσφεράση εκφράζεται λειτουργικά από δύο πολυμορφικά ισοένζυμα: το NAT-1 και το NAT-2^{61,85,148,149}. Αν και ο πολυμορφισμός του NAT-2 έχει μελετηθεί εκτεταμένα, η σημασία του NAT-1 παραμένει υπό διερεύνηση¹⁴⁸. Ο πολυμορφισμός του NAT-2 εκφράζεται με τη μορφή του αργού ακετυλιωτικού φαινοτύπου σε 50% των Καυκασίων και η πλειονότητα των αργών ακετυλιωτικών αλληλομόρφων σχετίζεται με τρεις σημειακές μεταλλάξεις: 590A, 341C και 857A του NAT-2 γονιδίου στο χρωμόσωμα 8 (και οι τρεις μεταλλάξεις θεωρούνται ως υπεύθυνες για τον αργό ακετυλιωτικό φαινότυπο σε περισσότερο από 95% των Καυκασίων αργών ακετυλιωτών)^{85,116,148,149,150}.

Η μελέτη μας αποτελεί την πρώτη παρόμοια μελέτη σε Ελληνικό πληθυσμό. Όπως έγινε σαφές στο Γενικό Μέρος, η ποικιλομορφία έκφρασης της N-ακετυλτρανσφεράσης, ως αποτέλεσμα ύπαρξης διαφορετικών μεταλλάξεων στη γονιδιακή θέση NAT-2 μεταξύ διαφόρων πληθυσμών, καθιστά αναγκαία τη γενετική μελέτη διαφόρων πληθυσμιακών ομάδων, προκειμένου να διαπιστωθεί σε κάθε περίπτωση ο βαθμός ταύτισης ή η διαφοροποίηση της συγκεκριμένης πληθυσμιακής ομάδας με τους υπόλοιπους Καυκάσιους.

1) Πρωταρχικός στόχος της μελέτης μας ήταν να εξακριβωθεί το κατά πόσο η γενετικά καθορισμένη γρήγορη ακετυλίωση αποτελεί προστατευτικό παράγοντα στην εμφάνιση καρκίνου ουροδόχου κύστης. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένη μέθοδο PCR, προσδιορίσαμε και συγκρίναμε με δοκιμασία χ^2 τη συχνότητα των γρήγορων ακετυλιωτών μεταξύ ασθενών με νεοδιαγνωσμένο καρκίνο ουροδόχου κύστης και μαρτύρων.

2) Ένας άλλος στόχος της μελέτης αυτής ήταν να εξεταστεί το ενδεχόμενο ύπαρξης συγκεκριμένων γονοτύπων, που, ανάμεσα στο σύνολο των γονοτύπων που είναι υπεύθυνοι για την αργή ακετυλίωση, σχετίζονται με μεγαλύτερη ευπάθεια καρκίνου ουροδόχου κύστης. Έτσι, προκειμένου να διερευνηθεί το ενδεχόμενο αυτό, βασιστήκαμε στη δοκιμασία χ^2 , ώστε να διαπιστώσουμε εάν υπήρχε στατιστικά σημαντική επικράτηση κάποιων συγκεκριμένων γονοτύπων που προκαλούν αργή ακετυλίωση στην ομάδα των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες. Σημειωτέον ότι, παρά τις αρκετές συσχετίσεις της αργής ακετυλίωσης, όπως προσδιορίζεται από φαινοτυπικές και γονοτυπικές δοκιμασίες, με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, δεν υπήρχε μέχρι σήμερα μελέτη που να εξέταζε ένα παρόμοιο ενδεχόμενο. Η ανεύρεση συγκεκριμένων γονοτύπων μεταξύ των αργών ακετυλιωτών, που ενέχονται για μεγαλύτερο κίνδυνο νόσησης από καρκίνο ουροδόχου κύστης, καθίσταται σημαντική από τη στιγμή που η αργή ακετυλίωση συνολικά, αν και είναι βέβαιο ότι αποτελεί παράγοντα καρκινογένεσης του ουροθηλίου, αφορά περίπου το 50% των Λευκών¹⁵¹.

3) Στη μελέτη αυτή προσπαθήσαμε, επίσης, να διερευνήσουμε το ενδεχόμενο πιθανής συσχέτισης μεταξύ συγκεκριμένων γονοτύπων της αργής ακετυλίωσης με πε-

ρισσότερο επιθετική νόσο στην αρχική διάγνωση από άποψη βαθμού (grade) και σταδίου (stage) της νόσου. Έτσι, στην παρούσα μελέτη, και αφού προηγουμένως είχαμε προσδιορίσει το γονότυπο κάθε ασθενούς, συγκρίναμε, με βάση τη δοκιμασία χ^2 , τις συχνότητες των γονοτύπων αυτών μεταξύ των ασθενών με το βαθμό κακοήθειας και το στάδιο της νόσου, όπως αυτά προσδιορίζονταν από την Παθολογοανατομική διάγνωση των παρασκευασμάτων, έπειτα από τη χειρουργική αντιμετώπιση του νεοπλασματος (διουρηθρική εκτομή ή κυστεκτομή, ανάλογα με την έκταση της νόσου). Είναι σαφές ότι μία τέτοια συσχέτιση, εάν υπήρχε, θα πρόσθετε, πιθανότατα, έναν ακόμη μοριακό δείκτη στους ήδη γνωστούς ή υπό διερεύνηση προγνωστικούς παράγοντες του καρκίνου του ουροθηλίου. Παρόμοιοι μοριακοί δείκτες αναζητούνται "εσπευσμένα" στη σύγχρονη Ουρολογία, καθώς η φυσική ιστορία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης παρουσιάζει μία μοναδική ιδιομορφία: Παρά το γεγονός ότι η πλειονότητα των περιπτώσεων αφορά, στην αρχική διάγνωση, επιφανειακούς όγκους χαμηλού βαθμού κακοήθειας, ένα μεγάλο ποσοστό των όγκων αυτών τείνουν, παρά την όποια αντιμετώπισή τους, να υποτροπιάζουν, συχνά σε επιθετικότερη μορφή και τελικά είτε απαιτούν ριζική επέμβαση (κυστεκτομή) με επιβαρυντικές για την ποιότητα ζωής του ασθενούς συνέπειες, είτε, το χειρότερο, επιφέρουν το μοιραίο, κυρίως σε περιπτώσεις μη ενδεδειγμένης παρακολούθησης της πορείας της νόσου^{152,153}. Η ανεύρεση μοριακών δεικτών, οι οποίοι θα καταδεικνύουν ποιοί ασθενείς κινδυνεύουν από "επιθετική νόσο" από την πρώτη διάγνωση ή ποιοί ασθενείς με επιφανειακούς όγκους αρχικά, έχουν υψηλή πιθανότητα να παρουσιάσουν υποτροπή είναι σαφές ότι μπορεί να προσφέρει τα μέγιστα στην ορθολογικότερη αντιμετώπιση της νόσου^{152,154}.



5. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 Ασθενείς και Μάρτυρες.

Μεταξύ Αυγούστου 1996 και Μαΐου 1998, εξετάστηκαν 89 ασθενείς με πρωτο-διαγνωσμένο καρκίνο μεταβατικού επιθηλίου ουροδόχου κύστης (75 άνδρες και 14 γυναίκες, με εύρος ηλικίας 35 ως 97 έτη και μέση ηλικία 66 έτη) και 147 άτομα με μη-κακοήγη νοσήματα του ουροποιητικού (μάρτυρες).

Όλοι οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη επιλέχθηκαν τη στιγμή της πρώτης διάγνωσης, που έλαβε χώρα στο διάστημα Αύγουστος 1996- Μάιος 1998 στην Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, δηλαδή οι υποτροπές μετά τη θεραπεία εξαιρέθηκαν από τη μελέτη. Οι μάρτυρες ήταν άτομα που παρουσιάζαν διάφορες ουρολογικές παθήσεις, όχι όμως ενεργό ή θεραπευθείσα κακοήθεια του ουροποιητικού και προσήλθαν για αντιμετώπιση των προβλημάτων τους στην ίδια Κλινική, κατά την ίδια περίοδο. Αναλυτικότερα, από τους 122 άρρενες μάρτυρες οι 82 παρουσίαζαν προβλήματα σχετιζόμενα με καλοήγη υπερτροφία του προστάτη, 25 με συμπτώματα ουρολοίμωξης και 15 προσήλθαν για διερεύνηση ουρολιθίασης. Από τις 25 γυναίκες που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, οι 20 προσήλθαν στην Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για αντιμετώπιση ουρολοίμωξης (απλής ή εμπύρετης) και οι 5 για αντιμετώπιση και διερεύνηση λιθίασης του ουροποιητικού.

Αμφότερες οι ομάδες προέρχονταν από ένα αγροτικό πληθυσμό της Βορειο-δυτικής Ελλάδος και, επομένως, χαρακτηρίζονταν από απουσία πιθανής έκθεσης στα γνωστά χημικά καρκινογόνα του επαγγελματικού καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

Οι μάρτυρες επιλέχθηκαν έτσι, ώστε να έχουν παρόμοια ηλικία, καπνιστικές συνήθειες και αναλογία ανδρών/ γυναικών με τους ασθενείς, όπως καταδεικνύεται στον πίνακα 3.

Πίνακας ηλικ	ασθενείς (n=89)	μάρτυρες (n=147)	p
Εύρος ηλικιών	35-97	35-86	
Μέση ηλικία (SD)	65.85 (11.88)	63.90 (10.86)	0.20
Φύλο (Α/Γ) (%)	75/14 (84.3%-15.7%)	122/25 (83.0%-17.0%)	0.79
Καπνιστές/Μη καπνιστές (%)	56/33 (62.9%-37.1%)	94/53 (63.9%-36.1%)	0.87

Σε όλους τους ασθενείς, ο βαθμός κακοήθειας και το στάδιο της νόσου καθορίστηκαν μετά από ιστολογική εξέταση των δειγμάτων, που πάρθηκαν είτε με διουρηθρική εκτομή του όγκου είτε μετά από ριζική κυστεκτομή, και συσχετίστηκαν με το γονότυπο του κάθε ασθενούς. Κανείς από τους ασθενείς δεν είχε λάβει νεο-επικουρική θεραπεία με μορφή ακτινοβολίας ή χημειοθεραπείας, με στόχο την υποσταδιοποίηση (downstaging) και συρρίκνωση (shrinkage) του όγκου προκειμένου να υποβληθεί σε εγχείρηση κατόπιν, καθώς κάτι τέτοιο θα αλλοίωνε εμφανώς τα αποτελέσματά μας.

5.2 Μεθοδολογία της μοριακής ανάλυσης

Ακολουθώντας, απομονώθηκε DNA από το περιφερικό αίμα τόσο ασθενών, όσο και μαρτύρων, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του NaCl. Με τον τρόπο αυτό, τα DNAs που συλλέχθηκαν από τους μάρτυρες και τους ασθενείς ήταν κατάλληλα για μακροχρόνια διατήρηση στους 4°C, έτσι ώστε να είναι δυνατή η διερεύνηση τους σε μελλοντικό χρόνο.

Οι NAT-2 γονότυποι ανιχνεύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ειδική ενίσχυση αλληλομόρφου (ARMS)- PCR για τις μεταλλάξεις 590A και 857A και τον πολυμορφισμό 481T, που πάντα συνυπάρχει με τη μετάλλαξη 341C, όπως περιγράφηκε από τον Agundez και συν¹⁴⁹. Ένα τμήμα του DNA, που περιείχε όλη την κωδικοποιητική περιοχή του γονιδίου NAT-2, χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση με τα περιοριστικά ένζυμα Fok I και Dde I, επιτρέποντας την εντόπιση των αλληλομόρφων του γονιδίου NAT-2, που έφερε τις μεταλλάξεις 590A και 481T. Τα δείγματα αναλύθηκαν με PCR σε ζεύγη αντιδράσεων με εκκινητές συγκεκριμένους τόσο για τις μεταλλάξεις, όσο και για το μη μεταλλαγμένο (άγριο τυπο) του ενζύμου. Κάθε σειρά αντιδράσεων PCR περιελάμβανε ένα θετικό και ένα αρνητικό δείγμα ελέγχου, καθώς και δείγμα χωρίς DNA.

Ένα τμήμα αποτελούμενο από 1212 ζεύγη βάσεων, που περιείχε όλη την κωδικοποιητική περιοχή και μέρος του 5' και 3' άκρου του γονιδίου NAT-2, ενισχύθηκε με τη χρήση δύο εκκινητών : (1) του εκκινητή AATTAGTCACACGAGGA, που καταλαμβάνει τη θέση -74 ως -58 στην κωδικοποιητική περιοχή του γονιδίου NAT-2 και (2): του εκκινητή TCTAGCATGAATCACTCTG, που αντιστοιχεί στη θέση 1138 ως 1119 στην κωδικοποιητική περιοχή του γονιδίου NAT-2.

Μετά από αυτό το αρχικό βήμα, μία δεύτερη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε, ώστε να γίνει δυνατή η μελέτη των μεταλλάξεων που περιγράφηκαν πριν. Το βήμα αυτό περιελάμβανε τρεις αντιδράσεις, μία για κάθε αλληλόμορφο, χρησιμοποιώντας διαφορετικά ζεύγη εκκινητών και συνθήκες ενίσχυσης για κάθε μετάλλαξη.

Η μετάλλαξη 590A μελετήθηκε με τη χρήση του ζεύγους των εκκινητών TTTACGCTTGAACCTCG και TTTACGCTTGAACCTCA, που αντιστοιχούσαν στην περιοχή 574 ως 590, αμφότεροι, σε συνδυασμό με τον εκκινητή 2, σε διαφορετικές αντιδράσεις.

Κατά παρόμοιο τρόπο, η μετάλλαξη 481T μελετήθηκε χρησιμοποιώντας τους εκκινητές CTGATTTGGTCCAG και CTGATTTGGTCCAA, οι οποίοι αντιστοιχούσαν στην 494 με 481 περιοχή, σε συνδυασμό με τον εκκινητή 1.

Τέλος, η 857A μετάλλαξη ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας τους εκκινητές AATAGTAAGGGATC και AATAGTAAGGGATT, που αντιστοιχούσαν στην περιοχή 870 με 857 του γονιδίου, σε συνδυασμό με τον εκκινητή 1.

5.2.1 Συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Η αντίδραση του επιλεκτικού πολλαπλασιασμού γενομικού DNA (PCR), έγινε σε φιάλη erppendorf 500μl. Όλα τα αντιδραστήρια, κατά τη διάρκεια της εργασίας τοποθετούνται πάνω σε πάγο. Τα υλικά που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να έχουν αποστειρωθεί. Ο χώρος, όπου πραγματοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, πρέπει να διατηρείται καθαρός, ώστε να ελαχιστοποιούνται οι τυχόν επιμολύνσεις. Όλες οι εργασίες γίνονται με γάντια.

Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποι-

ήθηκε αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής: PTC-100, Peltier-Effect Cycling. MJ Research Inc. USA.

Συνθήκες της αντίδρασης για την ανίχνευση της μετάλλαξης 481

Ρυθμιστικό διάλυμα : 50mM KCl, 20mM Tris-HCl, pH 8.4
 dNTPS : 2mM (ισομοριακό μίγμα dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Promega).
 Ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές : 50pmol από το καθένα (Genset).
 Ιόντα Mg ($MgCl_2$) : 1.5mM
 Taq DNA πολυμεράση : 1μοναδα (Gibco BRL)
 Γενομικό DNA : 300-500ng.

Η αντίδραση έγινε σε συνολικό όγκο 50μl, συμπληρώνοντας με δισαποσταγμένο και αποστειρωμένο H_2O .

Για να αποφευχθεί η απώλεια του όγκου της αντίδρασης εξ' αιτίας των υψηλών θερμοκρασιών, σε κάθε μπουκάλι αντίδρασης, σαν κάλυμμα, χρησιμοποιήθηκαν δύο σταγόνες παραφινέλαιου.

Πρόγραμμα κυκλοποίησης της μετάλλαξης 481

Αρχικά η αντίδραση εκτίθεται σε θερμοκρασία 95°C για 1.5 min και ακολουθεί :
 Αποδιάταξη 94°C για 1min
 Επανασύνδεση 48°C για 1 min
 Επέκταση 72°C για 1 min

Τα τρία στάδια της αποδιάταξης, επανασύνδεσης και επέκτασης επαναλαμβάνονται για 20 κύκλους και τέλος ακολουθεί τελική επέκταση 72°C για 7min.

Συνθήκες αντίδρασης για την μετάλλαξη 590

Ρυθμιστικό διάλυμα : 50mM KCl, 20mM Tris-HCl, pH 8.4
 dNTPS : 2mM (ισομοριακό μίγμα dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Promega).
 Ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές : 50pmol από το καθένα (Genset).
 Ιόντα Mg ($MgCl_2$) : 1.25mM
 Taq DNA πολυμεράση : 1.5μοναδες (Gibco BRL)
 Γενομικό DNA : 300-500ng.

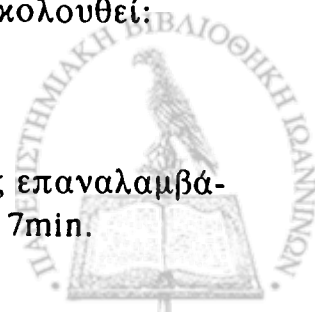
Η αντίδραση έγινε σε συνολικό όγκο 50μl, συμπληρώνοντας με δισαποσταγμένο και αποστειρωμένο H_2O .

Για να αποφευχθεί η απώλεια του όγκου της αντίδρασης εξ' αιτίας των υψηλών θερμοκρασιών, σε κάθε μπουκάλι αντίδρασης, σαν κάλυμμα, χρησιμοποιήθηκαν δύο σταγόνες παραφινέλαιου.

Πρόγραμμα κυκλοποίησης για την μετάλλαξη 590

Αρχικά η αντίδραση εκτίθεται σε θερμοκρασία 95°C για 1.5 min και ακολουθεί:
 Αποδιάταξη 94°C για 1min
 Επανασύνδεση 48°C για 1 min
 Επέκταση 72°C για 1 min

Τα τρία στάδια της αποδιάταξης, επανασύνδεσης και επέκτασης επαναλαμβάνονται για 20 κύκλους και τέλος ακολουθεί τελική επέκταση 72°C για 7min.



Συνθήκες της αντίδρασης για τη μετάλλαξη 857

Ρυθμιστικό διάλυμα: 50mM KCL, 20mM Tris- HCL, pH 8.4

dNTPs: 2mM (ισομοριακό μίγμα dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Promega).

Ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές: 50 pmol από το καθένα (Genset)

Ιόντα Mg (MgCL₂): 1.25 mM

Taq DNA πολυμεράση : 1.5 μονάδες (Gibco BRL)

Γενομικό DNA: 300-500 ng.

Η αντίδραση έγινε σε συνολικό όγκο 50μl, συμπληρώνοντας με δισαποσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O.

Για να αποφευχθεί η απώλεια του όγκου της αντίδρασης εξ' αιτίας των υψηλών θερμοκρασιών, σε κάθε μπουκάλι αντίδρασης, σαν κάλυμμα, χρησιμοποιήθηκαν δύο σταγόνες παραφινέλαιου.

Πρόγραμμα κυκλοποίησης για την μετάλλαξη 857

Αρχικά η αντίδραση εκτίθεται σε θερμοκρασία 95°C για 1.5 min και ακολουθεί:

Αποδιάταξη 94°C για 1min

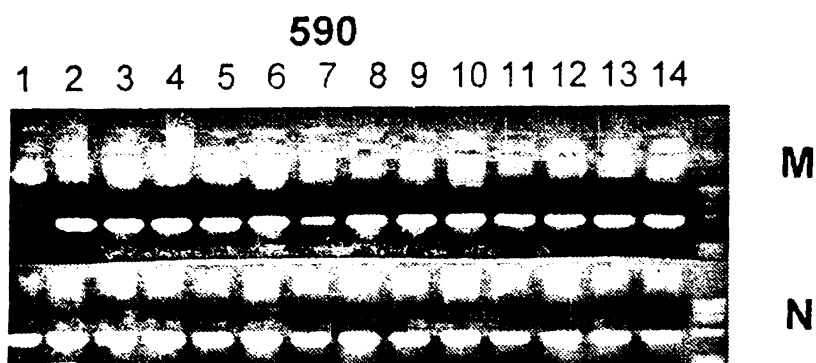
Επανασύνδεση 44°C για 1 min

Επέκταση 72°C για 1 min

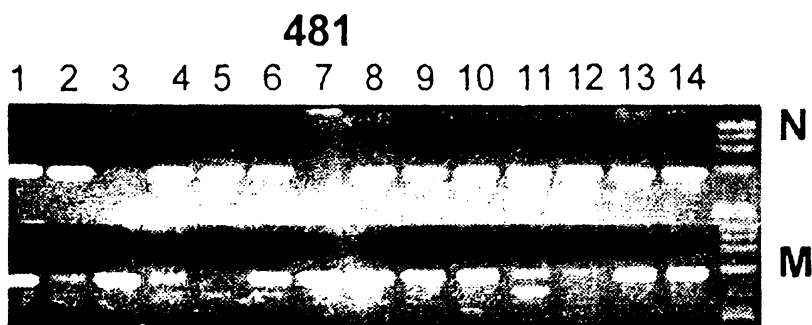
Τα τρία στάδια της αποδιάταξης, επανασύνδεσης και επέκτασης επαναλαμβάνονται για 20 κύκλους και τέλος ακολουθεί τελική επέκταση 72°C για 7min.

Τα προϊόντα της αντίδρασης απεικονίζονται στις φωτογραφίες 1 και 2 και η πορεία της όλης αντίδρασης απεικονίζεται στην εικόνα 3, στις επόμενες σελίδες.





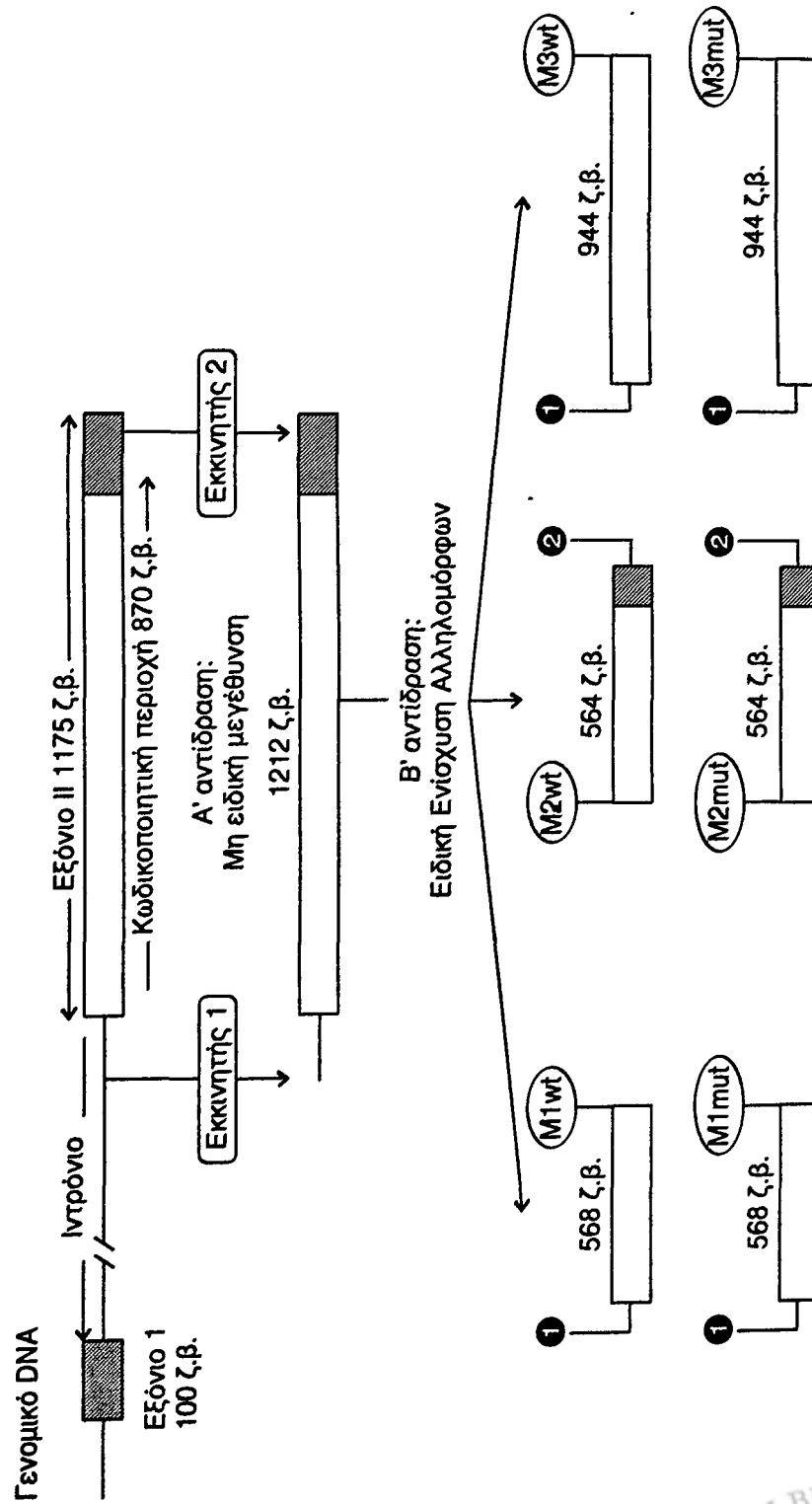
Φωτογραφία1: Προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.9% που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο 0.5mgr/ml. Στις θέσεις 1 και 7 ομόζυγο φυσιολογικό. Στις θέσεις 2-6 και 8-14 ετερόζυγο N/M. Στη θέση 15 ο δείκτης μοριακών βαρών: ΦΧ 174/HaeIII.



Φωτογραφία2: Προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.9% που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο 0.5mgr/ml. Στις θέσεις 3 και 7 ομόζυγοι 481/481. Στις θέσεις 2,4,5,11,12 ομόζυγοι φυσιολογικοί. Στις θέσεις 1,6,8-10,13,14 ετερόζυγοι. Στη θέση 15 ο δείκτης μοριακών βαρών: ΦΧ 174/HaeIII.



Εικόνα 3. Η πορεία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)



5.3 Στατιστική ανάλυση

Οι συχνότητες των γονοτύπων συγκρίθηκαν μεταξύ ασθενών και μαρτύρων με τη δοκιμασία χ^2 . Η δοκιμασία Fisher και η διόρθωση κατά Yates χρησιμοποιήθηκαν, όπου κρίθηκε απαραίτητο. Οι λόγοι αναλογιών (odds ratios), ο οφειλόμενος κίνδυνος και ο οφειλόμενος κίνδυνος του πληθυσμού για τους γονοτύπους που βρέθηκαν να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές επίσης υπολογίστηκαν.

Ο λόγος αναλογιών (odds ratio = OR) χρησιμοποιήθηκε ως τρόπος εκτίμησης του σχετικού κινδύνου για καρκίνο ουροδόχου κύστης, σχετιζόμενος με συγκεκριμένους γονοτύπους. Ο λόγος αναλογιών (odds ratio) ορίζεται ως η αναλογία (odds) ενός ασθενή, που έχει ένα συγκεκριμένο γονότυπο, διαιρούμενη διά της αναλογίας (odds) ενός μάρτυρα, που έχει τον ίδιο γονότυπο.

Ο οφειλόμενος κίνδυνος (Attributable risk, AR) υπολογίστηκε με βάση τον τύπο $AR = OR - 1 / OR$, ως ποσοστό επί τοις εκατό, υποδηλώνοντας, εν προκειμένω, το ποσοστό επί τοις εκατό στους φορείς των ελαττωματικών γονοτύπων στο οποίο ο καρκίνος αποδίδεται στο συγκεκριμένο γενετικό έλλειμμα.

Ο οφειλόμενος κίνδυνος του πληθυσμού (population attributable risk, PAR) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική του Taylor¹⁵⁵, επίσης ως ποσοστά επί τοις εκατό, υποδηλώνοντας, με βάση τον ορισμό του, το ποσοστό επί τοις εκατό των περιπτώσεων καρκίνου στον συνολικό πληθυσμό μας που μπορεί να αποδοθεί στους συγκεκριμένους ελαττωματικούς γονοτύπους.



6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Αποτελέσματα

Όλοι οι ασθενείς και οι μάρτυρες εξετάσθηκαν και οι ανενεργείς μεταλλάξεις 590A και 341C συνυπήρχαν με τους πολυμορφισμούς 282T+590A και 341C+481T+803G, αντιστοίχως. Συγκεκριμένα, όλοι οι απλότυποι 481T είχαν δύο θέσεις αναγνώρισης στο DdeI και, επομένως, απλότυπο 341C+481T+803G. Ο απλότυπος όλων των ατόμων με την μετάλλαξη 590A είναι 590A+282T εφόσον, σύμφωνα με τον Agundez και συν., 149 είναι θετικοί σε δύο ζώνες στην επίδραση στο Fok I.

Τα άνωθι στοιχεία αποτελούν ισχυρή απόδειξη της ομογένειας του πληθυσμού, καθώς καταδεικνύουν την ύπαρξη μόνο ενός απλοτύπου σε κάθε μετάλλαξη αργής ακετυλίωσης (590A+ 282T και 341C+ 481T+803G, αντίστοιχα).

Η συχνότητα των γρήγορων ακετυλιωτών μεταξύ των μαρτύρων ήταν υψηλότερη από τους ασθενείς ($p= 0.0016$). Ο λόγος αναλογιών (odds ratio) των γρήγορων ακετυλιωτών για καρκινογένεση στην ουροδόχο κύστη υπολογίσθηκε στο 0.25.

Οι ομοζυγώτες 341C/ 341C ήταν εμφανώς πιο συχνοί μεταξύ των ασθενών ($p= 0.0031$), παρουσιάζοντας ένα λόγο αναλογιών 3.73 για καρκίνο της ουροδόχου κύστης και, επομένως, ο συγκεκριμένος γονότυπος ήταν μειονεκτικός, από άποψη αυξημένου κινδύνου για νόσηση από καρκίνο ουροδόχου κύστης. Ο οφειλόμενος κίνδυνος (AR) αυτού του γονοτύπου ήταν 0.73, ενώ ο οφειλόμενος κίνδυνος του πληθυσμού (PAR) ήταν 0.115 (πίνακας 4).

Οι ετεροζυγώτες 341C/ 857A ήταν στατιστικά επικρατέστεροι στην ομάδα των ασθενών ($p= 0.0031$). Αυτός ο μειονεκτικός γονότυπος έφερε ένα εξαιρετικά υψηλό λόγο αναλογιών (odds ratio), υπολογιζόμενο σε 12.46 για καρκινογένεση στην ουροδόχο κύστη με ένα οφειλόμενο κίνδυνο 0.92. Ο οφειλόμενος κίνδυνος πληθυσμού του γονοτύπου αυτού ήταν 0.072 (πίνακας 5).

Η συσχέτιση των γονοτύπων με το βαθμό κακοήθειας στην αρχική διάγνωση κατέδειξε ότι ο γονότυπος 341C/ 341C μπορεί, επίσης, να σχετίζεται με περισσότερη επιθετική νόσο, καθώς η δοκιμασία χ^2 αυτού του γονοτύπου έδωσε ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p < 0.05$), ενώ όλοι οι άλλοι γονότυποι δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική σχέση είτε με υψηλής κακοήθειας καρκίνο ουροδόχου κύστης είτε με χαμηλού βαθμού κακοήθειας όγκους (πίνακας 6).

Καμμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε στη συσχέτιση των διαφορετικών γονοτύπων του NAT-2 γονιδίου μεταξύ των ασθενών και του τοπικού σταδίου διήθησης, είτε πριν είτε μετά την ομαδοποίηση των διαφόρων σταδίων σε επιφανειακή και διηθητική νόσο (πίνακας 7).



6.2 Πίνακες

Η κωδικοποίηση των γονοτύπων με τους αριθμούς 0-9 (πίνακας 2) έγινε για πρακτικούς λόγους και χρησιμοποιείται παρακάτω στους πίνακες των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 4 Κωδικοποίηση των γονοτύπων της NAT 2.

Κωδικοποίηση των γονοτύπων της NAT 2		
1.	590/590	1-3= ίδιες μεταλλάξεις στους δύο αλληλομόρφους (αργοί ακετυλιωτές)
2.	341/341	
3.	857/857	
4.	590/341	4-6= συνδυασμός διαφορετικών μεταλλάξεων στους δύο αλληλομόρφους (αργοί ακετυλιωτές)
5.	590/857	
6.	341/857	
7.	590/N	7-9= ετεροζυγώτες με ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο
8.	341/N	
9.	857/N	
0.	N/N=wt	γρήγοροι ακετυλιωτές



Πίνακας 5. Κατανομή ασθενών και μαρτύρων σύμφωνα με το γονότυπο NAT-2.

Γονότυποι		Μάρτυρες		Ασθενείς			OR	AR	PAR
Κωδικός	Γονότυπος	n=147	(%)	n=89	(%)	p<	(CI 95%)		
0	N/N=wt	51	34.7	14	15.7	0.0016	0.25 (0.11-0.59)		
1	590/590	8	5.4	6	6.7	NS	-		
2	341/341	7	4.8	14	15.7	0.0041	3.73 (1.52-9.13)	0.73	0.115
3	857/857	0	0	0	0	-	-		
4	590/341	39	26.5	23	25.8	NS	-		
5	590/857	1	0.7	2	2.2	NS	-		
6	341/857	1	0.7	7	7.9	0.0031	12.46 (2.36-65.89)	0.92	0.072
7	590/N	5	3.4	7	7.9	NS	-		
8	341/N	35	23.8	15	16.9	NS	-		
9	857/N	-	0	1	1.1	-	-		

OR, λόγος αναλογιών=odds ratio; AR, οφειλόμενος κίνδυνος; PAR, οφειλόμενος κίνδυνος του πληθυσμού

CI, Διάστημα αξιοπιστίας; N/N, άγιος τύπος; γρήγοροι ακετυλιωτές; NS, μη στατιστικά σημαντικό.



Πίνακας 6. Κατανομή των ασθενών σύμφωνα με το βαθμό κακοήθειας

Κωδικός γονοτύπων

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
G₁	9 64.3%	3 50.0%	4 28.6%		14 60.9%	2 100.0%	4 57.1%	2 28.6%	9 60.0%	0
G₂	2 14.3%	3 50.0%	3 21.4%		4 17.4%	0	1 14.3%	3 42.9%	5 33.3%	1 100.0%
G₃	3 21.4%	0	7 50.0%		5 21.7%	0	2 28.6%	2 28.6%	1 6.7%	0

G, βαθμός κακοήθειας

Πίνακας 7. Κατανομή των ασθενών σύμφωνα με το στάδιο της νόσου

Κωδικός γονοτύπου

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Επιφανειακοί όγκοι (pTa/pT1)	11 (9/2) 78.6%	4 (2/2) 66.6%	7 (3/4) 50%	0	14 (6/8) 60.9%	2 (2/0) 100.0%	5 (1/4) 71.4%	4 (2/2) 57.1%	12 (7/5) 80%	0
Διηθητικοί όγκοι (pT2/pT3/pT4)	3 (1/1/1) 27.4%	2 (1/1/0) 33.4%	7 (2/3/2) 50%	0	9 (7/1/1) 39.1%	0	2 (1/1/0) 28.6%	3 (1/2/0) 42.9%	3 (2/0/1) 20%	1 (1/0/0) 100.0%

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο πολυμορφισμός της N- ακετυλίωσης, που κυρίως αποδίδεται στο ισοένζυμο N-ακετυλτρανσφεράση- 2 (NAT-2), εμπλέκεται στην τοξικότητα φαρμάκων με βάση την αμίνη και στην ευπάθεια σε συγκεκριμένες νόσους, όπως καρκίνο της ουροδόχου κύστης, εδώ και αρκετά χρόνια^{85,156,157}. Η σχετική συμφωνία μεταξύ φαινοτυπικών και γονοτυπικών μελετών καταδεικνύει ότι, πέρα από την επικράτηση των μεταλλάξεων 590A, 341C και 857A, που είναι υπεύθυνες για την πλειονότητα των Καυκάσιων αργών ακετυλιωτών, άγνωστοι NAT-2 μεταλλακτικοί αλληλόμορφοι πρέπει να είναι παρόντες σε χαμηλές συχνότητες (υπολογιζόμενες στο 5%) και, επομένως, δεν επηρεάζουν σημαντικά την κατάδειξη του φαινοτύπου στις μελέτες πληθυσμών.^{108,158}

Έχει καταδειχθεί ότι οι μεταλλάξεις του NAT-2 γονιδίου δεν οδηγούν σε ολική απουσία, αλλά σε μειωμένη σύνθεση και δραστηριότητα του ενζύμου^{108,159,160}. Παρόλ'αυτά, σε αντίθεση με τους γρήγορους ακετυλιωτές, που έχουν την ικανότητα να αποτοξικώνουν μέσω ακετυλίωσης, δηλαδή να μεταβολίζουν τις αρυλαμίνες σε αθώα παράγωγα, οι αργοί ακετυλιωτές τείνουν να σχηματίζουν, μέσω της N- υδροξυλίωσης, N- υδροξυπαράγωγα (εγγύς καρκινογόνα της ουροδόχου κύστης),^{161,162} τα οποία ακολούθως γλυκουρονιδιώνονται^{66,67,68}. Τα γλυκουρονιδιωμένα παράγωγα μπορούν εύκολα κατόπιν να υποστούν υδρόλυση και, έτσι, να σχηματίσουν ηλεκτροφιλικά μόρια ιόντων αρυλνιτρενίου, τα οποία παρουσιάζουν ισχυρότατη καρκινογόνο δράση. (τελικά καρκινογόνα της ουροδόχου κύστης)^{71,73,163}. Συγκεκριμένα, τα ιόντα αρυλνιτρενίου παρουσιάζουν αυξημένη συγκέντρωση στα ούρα, παραμένουν για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα εντός της ουροδόχου κύστης και, επομένως, έχουν την ικανότητα να προκαλούν μη αντιστρεπτές αλλοιώσεις στο DNA των ουροθηλιακών κυττάρων και έναρξη της καρκινογένεσης. Η πιθανότερη θέση προσβολής του DNA είναι οι βάσεις γουανίνης^{73,163}.

Σημειώτέον ότι ο χρόνος παραμονής των ούρων μέσα στην ουροδόχο κύστη αυξάνει με την ηλικία. Η γήρανση επιφέρει μη αντιστρεπτές αλλοιώσεις της συσταλτικότητας του εξωστήρα μυ με αποτέλεσμα ατελή κένωση της ουροδόχου κύστης και μόνιμο υπόλειμμα ούρων. Στους ηλικιωμένους άνδρες η κατάσταση επιδεινώνεται από την άλλοτε άλλου βαθμού απόφραξη, που προκαλεί η υπερπλασία του προστάτη²⁶.

Ένα σημαντικό ποσοστό των καρκινωμάτων μεταβατικού επιθηλίου της ουροδόχου κύστης μπορεί να αποδοθεί στην περιβαλλοντική έκθεση σε διάφορες αρυλαμίνες. Από τους μη-διαιτητικούς παράγοντες, το κάπνισμα θεωρείται η σημαντικότερη αιτία καρκίνου της ουροδόχου κύστης, στην οποία αποδίδεται 40 με 50% του συνόλου των περιπτώσεων, ενώ ουσίες όπως η 4- αμινοδιφαινύλη και η β- ναφθυλαμίνη, που μπορούν να παραχθούν από την πυρόλυση ουσιών του καπνού και αποτελούν επίσης υποστρώματα του NAT-2, είναι αποδεδειγμένα καρκινογόνα της ουροδόχου κύστης στον άνθρωπο^{2,7,9,14,15,22}. Οι αρωματικές αμίνες χρησιμοποιούνται, επίσης, στη βιομηχανία εντομοκτόνων. Επομένως, οι εργάτες στη βιομηχανία χρωμάτων, όπως είναι από παλιά γνωστό, αλλά και οι αγρότες, σύμφωνα με τα νεότερα δεδομένα, μπορούν να θεωρηθούν ως πληθυσμοί αυξημένου κινδύνου για καρκίνο ουροδόχου κύστης^{5,16,17,19,20,22,24,25}. Η επαγγελματική έκθεση στις αρυλαμίνες ενοχοποιείται για καρκίνο ουροδόχου κύστης σε 19% των ανδρών και 6% των γυναικών^{1,2}. Σήμερα η πλειονότητα αυτών των καρκινογόνων των αρυλαμινών είτε δεν χρησιμοποιείται βιομηχανικά είτε η έκθεση των εργατών σε αυτά έχει μειωθεί δραματικά ως αποτέλεσμα των βελτιωμένων τεχνικών παραγωγής και της αυξημένης πλέον ευαισθησίας,

αναφορικά με τα μέτρα προφύλαξης που πρέπει να λαμβάνονται^{2,19,20}. Ανεξάρτητα από τα παραπάνω, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι η έβδομη συχνότερη αιτία θανάτου στις Δυτικές χώρες και ο τέταρτος συχνότερος τύπος καρκίνου στις ΗΠΑ^{1,2,3,5}.

Η επιλογή του πληθυσμιακού δείγματος, που μελετήθηκε, έγινε έτσι ώστε να υπάρχει παρόμοιος βαθμός έκθεσης στις βασικές πηγές των καρκινογόνων αρυλαμινών, δηλαδή των βασικών καρκινογόνων του ουροθηλίου, τόσο στους ασθενείς όσο και στους μάρτυρες. Έτσι, η αναλογία καπνιστών μη καπνιστών ήταν ίδια στις δύο ομάδες. Επιπλέον, η προέλευση του πληθυσμού από την ευρύτερη περιοχή της Ηπείρου συνηγορούσε σε μηδενική ή ελάχιστη επαγγελματική έκθεση σε ασθενείς και μάρτυρες καθώς η περιοχή δεν έχει βιομηχανικές μονάδες επεξεργασίας καρκινογόνων αρυλαμινών.

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι βασικά νόσος της τρίτης ηλικίας και το γεγονός αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με την αντίληψη ότι απαιτείται μακροχρόνια έκθεση του ουροθηλίου σε χημικά καρκινογόνα, προκειμένου να παρουσιαστεί καρκίνος της ουροδόχου κύστης^{16,23,24,26}. Η εξομοίωση, επομένως, ασθενών και μαρτύρων, από άποψη ηλικίας στη μελέτη μας (ίδια μέση ηλικία), έγινε προκειμένου να αποφευχθούν προφανή λάθη στην εξαγωγή των αποτελεσμάτων μας.

Οι συσχετίσεις του αργού ακετυλιωτικού φαινότυπου με αυξημένο κίνδυνο νόσησης από καρκίνο της ουροδόχου κύστης έδωσαν θετικά^{84,85,86}, αλλά και αρνητικά αποτελέσματα^{87,88}. Τελικά, όμως, παρόμοιες μελέτες που χρησιμοποιούν φαινοτυπικές μεθόδους θεωρούνται πλέον ιδιαίτερα εξεζητημένες και ενέχονται με σοβαρό κίνδυνο λάθους, καθώς η ακετυλιωτική ικανότητα μπορεί να επηρεαστεί από πλείαδα παραμέτρων, οι οποίες είναι αδύνατο να ληφθούν υπόψη στο σύνολό τους^{61,89,90,91}. Μετά, όμως, από την εντόπιση του γονιδίου της Ν-ακετυλτρανσφεράσης^{98,99,102}, τον καθορισμό των μεταλλάξεων που είναι υπεύθυνες για την αργή ακετυλίωση^{123,124} και την ανίχνευση των συνηθέστερων μεταλλακτικών αλληλομόρφων^{101,118}, είναι εύκολη πλέον η διερεύνηση του ακετυλιωτικού πολυμορφισμού με γονοτυπικές μεθόδους. Αυτό επιχειρήθηκε και στην παρούσα μελέτη.

Οι μέχρι σήμερα προσπάθειες συσχέτισης της αργής ακετυλίωσης, όπως αυτή προσδιορίζεται έπειτα από γενετική ανάλυση, με αυξημένη ευπάθεια καρκίνου στην ουροδόχο κύστη είναι σχετικά λίγες^{156,157,164,165,166}. Οι μελέτες αυτές έδειξαν, με ελάχιστες εξαιρέσεις¹⁵⁶, ότι η γενετικά ρυθμιζόμενη αργή ακετυλίωση αποτελεί παράγοντα κινδύνου για καρκινογένεση στην ουροδόχο κύστη^{157,164,165,166}. Παρολαυτά, καμία από τις παραπάνω μελέτες δεν επιχείρησε να διερευνήσει το ενδεχόμενο κάποιου συγκεκριμένου γονότυπου της αργής ακετυλίωσης μεταξύ των διάφορων γενετικών συνδυασμών να παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο νόσησης από καρκίνο του ουροθηλίου. Αυτό ακριβώς το ενδεχόμενο εξετάστηκε στη δική μας μελέτη¹⁶⁸.

Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία παραμένει υπό αμφισβήτηση ο ρόλος της βαρύτητας της έκθεσης στα χημικά καρκινογόνα στον κίνδυνο για καρκίνο της ουροδόχου κύστης που προσδίδει η αργή ακετυλίωση. Έτσι, υπάρχουν μελέτες που καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι οι αργοί ακετυλιωτές αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου για καρκίνο ουροδόχου κύστης μόνο εφόσον έχουν εκτεθεί μακροχρόνια σε καρκινογόνα ουροθηλίου είτε λόγω επαγγελματικής έκθεσης¹⁶⁴, είτε ως καπνιστές¹⁶⁵, είτε ως αποτέλεσμα συνδυασμένης έκθεσης σε καρκινογόνα τόσο μέσω καπνίσματος όσο και μέσω επαγγελματικής έκθεσης¹⁵⁷. Από την άλλη μεριά, άλλοι ισχυρίζονται ότι η αργή ακετυλίωση αποτελεί μεν παράγοντα κινδύνου για καρκίνο ουροδόχου κύστης, μόνο όμως σε άτομα με ιστορικό ελάχιστης έκθεσης σε χημικά καρκινογόνα (μη κα-

πνιστές, χωρίς ιστορικό επαγγελματικής έκθεσης)¹⁶⁶. Στη μελέτη μας¹⁶⁷, ασθενείς και μάρτυρες είχαν, λόγω του σχεδιασμού, ισοδύναμη έκθεση στα ουροθηλιακά καρκινογόνα: το κάπνισμα, ως η μείζον αιτία έκθεσης στις αρυλαμίνες, ήταν εξισορροπημένο μεταξύ μαρτύρων και ασθενών και όλο το υπό μελέτη δείγμα προέρχονταν από την ίδια αγροτική περιοχή, η οποία δεν έχει εργοστάσια που χρησιμοποιούν καρκινογόνα των αρωματικών αμινών στη βιομηχανική παραγωγή. Αν και εξατομικευμένη συσχέτιση μεταξύ ασθενών και μαρτύρων δεν έγινε, οι δύο ομάδες είχαν παρόμοια μέση ηλικία και αναλογία ανδρών προς γυναίκες. Μεταξύ των δύο ομάδων υπήρχε, επίσης, γενετική ομογένεια, όπως καταδεικνύεται από το κοινό γενετικό υπόστρωμα στις μεταλλάξεις 341C και 590A. Επομένως, άλλοι γενετικοί παράγοντες, που μπορεί ενδεχόμενα να επηρεάζουν την ευπάθεια ασθενών και μαρτύρων στα χημικά καρκινογόνα, είχαν εξισορροπηθεί σε μεγάλο βαθμό.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, οι γρήγοροι ακετυλιωτές φαίνεται πως έχουν πλεονέκτημα από άποψη χαμηλότερου κινδύνου για καρκίνο ουροδόχου κύστης, ενδυναμώνοντας την αντίληψη του προστατευτικού ρόλου της γρήγορης ακετυλίωσης στην αποτοξίκωση των αρυλαμινών και των καρκινογόνων παραγώγων τους^{157,164,165,166}.

Πέρα όμως από αυτό, μεταξύ των αργών ακετυλιωτών, δύο γονότυποι, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, φαίνεται πως είναι αυτοί που κυρίως ενέχονται με την αυξημένη ευπάθεια στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι μόνο οι φορείς των γονοτύπων 341C/341C και 341C/857A παρουσιάζονται σε στατιστικά σημαντική υψηλότερη συχνότητα μεταξύ των ασθενών. Η σημασία του ευρήματος αυτού είναι προφανής διότι, στην περίπτωση που επιβεβαιωθεί και από άλλες μελέτες, θα καθορίζει επακριβώς τα άτομα που, μεταξύ των αργών ακετυλιωτών, παρουσιάζουν σημαντικό κίνδυνο νόσησης από καρκίνο ουροδόχου κύστης. Με άλλα λόγια, το εύρημα της μελέτης μας ίσως βοηθήσει στον εστιασμό της προσοχής των κλινικών, αλλά και των εργαστηριακών ιατρών, από άποψη πρόληψης και πρόγνωσης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης τόσο στο γενικό πληθυσμό όσο και, κυρίως, σε ομάδες ατόμων με ιστορικό μακροχρόνιας έκθεσης σε ουροθηλιακά καρκινογόνα.

Η μετάλλαξη 341C στους Καυκάσιους συνδέεται στη μεγάλη πλειονότητα των περιπτώσεων με τον αλληλόμορφο 341C+ 481T+ 803G, που, σημειωτέον, είναι και ο αλληλόμορφος με τη μεγαλύτερη συχνότητα στους Καυκάσιους. Η ίδια μετάλλαξη απαντάται σε πολύ μικρότερη συχνότητα ως αλληλόμορφος 341C+ 481T ή 341C+ 303G^{100,123}. Πάντως, εκτεταμένες in vivo και in vitro μελέτες έχουν δείξει ότι η προαναφερόμενη μετάλλαξη ευρισκόμενη σε οποιονδήποτε από τους παραπάνω αλληλομόρφους έχει ως συνέπεια τη λειτουργική έκπτωση του ενζύμου της N-ακετυλτρανσφεράσης^{123,124}. Οι διαπιστώσεις αυτές όχι μόνο είναι σε απόλυτη συμφωνία, αλλά και ενισχύουν ακόμη περισσότερο το εύρημα μας, αναφορικά με την ευπάθεια για καρκίνο της ουροδόχου κύστης στους ομοζυγώτες 341C. Αντίθετα με ότι ισχύει για τη μετάλλαξη 341C, η μετάλλαξη 857A έχει αμφισβητούμενες συνέπειες στη λειτουργική έκφραση του ενζύμου^{118,124}. Περαιτέρω δυσκολία στη μελέτη της μετάλλαξης αυτής προέρχεται από την εξαιρετικά χαμηλή συχνότητά της στους Καυκάσιους. Φαίνεται, όμως, από τα ευρήματά μας ότι η ύπαρξη της 341C και της 857A μετάλλαξης, αν και αποτελεί εξαιρετικά σπάνιο συνδυασμό, επιφέρει σημαντικού βαθμού αύξηση του κινδύνου καρκινογένεσης στην ουροδόχο κύστη.

Ο στόχος των φορέων της δημόσιας υγείας είναι να ελαττώσει τη συχνότητα ή να ερολάβει την εμφάνιση συγκεκριμένων νόσων στον πληθυσμό. Ο σχετικός κίνδυνος, ως επιδημιολογικό μέγεθος, εκτιμά την ισχύ της συσχέτισης μεταξύ νόσων και παραγόντων κινδύνου, ενώ ο οφειλόμενος κίνδυνος προσδιορίζει το ποσοστό των πε-

ριπτώσεων μίας νόσου που μπορεί να αποδοθεί σε ένα συγκεκριμένο παράγοντα. Σύμφωνα με τη γνώμη των περισσότερων επιδημιολόγων, ο προσδιορισμός του μεγέθους της συμβολής ενός παράγοντα κινδύνου στην εμφάνιση μίας νόσου είναι εξίσου σημαντικός με την έρευνα για ανίχνευση νέων παραγόντων κινδύνου και, για το λόγο αυτό, επιχειρήθηκε στην παρούσα μελέτη ο προσδιορισμός του οφειλόμενου κινδύνου και του οφειλόμενου κίνδυνου πληθυσμού (AR και PAR, αντίστοιχα) των μεταλλάξεων που, σύμφωνα με τη δοκιμασία χ^2 , βρέθηκαν να παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Επιπρόσθετα, είναι πλέον σαφές ότι οι συστάσεις των φορέων της δημόσιας υγείας, που βασίζονται σε εκτιμήσεις του σχετικού κινδύνου ενός προδιαθεσικού παράγοντα μίας νόσου, δεν αρκούν και η προσοχή πρέπει να στραφεί στον οφειλόμενο κίνδυνο, που ο προδιαθεσικός αυτός παράγοντας εμφανίζει σε συγκεκριμένο πληθυσμό¹⁶⁸.

Οι οφειλόμενοι κίνδυνοι που υπολογίστηκαν για τους γονοτύπους 341C/341C και 341C/ 857A ήταν σημαντικά υψηλοί, γεγονός που σημαίνει ότι στον πληθυσμό που μελετήθηκε η ύπαρξη αυτών των γονοτύπων μπορεί να θεωρηθεί ως υπεύθυνη για 70% και 90% των περιπτώσεων καρκίνου ουροδόχου κύστης μόνο μεταξύ των φορέων αυτών των συγκεκριμένων γονοτύπων. Οι περιπτώσεις αυτές αντιπροσωπεύουν χαμηλό ποσοστό περιπτώσεων καρκίνου ουροδόχου κύστης στο συνολικό αριθμό των ασθενών (όπως καταδεικνύεται από τον οφειλόμενο κίνδυνο πληθυσμού), γεγονός που εξηγείται από από τη χαμηλή συχνότητα των δύο αυτών γονοτύπων γενικά. (πίνακας 2). Αν και μία μελέτη βασισμένη στο σύνολο του πληθυσμού θα μπορούσε να προσδώσει ακριβέστερες εκτιμήσεις του λόγου αναλογιών (odds ratios) των συγκεκριμένων γονοτύπων, οι υψηλοί οφειλόμενοι κίνδυνοι αυτών των μειονεκτικών γονοτύπων καταδεικνύουν ότι ενοχοποιούνται για καρκίνο ουροδόχου κύστης¹⁶⁸.

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης χαρακτηρίζεται από μεγάλες διαφορές στη συμπεριφορά, καταδεικνύοντας μία ετερογενή διαταραχή από άποψη μορφολογίας; (όγκοι χαμηλού βαθμού κακοήθειας έναντι υψηλού βαθμού κακοήθειας), αριθμού όγκων κατά τη διάγνωση (μονήρης έναντι πολλαπλών), σταδίου (επιπολείς έναντι διηθητικών) και πρόγνωσης (υποτροπής, εξέλιξης και συχνότητων επιβίωσης)^{152,153,154}. Παρά την ετερο-γένεια της νόσου, όμως, ο βαθμός κακοήθειας και το στάδιο του όγκου θεωρούνται ως οι βασικότεροι προγνωστικοί παράγοντες στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης^{154,169}. Στην προσπάθεια να διαπιστώσουμε κατά πόσο η ύπαρξη των γονοτύπων που ευθύνονται για την αργή ακετυλίωση μπορεί να σχετίζεται με υψηλότερο κακόηθες δυναμικό της νόσου, συσχέτισαμε, επομένως, τις συχνότητες των γονοτύπων αυτών στους ασθενείς με το στάδιο και το βαθμό κακοήθειας της νόσου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, ο γονότυπος 341C/ 341C δεν εμπλέκεται απλώς στην καρκινογένεση στην ουροδόχο κύστη, αλλά, επίσης, φαίνεται να είναι υπεύθυνος για όγκους υψηλότερου βαθμού κακοήθειας (Πίνακας 6). Η ύπαρξη αυτού του γονοτύπου σε μία νεοδιαγνωσμένη περίπτωση αποτελεί, επομένως, πιθανή ένδειξη φτωχής πρόγνωσης.

Επιπρόσθετα, εφόσον η μεγάλη πλειονότητα των καρκινωμάτων του μεταβατικού επιθηλίου (70-80%) τείνουν να παρουσιάζονται ως επιφανειακοί όγκοι^{153,169}, η ύπαρξη διηθητικής νόσου στους μισούς ασθενείς που είναι φορείς του γονοτύπου 341C/ 341C, αν και δεν είναι στατιστικά σημαντική στη μελέτη αυτή, πιθανόν ενισχύει περαιτέρω το εύρημά μας αναφορικά με την επιθετικότητα της νόσου στους φορείς του γονοτύπου αυτού (πίνακας 7). Περαιτέρω ενίσχυση της υπόθεσης αυτής παρέχεται από μία μελέτη στην οποία διαπιστώθηκε συσχέτιση των μεταλλάξεων της

αργής ακετυλίωσης με την απώλεια έκφρασης του p53 γονιδίου¹⁷⁰. Καθώς παρόμοιες μεταλλάξεις στη θέση 17q13 σχετίζονται ευθέως με εξέλιξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστης σε διηθητικότερη νόσο^{154,171} είναι πολύ πιθανό, στην περίπτωση μεγαλύτερου δείγματος, να διαπιστω-νόταν μία παρόμοια στατιστικά σημαντική συσχέτιση και στη μελέτη μας.

Είναι λογικό να υποθέσουμε ότι και άλλοι πολυμορφισμοί ενζύμων που εμπλέκονται στην αποτοξίκωση των ουροθηλιακών καρκινογόνων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξατομικευμένη ευπάθεια για καρκίνο ουροδόχου κύστης.¹⁶⁰ Ένα παρά-δειγμα παρόμοιου πολυμορφικού ενζύμου αποτελεί η τρανσφεράση της γλουταθειό-νης^{160,172,173}, ο ρόλος της οποίας εξετάσθηκε και στο δείγμα της μελέτης αυτής με σημαντικά αποτελέσματα, που μάλιστα καταδεικνύουν ότι η ελλειμματική έκφραση του ισοενζύμου M1 της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης αποτελεί ακόμη ισχυρότερο παράγοντα κινδύνου νόσησης από καρκίνο ουροδόχου κύστης από την αργή ακετυλίωση σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό^{174,175}. Δεν αποκλείεται μάλιστα η συνδυασμένη ανάλυση δύο ή και περισσότερων γονιδιακών θέσεων, που κωδικοποιούν ισάριθμα ένζυμα, τα οποία εμπλέκονται στην αποτοξίκωση των ξеноβιοτικών χημικών καρκινογόνων, να καταδείξει ότι, τελικά, αυτό που γενικά ορίζεται ως γενετική ευπάθεια στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης δεν είναι τίποτα άλλο, παρά αποτέλεσμα της συνδυασμένης ελαττωματικής έκφρασης μίας σειράς πολυμορφικών ενζύμων σε συγκεκριμένα άτομα.

Η εφαρμογή νέων τεχνικών PCR, μεγάλης ταχύτητας και εξαιρετικής ακρίβειας, θα επιτρέψει μελλοντικά την εξέταση δειγμάτων από μεγάλο αριθμό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστης και τον ακριβή καθορισμό των χαμηλής συχνότητας γονοτύπων, που είτε παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά επίπτωσης στους ασθενείς είτε, επί απουσίας στατιστικά σημαντικών ευρημάτων, είναι εμφανώς επικρατέστεροι στους ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Ενώ, δηλαδή, έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες αναφορικά με τους γονότυπους που ευθύνονται για την αργή ακετυλίωση (συσχέτιση γονοτύπων-φαινοτύπων), υπάρχει σημαντική έλλειψη μελετών που διερευνούν τη μοριακή βάση της αργής ακετυλίωσης από μία άλλη θεώρηση, δηλαδή σχετίζοντας γονοτύπους με το αποτέλεσμα-νόσο, που αυτοί οι γονότυποι θεωρητικά προκάλεσαν. Είναι σαφές ότι παρόμοιες μελέτες θα βοηθήσουν ακόμη περισσότερο στην κατανόηση του μηχανισμού της αργής ακετυλίωσης και του τρόπου που ο πολυμορφισμός στη λειτουργική έκφραση της N-ακετυλτρανσφεράσης συμβάλλει στην εξατομικευμένη ευπάθεια για συγκεκριμένα νοσήματα, όπως ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης.

Εξαιρετικού ενδιαφέροντος θα μπορούσε, ενδεχομένως, να είναι μία μελέτη των ασθενών με τους γονοτύπους υψηλού κινδύνου, αναφορικά με το ρυθμό υποτροπής της νόσου ή/και την εξέλιξη της σε κακοηθέστερη νόσο, μετά τη θεραπευτική παρέμβαση (χειρουργική αντιμετώπιση, ακτινοβολία, ενδοκυστική ή συστηματική χορήγηση χημειο-θεραπευτικών ή ανοσοθεραπευτικών σκευασμάτων). Με τον τρόπο αυτό, θα μπορούσε να διαπιστωθεί κατά πόσο οι συγκεκριμένοι γονότυποι που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου ουροδόχου κύστης (341C/ 341C και 341C/857A) ή αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου με υψηλό βαθμό κακοήθειας (341C/ 341C) στην αρχική διάγνωση, ενέχονται, στον ίδιο βαθμό, και για κακοηθέστερη (επιθετικότερη) πορεία της νόσου, μετά από την αρχική αντιμετώπισή της.



8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Οι επικρατέστερες μεταλλάξεις του γονιδίου NAT-2 στον Ελληνικό πληθυσμό φαίνεται ότι παρουσιάζονται στην ίδια συχνότητα με αυτή που έχει καταγραφεί σε άλλους Καυκάσιους. Το εύρημα αυτό δείχνει ότι οι Ευρωπαϊκοί πληθυσμοί σχετίζονται γενετικά, καθώς, σε ότι αφορά την αργή ακετυλίωση, παρουσιάζουν τις ίδιες μεταλλάξεις, σε παρόμοια συχνότητα.

2. Η άποψη ότι ο γενετικά ρυθμιζόμενος πολυμορφισμός των ενζύμων, που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των χημικών καρκινογόνων, έχει άμεση επίδραση στην εξατομικευμένη προδιάθεση για καρκίνο της ουροδόχου κύστης επιβεβαιώνεται με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, καθώς οι γρήγοροι ακετυλιωτές αποδεικνύονται προνομιούχος ομάδα πληθυσμού, με χαμηλό κίνδυνο καρκινογένεσης στην ουροδόχο κύστη.

3. Μεταξύ των αργών ακετυλιωτών, οι φορείς των γονοτύπων 341C/ 341C και 341C/ 857A έχουν εκτεταμένο κίνδυνο για καρκίνο ουροδόχου κύστης, ανεξάρτητα από τον τύπο έκθεσης στις αρυλαμίνες.

4. Οι φορείς του γονοτύπου 341C/ 341C φαίνεται να είναι περισσότερο ευπαθείς σε επιθετικότερη νόσο στην αρχική διάγνωση, όπως καταδεικνύεται από το βαθμό κακοήθειας. Αντίθετα, δεν καταδείχθηκε συσχέτιση του γονοτύπου αυτού με το στάδιο της νόσου.

5. Είναι πολύ πιθανό οι διαφορές επίπτωσης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, που παρατηρούνται σε πληθυσμούς διαφορετικής φυλετικής προέλευσης, με ίδιο βαθμό έκθεσης στα χημικά καρκινογόνα του ουροθηλίου, με τους Καυκάσιους να υπερτερούν των Αφρικανών και των Ασιατών, να οφείλεται, εν μέρει, στη διαφορετική συχνότητα των μεταλλάξεων που προκαλούν αργή ακετυλίωση στους πληθυσμούς αυτούς. Η υπόθεση αυτή, σε συνδυασμό με τη δεδομένη ύπαρξη και άλλων πολυμορφικών ενζύμων, που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των καρκινογόνων του ουροθηλίου, καθιστούν αναγκαία την πραγματοποίηση και άλλων παρόμοιων μελετών, σε πληθυσμούς διαφορετικής φυλετικής προέλευσης, και τη διερεύνηση του ρόλου περισσότερων πολυμορφικών ενζύμων στην ευπάθεια για καρκινογένεση του ουροθηλίου.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η έκθεση στις αρυλαμίνες είναι, εδώ και καιρό, ένας γνωστός παράγοντας κινδύνου στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Όπως καταδεικνύεται από εκτεταμένες επιδημιολογικές μελέτες, οι καπνιστές και συγκεκριμένες επαγγελματικές ομάδες, όπως οι εργάτες που έρχονται σε επαφή με χρωστικές ουσίες, περιλαμβάνονται μεταξύ αυτών που θεωρούνται ως ομάδες υψηλού κινδύνου για νόσηση από καρκίνο ουροδόχου κύστης. Η N-ακετυλίωση των αρυλαμινών, αντίδραση που διεκπεραιώνεται από το ένζυμο N-ακετυλτρανσφεράση, θεωρείται ένα μείζον βήμα αποτοξίκωσης των καρκινογόνων των αρυλαμινών στους ανθρώπους. Η N-ακετυλτρανσφεράση εκφράζεται λειτουργικά από δύο πολυμορφικά ισοένζυμα: το NAT-1 και το NAT-2. Αν και ο πολυμορφισμός του NAT-2 έχει μελετηθεί εκτεταμένα, η σημασία του NAT-1 παραμένει υπό διερεύνηση. Ο πολυμορφισμός του NAT-2 εκφράζεται με τη μορφή του αργού ακετυλιωτικού φαινότυπου σε 50% των Καυκασίων και η πλειονότητα των αργών ακετυλιωτικών αλληλομόρφων σχετίζεται με τρεις σημειακές μεταλλάξεις: 590A, 341C και 857A του γονιδίου NAT-2 στο χρωμόσωμα 8 (και οι τρεις μεταλλάξεις θεωρούνται ως υπεύθυνες για τον αργό ακετυλιωτικό φαινότυπο σε περισσότερο από 95% των Καυκασίων αργών ακετυλιωτών).

Στόχος της μελέτης αυτής ήταν να εξεταστεί το ενδεχόμενο ύπαρξης συγκεκριμένων γονότυπων της αργής N-ακετυλίωσης (ανεξάρτητα από την πηγή και τον τύπο έκθεσης στα καρκινογόνα των αρυλαμινών) με μεγαλύτερο κίνδυνο για καρκίνο ουροδόχου κύστης. Επίσης, διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένων γονοτύπων με περισσότερο επιθετική νόσο στην αρχική διάγνωση από άποψη βαθμίου (grade) και σταδίου (stage) της νόσου, στην αρχική της εμφάνιση.

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 89 ασθενείς με νεοδιαγνωσμένο καρκίνο μεταβατικού επιθηλίου ουροδόχου κύστης (75 άνδρες και 14 γυναίκες, με εύρος ηλικίας 35 ως 97 έτη και μέση ηλικία 66 έτη), οι οποίοι νοσηλεύθηκαν στην Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μεταξύ Αυγούστου 1996 και Μαΐου 1998. Οι μάρτυρες (147) ήταν άτομα που παρουσιάζαν διάφορα ουρολογικά προβλήματα, όχι όμως ενεργό ή θεραπευθείσα κακοήθεια του ουροποιητικού και προσήλθαν για αντιμετώπιση των προβλημάτων τους στην ίδια Κλινική, κατά την ίδια περίοδο. Αμφότερες οι ομάδες προέρχονταν από ένα αγροτικό, κατά βάση, πληθυσμό της Βορειοδυτικής Ελλάδος. Οι μάρτυρες επιλέχθηκαν έτσι, ώστε να έχουν παρόμοια ηλικία, καπνιστικές συνήθειες και αναλογία ανδρών/ γυναικών με τους ασθενείς.

Οι γονότυποι NAT-2 ανιχνεύθηκαν με ειδική για τους συγκεκριμένους αλληλομόρφους αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), σε δείγματα DNA από το περιφερικό αίμα.

Οι συχνότητες των γονοτύπων συγκρίθηκαν μεταξύ ασθενών και μαρτύρων με τη δοκιμασία χ^2 . Με τον ίδιο τρόπο εκτιμήθηκε στατιστικά η συχνότητα του βαθμού κακοήθειας και του σταδίου της νόσου στους ασθενείς-φορείς των διαφόρων γονοτύπων. Για κάθε γονότυπο, που βρέθηκε να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και μαρτύρων, υπολογίστηκε ο οφειλόμενος κίνδυνος και ο οφειλόμενος κίνδυνος πληθυσμού του γονοτύπου αυτού (attributable και population attributable risks, αντίστοιχα).

Η συχνότητα των γρήγορων ακετυλιωτών μεταξύ των μαρτύρων ήταν υψηλότερη από τους ασθενείς ($p = 0.0016$). Ο λόγος αναλογιών (odds ratio) των γρήγορων ακετυλιωτών για καρκινογένεση στην ουροδόχο κύστη υπολογίσθηκε στο 0.25.

Μεταξύ των διαφόρων γονοτύπων της αργής ακετυλίωσης, δύο γονότυποι πα-

ρουσίαζαν στατιστικά υψηλότερη επίπτωση στους ασθενείς: ο 341C/ 341C και ο 341C/ 857A.

Οι ομοζυγώτες 341C/ 341C ήταν εμφανώς πιο συχνοί μεταξύ των ασθενών ($p = 0.0041$), παρουσιάζοντας ένα λόγο αναλογιών (odds ratio) 3.73 για καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Ο οφειλόμενος κίνδυνος (attributable risk) αυτού του γονοτύπου ήταν 0.73, ενώ ο οφειλόμενος κίνδυνος του πληθυσμού (population attributable risk) ήταν 0.115.

Οι ετεροζυγώτες 341C/ 857A ήταν στατιστικά επικρατέστεροι στην ομάδα των ασθενών ($p = 0.0031$). Αυτός ο ελαττωματικός γονότυπος έφερε ένα εξαιρετικά υψηλό λόγο αναλογιών (odds ratio), υπολογιζόμενο σε 12.46, για καρκινογένεση στην ουροδόχο κύστη, με οφειλόμενο κίνδυνο 0.92. Ο οφειλόμενος κίνδυνος πληθυσμού του γονοτύπου αυτού ήταν 0.072.

Η συσχέτιση των γονοτύπων με το βαθμό κακοήθειας, στην αρχική διάγνωση της νόσου, κατέδειξε ότι ο 341C/ 341C γονότυπος μπορεί, επίσης, να σχετίζεται με περισσότερο επιθετική νόσο, καθώς η δοκιμασία χ^2 αυτού του γονοτύπου έδωσε ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p < 0.05$), ενώ όλοι οι άλλοι γονότυποι δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική σχέση είτε με υψηλής κακοήθειας καρκίνο ουροδόχου κύστης είτε με χαμηλού βαθμού κακοήθειας όγκους.

Καμμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε στη συσχέτιση των διαφορετικών γονοτύπων NAT-2 μεταξύ των ασθενών και του τοπικού σταδίου διήθησης, είτε πριν είτε μετά την ομαδοποίηση των διαφόρων σταδίων σε επιφανειακή και διηθητική νόσο. Παρολαυτά, οι μισοί ασθενείς με το γονότυπο 341C/ 341C παρουσίαζαν διηθητική νόσο στην αρχική διάγνωση και το εύρημα αυτό φαίνεται πως ενισχύει την παρατήρησή μας σχετικά με την τάση των φορέων του γονοτύπου 341C/ 341C να παρουσιάζουν επιθετικότερη νόσο.

Συμπερασματικά, οι αργοί ακετυλιωτές με γονότυπους 341C/341C και 341C/ 857A έχουν σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο να νοσήσουν από καρκίνο ουροδόχου κύστης. Μεταξύ των αργών ακετυλιωτών, οι φορείς του 341C/ 341C γονοτύπου έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να παρουσιάσουν, ήδη από την αρχική διάγνωση, καρκίνο ουροδόχου κύστης υψηλού βαθμού κακοήθειας και, επομένως, αποτελούν ομάδα φτωχής πρόγνωσης.



SUMMARY

Genetic analysis of arylamino-N-acetyl transferase in bladder cancer

I. Filiadis

Exposure to arylamines is a well recognized risk factor in chemically induced bladder cancer. As extensive epidemiological data suggest, smokers and certain occupations, such as dyestuff, are included among those with increased risk for bladder carcinogenesis. The N-acetylation of arylamines, a process carried out by the enzyme N-acetyltransferase, is considered to be a major detoxification step of the arylamine carcinogens in humans. N-acetyltransferase is functionally expressed by two polymorphic isoenzymes: NAT-1 and NAT-2. Although NAT-2 polymorphism has been extensively studied, the importance of NAT-1 remains to be established. NAT-2 polymorphism affects about 50% of Caucasians and the majority of their slow acetylation alleles are associated with three point mutations: 590A, 341C and 857A of the NAT-2 gene on chromosome 8 (all three mutations accounting for the slow acetylating phenotype in more than 95% of Caucasian slow acetylators).

In this study we investigated whether specific genotypes among the slow acetylators, regardless of the source of exposure to arylamine carcinogens, should be considered as risk factors for bladder cancer, and whether specific genotypes are associated with more aggressive disease in terms of tumor grading (G) and local staging (T), at initial diagnosis.

This case-control study included 89 newly diagnosed patients with transitional cell bladder cancer (75 men and 14 women, with age range 35- 97 years and mean age 66 years) diagnosed in the Urologic Department of the Ioannina University Hospital between August 1996 and May 1998. The controls (147) enrolled in the study suffered from nonmalignant urological complaints and were hospitalized in the same clinic during the same period. Both patients and controls originated from a rural population of Northwestern Greece and had similar mean age, smoking habits and male to female ratio.

N-acetyltransferase-2 (NAT2) genotypes were identified by allele specific polymerase chain reaction (PCK) on peripheral blood DNA samples.

The χ^2 test was used for statistical evaluation to compare the differences observed between patients and controls and the different genotypes with tumor grading and local staging at presentation.

Relative, attributable and population attributable risks were estimated for the genotypes found to present a significantly increased frequency for bladder cancer.

Fast acetylators were obviously a privileged group in terms of lower risk for bladder cancer ($p=0.0016$), carrying an odds ratio 0.25 for bladder carcinogenesis.

Among slow acetylators, homozygotes 341C/341C and compound heterozygotes 341C/857A had the most excessive risk for bladder cancer.

Homozygotes 341C/ 341C had an odds ratio 3.73 for bladder cancer ($p=0.0041$). The attributable and the population attributable risk of this genotype estimated at 0.73 and 0.115, respectively.

The carriers of the 341C/ 857A genotype had an extremely high odds ratio estimated at 12.46 for bladder cancer ($p=0.0031$). The attributable and the population attributable risk of this genotype were estimated at 0.92 and 0.072, respectively.

The 341C/341C genotype was found to be associated with more aggressive disease, in terms of tumor grading at presentation ($p<0.05$) whereas no association was

detected between the other genotypes and the grade of the disease.

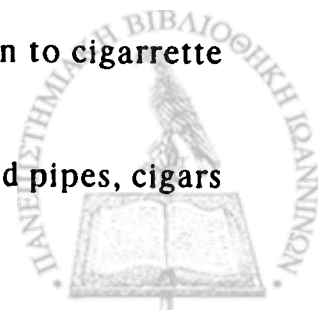
No statistically significant difference was observed in the correlation of the different NAT-2 genotypes among patients and the local stage of the disease. However, the existence of muscle invasive disease in half the patients who carry the 341C/341C genotype, although not statistically significant in this study, may possibly reinforces our observation regarding the aggressiveness of the disease in the carriers of this genotype.

In conclusion, slow acetylators with 341C/341C and 341C/857A genotypes carry a substantially higher odds ratio for bladder carcinogenesis and, among the slow acetylators, 341C/341C homozygotes are likely to have a higher risk for more aggressive disease at presentation, and thus, a poorer prognosis.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Silverman DT, Hartge P, Morisson AS, Devesa SS. (1992) Epidemiology of bladder cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 6: 1-30.
2. World Cancer Research Fund & American Institute for Cancer Research. (1997). Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a global perspective. 4 : 338-361.
3. Theodorăscu D. (1996). Commentary on genetic prognostic markers for transitional cell carcinoma of the bladder : From microscopes to molecules. *J. Urol.* 155: 2.
4. Rehn L. (1895) Blasengeschwuelste bei Fuchsin- Arbeitern. *Arch. Klin. Chir.* 50: 588-600.
5. Parkes H. G ., Evans A.E.J. (1984) Epidemiology of aromatic amine cancers. In: Searle C.E., ed. *Chemical Carcinogenesis*, Washington: American Chemical Society Monographs. 2nd ed, pp.277-301.
6. Perera FP. (1997) Environment and cancer: who are susceptible? *Science.* 278: 1068- 1073.
7. Clavel. J., Cordier, S., Boccon- Gibod L. (1989) Tobacco and bladder cancer in males: increased risk for inhalers and smokers of black tobacco. *Int.J. Cancer.* 44: 605- 611.
8. Miller AB. (1977) The etiology of bladder cancer from the epidemiological viewpoint. *Cancer Res.* 37: 2939- 2942.
9. Howe, G.R., Burch, J.D., Miller, A.B. (1980) Tobacco use, occupation, coffee, various nutrients, and bladder cancer. *J.N.C.I.* 64:701- 712.
10. Burch, J.D., Rohan, T.E., Howe, G.R. (1989) Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: A case- control study. *Int. J. Cancer.* 44: 622- 627.
11. Morrison, A.S., Buring, J.E., Verhock, W.G. (1984) An international study of smoking and bladder cancer. *J.Urol.* 131:650-659.
12. Hoffman, D. and Wynder, E.L. (1986) Chemical constituents and bioactivity of tobacco smoke. In: Zaridze, D.G., Peto, R. (eds) *Tobacco: A Major International Health Hazard*. IARC scientific publications no. 74, Lyon, pp. 145-165.
13. Salminen, E., Pukkala, E., and Teppo, L. (1994) Bladder cancer and the risk of smoking - related cancers during followup. *J. Urol.* 152: 1420-1423.
14. Augustine A., Hebert JR., Kabat GC. (1988) Bladder cancer in relation to cigarette smoking. *Cancer Res.* 48: 4405- 4410.
15. Harge, P., Hoover, R., and Kantor, A. (1985) Bladder cancer risks and pipes, cigars and smokeless tobacco. *Cancer.* 55:901-907.

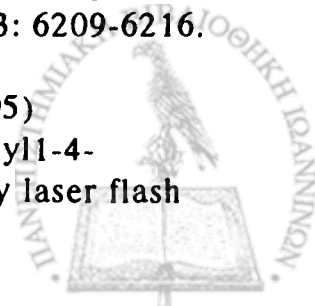


16. Wallace, D.M.A. (1988) Occupational Urothelial Cancer. *Br. J. Urol.* 61: 175-182.
17. Malker, H.S., McLaughlin, J.K., Silverman, D.T. (1987) Occupational risks for bladder cancer among men in Sweden. *Cancer Res.* 47: 6763- 6769.
18. Morrison, A.S. (1984) Advances in the etiology of urothelial cancer. *Urol. Clin. North Am.* 11: 557-578.
19. Silverman, D.T., Levin, L.I., Hoover, R.N. (1989) Occupational risks of bladder cancer in the United States: I. White men. *J.N.C.I.* 81:1472-1479.
20. Silverman, D.T., Levin, L.I., and Hoover, R.N. (1989). Occupational risks of bladder cancer in the United States: II. Nonwhite men. *J.N.C.I.* 81: 1480- 1487.
21. Viel, J-F and Challier, B. (1995) Bladder Cancer Among French Farmers: Does exposure to Pesticides in Vineyards Play a Part?. *Occup. Environ. Med.* 52: 587- 592.
22. The British Association Of Urological Surgeons (BAUS) Subcommittee on Industrial Bladder Cancer.(1988) Occupational Bladder Cancer: a guide for clinicians. *Br. J. Urol* 61: 183-191.
23. Lower, G.M. (1982) Concepts in causality: Chemically induced human urinary bladder cancer. *Cancer.* 49:1056-1066.
24. Case, R.A.M., Hosker, M.E., McDonald, D.B., Pearson, J.T. (1954) Tumors of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. Role of aniline, benzidine, alpha-naphtylamine, and beta- naphtylamine. *Br. J. Indust. Med.* 11:75-104.
25. Boffetta, P., Kogevinas, M., Westerholm, P., Saracci, R. (1997) Exposure to occupational carcinogens and social class differences in cancer occurrence. *I.A.R.C. Sci. Publ.* 138: 331-41.
26. Hald T. and Horn T. (1998) The human urinary bladder in ageing. *Br. J. Urol.* 82: (Suppl.1) 59-64.
27. Kantor, A.F., Hartge, P., Hoover, R.N., Fraumeni, Jr, J. F. (1985) Familial and environmental interactions in bladder cancer risk. *Int. J. Cancer.* 35: 703-706.
28. Kramer, A.A, Graham, S., Burnett, W.S., Nasca, P. (1991). Familial aggregation of bladder cancer stratified by smoking status. *Epidemiology* 2: 145-148.
29. Lynch, H.T., Fusaro, R.M., Roberts, L., Voorhees, G.J., Lynch, J.F. (1985) Muir-Torre syndrome in several members of a family with a variant of the cancer family syndrome. *Br. J. Dermatol.* 113: 295- 301.
30. Miller EC, Miller JA. The metabolism of chemical carcinogenesis to reactive electrophiles and their possible mechanism of action in carcinogenesis. In Searle CE (ed): *Chemical Carcinogens*. Washington, DC, American Chemical Society, 1976, pp 732-750.

31. Tennant, R., Wigley, C., and Balmain, A. (1997) Chemical carcinogenesis. In: Franks, L.M., Teich, N.M. (eds). *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Oxford University Press. 3rd Edition. Chapter 6. pp106-129.
32. Garner, R.C., Martin, C.N., and Clayson, D.B. (1984). *Chemical Carcinogens*, American Chemical Society Monograph No. 182. Washington DC. In: Searle, CE., ed. 2nd Ed. Vol. 1, pp 175-276.
33. Parkes, H.G. (1976) The epidemiology of the aromatic amine cancers. In Searle CE (ed). *Chemical Carcinogens*, Washington : Am. Chem. Soc. Mono. 173: 462-480.
34. Cole, P., and Merletti, F. (1983). Occupational cancer. In: G.J. Bourke (ed.), *The epidemiology of cancer*, Charles Press, Philadelphia, pp. 260-291.
35. Steenland, K., Burnett, C., and Osorio, A.M. (1987) A case- control study of bladder cancer using city directories as a source of occupational data. *Amer. J. Epidemiol.* 126: 247-257.
36. Weisburger, J.H., and Weisburger, E.K. (1963) Pharmacodynamics of carcinogenic azo dyes, aromatic amines, and nitrosamines. *Clin. Pharmacol. Ther.* 4: 110-124.
37. Miller, E.C., Miller, J.A. (1952) In vivo combinations between carcinogens and tissue constituents and their possible role in carcinogenesis. *Cancer. Res.* 12: 547- 556.
38. Walpole, A.L., Williams, M.H.C., Roberts, D.C. (1954) Tumours of the urinary bladder in dogs after ingestion of 4-aminobiphenyl. *Br. J. Indust. Med.* 11:105-109.
39. Melick, W.F., Escue, H.M., Naryka, J.J., Mezera, R.A., Wheeler, E.P. (1955) The first reported cases of human bladder tumours due to a new carcinogen-xenylamine. *J. Urol.* 74: 760-766.
40. Stula, E.F., Barnes, J.R., Sherman, H., Reinhardt, C.F., Zapp, Jr. J.A. (1977) Urinary bladder tumors in dogs from 4,4'- methylene-bis (2-chloroaniline) (MOCA). *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 1: 31-50.
41. Ames, B.N., Kammen, H.O., Yamasaki, E. (1975) Hair dyes are mutagenic. Identification of a variety of mutagenic ingredients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 2423-2427.
42. Boffetta, P., Jourenkova, N., Gustavsson, P. (1997) Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer. Causes. Control.* 8: 444-472.
43. Steinbeck, G., Plato, N., Norell, S.E. (1990) Urothelial Cancer and some industry-related chemicals: An evaluation of the epidemiologic literature. *Am. J. Ind. Med.* 17: 371-384.
44. Viscoli, M.C., Lachs, M., Horwitz, R. (1993) Bladder cancer and coffee drinking:a summary of case-control research. *Lancet*, 341:1432-1437.

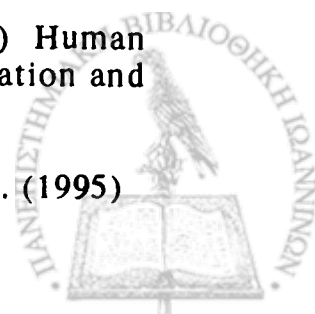
45. Hoover, R.N., Strasser, P.H. (1980) Artificial sweeteners and human bladder cancer. *Lancet*. 47: 837-840.
46. Ciccone G., Vineis P. (1988) Coffee drinking and bladder cancer. *Cancer. Lett.* 41:45.
47. Garner, R.C., Mould, A.J., Lindsay-Smith, V., Cartwright, R.A., Richards, B.: (1982) Mutagenic urine from bladder cancer patients. *Lancet*. 49: 389-393.
48. De Ridder, D., van Poppel, H., Demonty, L., D'Hooghe, B., Gonsette, R., Carton, H., Baert, L. (1998) Bladder cancer in patients with multiple sclerosis treated with cyclophosphamide. *J. Urol.* 159: 1881-1884.
49. Steffens J., and Nagel, R. (1988) Tumours of the renal pelvis and ureter: Observations in 170 patients. *Br. J. Urol.* 61:277-284.
50. Filiadis, I.F., Georgiou, I.A., and Giannakopoulos, X. (1998). Urinary bladder cancer in a girl with slow-acetylator genotype and treated with sulfasalazine *Br. J. Urol.* 81: 342-343.
51. Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J. (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA. Cell. Biol.* 12:1-51.
52. Raunio, H., Husgafvel-Pursiainen, K., Anttila, S., Hietanen, E., Hirvonen, A. & Pelkonen, O. (1995) Diagnosis of polymorphisms in carcinoma-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility -- a review. *Gene*. 159: 113-121.
53. Daly, A.K., Cholerton, S., Armstrong, M., and Idlie, J.R. (1994) Genotype for polymorphisms in xenodiotic metabolism as a predictor of disease susceptibility. *Environ Health Perspect.* 102: 55-61.
54. Weber, W.W., and Glowinski, I.B. (1980) Acetylation. In W.B. Jakoby (ed) Academic Press, New York. *Enzymatic Mechanism of Detoxication*, Vol. II, pp. 169-196.
55. Riddle, B., and Jencks, W.P. (1971) Acetyl-coenzyme A: Arylamine N-acetyltransferase. Role of the acetyl-enzyme intermediate and the effects of substituents on the rate. *J. Biol. Chem.* 246: 3250-3258,
56. Jenks, W.P., Gresser, M., Valenzuela, M.S., and Huneus, F.C.: (1972) Acetyl coenzyme A: Arylamine acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 247: 3756-3769.
57. Webber, W.W. Acetylation of drugs. (1973) In W.H. Fishman (ed). Academic Press, New York. *Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis*, Vol. 3, pp. 249-296.
58. Weber, W.W., and Cohen, S.N. (1967) N-acetylation of drugs: isolation and properties of n-acetyltransferase from rabbit liver. *Mol. Pharmacol.* 3: 266-273.

59. Reece, P.A. (1981) Hydralazine and related compounds: Chemistry, metabolism, and mode of action. *Med. Res. Rev.* 1: 73-96.
60. Cleland, W.W. (1963). The kinetics of enzyme- catalyzed reactions with two or more substrates or products. *Biochem. Biophys. Acta.* 67: 104-137.
61. Weber, W.W., and Hein, D.W. (1985) N-acetylation Pharmacogenetics. *Pharmacological Reviews*, 37: 25-79.
62. Radomski, J.L., Brill, E. (1970) Bladder cancer induction by aromatic amines: role of N- Hydroxy metabolites. *Science.* 167: 992-993.
63. Lower, Jr. G.M., Bryan, G.T. (1973) Enzymatic N- acetylation of carcinogenic aromatic amines by liver cytosol of species displaying different organ susceptibilities. *Biochem. Pharmacol.* 22: 1581-1588.
64. Cramer, J.W., Miller, J.A., Miller, E.C. (1960) N- hydroxylation: a new metabolic reaction observed in the rat with the carcinogen 2- acetyl-aminofluorene. *J. Biol. Chem.* 235: 885-888.
65. Miller, E.C., Miller, J.A., Enomoto, M. (1964) The comparative carcinogenicities of 2- acetaminofluorene and its N- hydroxy metabolite in mice, hamster, and guinea pigs. *Cancer. Res.* 24: 2018-2031.
66. Burchell, B., Coughtrie, M.W.H. (1989) UDP-glucuronosultransferases. *Pharmacol. Ther.* 43: 261-289.
67. Miners, J.O., Mackenzie, P.I. (1991) Drug glucuronidation in humans. *Pharmacol. Ther.* 51: 347-369.
68. Mulder, G.J. (1992) Glucuronidation and its role in regulation of biological activity of drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:25-49.
69. Gherzi-Egea, J.F., Perrin, R., Leininger- Muller, B. (1993) Subcellular localisation of cytochrome P450 and activities of several enzymes responsible for drug metabolism in the human brain. *Biochem. Pharmacol.* 45: 647-658.
70. Beland, F.A., Allaben W.T., Evans F.E. (1980). Acyltransferase - mediated Binding of N-Hydroxyarylamides to Nucleic Acids. *Cancer Res.* 40: 834-840.
71. King, C.M., and Phillips, B. (1969) N- Hydroxy-2-fluorenylacetamide: Reaction of the carcinogen with guanosine, ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and protein following enzymatic deacetylation or esterification. *J. Biol. Chem.* 233: 6209-6216.
72. Robbins, J.R., Yang, L.-N. L., Anderson, B.G., and Falvey, E.D.: (1995) Photogenerated arylnitrenium ions: Reactions of N-tert-Butyl (2-Acetyl-4-substituted) phenyl Nitrenium Ions with alcohols and water studied by laser flash photolysis. *J. Am. Chem. Soc.* 117:6544-6552.



73. Kadlubar, F.F., Miller, J.A., Miller, E.C. (1978) Guanyl O6- arylamination and O6-arylation of DNA by the carcinogen N- hydroxy-1- naphtylamine. *Cancer Res.* 38: 3628- 3638.
74. King, C.M., Olive, C.W. (1968) Enzyme- catalyzed reactions of the carcinogen H- hydroxy- 2- fluorenylacetamide with nucleic acid. *Science* 159: 1351-1353.
75. Rothman, N., Talaska, G., Hayes, R.B., Bhatnagar, V.K., Bell, D.A., Lakshmi, V.M., Kashyap, S.K., Dosemeci, M., Kashyap, R., Hsu, F.F., Jaeger, M., Hirvonen, A., Parikh, D.J., Davis, B.B., Zenser, T.V. (1997) Acidic urine pH is associated with elevated levels of free urinary benzidine and N- acetylbenzidine and urothelial cell DNA adducts in exposed workers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6: 1039-1042.
76. Bonicke, R., Reif, W. (1953) Enzymatic inactivation of isonicotinic acid hydrazide in humans and animals. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 220: 321-333.
77. Glowinski, I.B., Radtke, H.E., and Weber, W.W. (1978) Genetic variation N- acetylation of carcinogenic arylamines by human and rabbit liver. *Mol. Pharmacol.* 14: 940-949.
78. Perry, H.M. (1973) Late toxicity to hydralazine resembling systemic lupus erythematosus or rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.* 54: 58-72.
79. Rubin, R.L. (1989). Autoimmune reactions induced by procainamide and hydralazine. In: Kammuller ME, Bloksma N and Seinen W. (eds). Elsevier, Amsterdam. Autoimmunity and Toxicology pp.119-150.
80. Baty, J.D., Lindsay R.M. and Sharp, S. (1986) Use of High-performance liquid chromatography in the measurement of in vitro acetylation in man. *J. Chromatogr.* 353: 329-337.
81. Kalow, W. (1982) Ethnic difference in drug metabolism. *Clin Pharmacokinet.* 7: 373-400.
82. Mc Queen, C.A., and Weber W.W. (1980) Human lymphocyte N- acetyltransferase and its relationship to the isoniazid acetylation polymorphism. *Biochem. Genet.* 9:1-16.
83. Chapron, D.J., Kramer, P.A., and Mercik, S.A. (1980) Kinetic discrimination of three sulfamethazine acetylation phenotypes. *Clin. Pharmacol. Ther.* 27: 104-113.
84. Lower, G.M., Nilsson, T., Nelson, C.E., Wolf, H., Gamsky, T.E. and Bryan, G.T. (1979) N-acetyltransferase phenotype and risk in urinary bladder cancer: approaches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweden and Denmark. *Environ. Health Persp.* 29: 71-79.
85. Cartwright, R.A., Glasham, R.W., Rogers, H.J., Ahmed, R.A., Hall, D.B., Higgins, E. and Kahn, M.A. (1982) The role of N-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: a pharmaco-genetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet* 49:842-846.

86. Mmmesen, S., Barford, N.M., Aagaard, J. (1985) N-acetyltransferase phenotype in the urinary bladder carcinogenesis of a low risk population. *Carcinogen*. 6:199-201.
87. Miller, M.E., Cosgriff, J.M. (1983) Acetylator phenotype in human bladder cancer. *J. Urol*. 130: 65-70.
88. Horai, Y., Fujita, K., and Ishizaki, T. (1989) Genetically determined N-acetylation and oxidation capacities in Japanese patients with non-occupational urinary bladder cancer. *Eur. J. Clin. Pharmacol*. 37: 581-587.
89. Du Souich, P., Lambert, C. (1981) What is the clinical meaning of the acetylator phenotype? *Trends. Pharm. Sci*. 2: 189-191.
90. Iselius, L., and Evans, D.A.P. (1983). Formal genetics of isoniazid metabolism in man. *Clin. Pharmacokinet*. 8: 541-544.
91. Lima, J.J., and Jusko, W.J.: (1978). Determination of procainamide acetylator status. *Clin. Pharmacol. Ther*. 23: 25-29.
92. Grant, D.M., Beer, M., Blum, M., Meyer, U.A. (1991) Monomorphic and polymorphic human arylamine N-acetyltransferases: a comparison of liver isozymes and expressed products of two cloned genes. *Mol. Pharmacol*. 39: 184 - 191.
93. Jenne, J.W. (1965) Partial purification and properties of the isoniazid transacetylase in human liver. Its relationship to the acetyllation of p-aminosalicyclic acid. *J. Clin. Invest*. 44: 1992-2002.
94. Grant, D.M., Lottspeich, F., Meyer, U.A. (1989) Evidence for two closely related isozymes of arylamine N- acetyl-transferase in human liver. *FEBS. Lett*. 244:203-207.
95. Grand, D.M., Morike, K., Eichelbaum, M., Meyer, U.A. (1990) Acetylation pharmacogenetics. The slow acetylator phenotype is caused by decreased or absent arylamine N-acetyltransferase in human liver. *J. Clin. Invest*. 85:968-972.
96. Andres, H.H., Vogel, R.S., Tarr, G.E., Johnson, L., Weber, W.W. (1987) Purification, physicochemical and kinetic properties of liver acetyl-CoA: arylamine N-acetyl-transferase from rapid acetylator liver. *Mol. Pharmacol*. 31:446-451.
97. Blum, M., Grant, D.M., Demierre, A., Meyer, U.A. (1989) N-acetylation pharmacogenetics: A gene deletion causes absence of arylamine N-acetyltransferase in liver of slow acetylator rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9554 - 9557.
98. Grant, D.M., Blum, M., Demierre, A., Meyer, A. (1989) Nucleotide sequence of an intronless gene for a human arylamine N-acetyltransferase related to polymorphic drug acetylation. *Nucleid Acid Research*. 17: 3978- 3983.
99. Blum, M., Grant, D.M., McBride, W., Heim, M., Meyer, U.A. (1990) Human arylamine N- acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization and functional expression. *DNA Cell Biol*. 9: 193-203.
100. Vatsis, K.P., Weber, W.W., Douglas, A.B., Dupret, J-M., Evans, D.A. (1995) Nomenclature for N-acetyl-transferases. *Pharmacogenetics* 5:1-17.

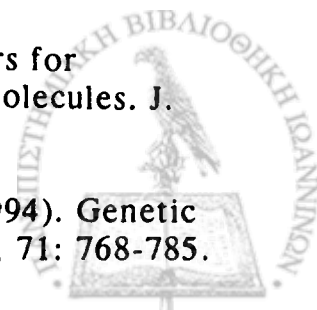


101. Ebisawa, T., Deguchi, T. (1991) Structure and restriction fragment length polymorphism of genes for human liver arylamine N-acetyltransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177: 1252-1257.
102. Hickman, D., Risch, A., Bukle, V., Spurr, K.N., Jeremiah, J.S., McCarthy, A., and Sim, E. (1994) Chromosomal localization of human genes for arylamine N-acetyltransferase. *Biochem. J.* 297:441-445.
103. Cribb, A.E., Nakamura, H., Grand, D.M., Miller, M.A., Spielberg, S.P. (1993) Role of polymorphic and monomorphic human arylamine N-acetyltransferases in determining sulfamethoxazole metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 45:1277-1282.
104. Minchin, R.F. (1995) Acetylation of p-aminobenzoglutarate, a folic acid catabolite, by recombinant human arylamine N-acetyltransferase and U937 cells. *Biochem. J.* 307:1-3.
105. Ward, A., Summer, M.J., Sim, E. (1995) Purification of recombinant human N-acetyltransferase type 1 (NAT1) expressed in *E.coli* and characterization of its potential role in folate metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 49: 1759-1767.
106. Dupret, J.M., Grand, D.M. (1992) Site directed mutagenesis of recombinant human arylamine N-acetyltransferase expressed in *E.coli*: evidence for direct involvement of cys 68 in the catalytic mechanism of polymorphic human NAT2. *J. Biol. Chem.* 267:7381-7385.
107. Watanabe, M., Sofuni, T., Nohmi, T.J. (1992) Involvement of cys69 residue in the catalytic mechanism of N-hydroxylamine O-acetyltransferase of *Salmonella typhimurium*: sequence similarity at the amino acid level suggests a common catalytic mechanism of acetyltransferase for *S. typhimurium* and higher organisms. *J. Biol. Chem.* 267: 8427-8436.
108. Meyer, U.A., Zanger, U.M. (1997) Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 269-296.
109. Hearse, D.J., and Weber, W.W. (1973) Multiple N-acetyltransferase and drug metabolism: tissue distribution, characterization and significance of mammalian N-acetyltransferase. *Biochem. J.* 132: 519-526.
110. Drummod, G.S., Kelker, C., Weber, W.W. (1980). N-acetylation of drug: observations on the properties of partially purified N-acetyltransferase from peripheral blood of rabbit. *Biochem. J.* 187:157-162.
111. Oshako, S., Deguchi, T. (1990). Cloning and expression of cDNAs for polymorphic and monomorphic arylamine N-acetyltransferases from human liver. *J. Biol. Chem.* 265: 4630-4634.
112. Drayer, D.E., Strong, J.M., Jones, B., Sandler, A., Reindenberg, M.M. (1974). In vitro acetylation of drug by human blood cells. *Drug Metab. Dispos.* 2: 499-505.

113. Drummod, G.S., Kelker C., Weber, W.W. (1980) N-acetylation of drug
observations on the properties of partially purified N-acetyltransferase from
perpheral blood of rabbit. *Biochem. J.* 187:157-162.
114. Mandelbaum-Shavit, F., Blondheim, S.H. (1981) Acetylation of p-amnobenzoic
acid by human blood. *Biochem. Pharmacol.* 30: 65-69.
115. Kloth, M.T., Gee, R.L., Messing, E.M., Swaminathan, S. (1994) Expression of N-
ace-tyltransferase (NAT) in culture of human uroepithelial cells. *Carcinogenesis.*
15: 2781-2787.
116. Blum, M., Diemerre, A., Grant, D.M., Heim, M., Meyer, U.A. (1991) Molecular
mechanism of slow acetylation in man. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA* 88:5237-5241.
117. Oshako, S., Deguchi, T. (1990) Cloning and expression of cDNAs for polymorphic
and monomorphic arylamine N-acetyltransferases from human liver. *J. Biol.*
Chem. 265: 4630-4634.
118. Deguchi, T. (1992) Sequences and expression of alleles of polymorphic arylamine
N-acetyltransferase of human liver. *J. Biol. Chem.* 267:18140-18147.
119. Hickman, D., Risch, A., Camilleri, J.P., Sim, E. (1992) Genotyping human
polymorphic arylamine N-acetyl-transferase: identification of new slow allotypic
variants. *Pharmacogenetics.* 2:217-226.
120. Bell, D.A., Taylor, J.A., Butler, M.A., Stephens, E.A., Wiest, J. (1993)
Genotype/phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase
(NAT2) reveals a new slow acetylator allele common in Africans-
Americans. *Carcinogenesis.* 14: 1689-1692.
121. Deguchi, T., Mashimo, M., Suzuki, T. (1990) Correlation between acetylator
phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine N-acetyltransferase in
human liver. *J. Biol. Chem.* 265:12757-12760.
122. Vatsis, K.P., Martel, K.J., Weber, W.W. (1991) Diverse point mutations in the
human gene for polymorphic N-acetyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:
6333-6337.
123. Casorbi, I., Dracoulis, N., Brockmoller, J., Maurer, A., Sperling, K., Roots, I.
(1995) Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage
in unrelated Caucasian individuals: corellation with phenotypic activity. *Am. J.*
Hum. Genet. 57: 581-592.
124. Hein, D.W., Ferguson, R.J., Doll, M.A., Rustan, T.D., Gray, K. (1994) Molecular
genetics of human polymorphic N-acetyltransferase: enzymatic analysis of 15
recombinant wild-type, mutant, and chimeric NAT2 allozymes. *Hum. Mol. Genet.*
3:729-734.
125. Delomenie, C., Sica, L., Grant, D.M., Krishnamoorthy, R., Dupret, J.-M. (1996)
Genotyping of the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2*) gene locus in two
native African populations. *Pharmacogenetics.* 6:177-185.

126. Casorbi, I., Brockmoller, J., Bauer, S., Reum, T., Roots, I. (1996) NAT2*12A (803A-G) codes for rapid arylamine N-acetylation in human. *Pharmacogenetics*. 6: 257-259.
127. Agundez, J.A.G., Olivera, M., Martinez, C., Ladero, J.M., Benitez, G. (1996) Identification and prevalence study of 17 allelic variants of the human NAT2 gene in a white population. *Pharmacogenetics*. 6: 423-428.
128. Lin, H.J., Han, C-Y., Lin, B.K., Hardy, S. (1993) Slow acetylator mutations in the human polymorphic N-acetyl-transferase gene in 786 Asians, Blacks, Hispanics and Whites: application to metabolic epidemiology. *Am. J. Hum. Genet.* 52: 827-834.
129. Lin, H.J., Han, C-Y., Lin, B.K., Hardy, S. (1994) Ethnic distribution of slow acetylator mutations in the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) gene. *Pharmacogenetics*. 4:125-134.
130. Martinez, C., Agundez, J.A.G., Olivera, M., Martin, R., Ladero, J.M., Benitez, J. (1995) Lung cancer and mutations at the polymorphic NAT2 gene locus. *Pharmacogenetics*. 5: 207-214.
131. Abe, M., Deguchi, T., Suzuki, T. (1993) The structure and characteristics of a fourth allele of polymorphic N-acetyltransferase gene found in the Japanese population. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 191:811-816.
132. Hein, D.W., Ferguson, R.J., Doll, M.A., Rustan, T.D., Gray, K. (1994) Molecular genetics of human polymorphic N-acetyltransferase:enzymatic analysis of 15 recombinant wild-type, mutant and chimeric NAT2 allozymes. *Hum. Mol. Genet.* 3: 729-734.
133. Cribb, A.E., Grant, D.M., Miller, M.A., Spielberg, S.P. (1991) Expression of monomorphic arylamine N-acetyl-transferase (NAT1) in human leukocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259: 1241-1246.
134. Ward, A., Hickman, D., Gordon, J.W., Sim, E. (1992) Arylamine N-acetyltransferase in human red blood cells. *Pharmacol.* 44:1099-1104.
135. Vatsis, K.P., Weber, W.W. (1993) Structural heterogeneity of Caucasian N-acetyltransferase at the NAT1 gene locus. *Arch. Biochem. Biophys.* 301:71-76.
136. Grant, D.M., Vohra, P., Avis, Y., Ima, A. (1992) Detection of a new polymorphism of human arylamine N-acetyltransferase NAT1 using p-aminosalicylic acid as an in vivo probe. *Clin. Physiol. Pharmacol.* 3: 244-249.
137. Bell, D.A., Badawi, A.F., Lang, N.P., Ilett, K.F., Kadlubar, F.F., Hirvonen, A. (1995) Polymorphism in the N-acetyltransferase 1(NAT1) polyadenylation signal: association of NAT1 10 allele with higher N-acetylation activity in bladder and colon tissue. *Cancer Res.* 55: 5226-5229.
138. Arias, T.D., Jorge, L.F., Griesse, E-U., Inaba, T.E.M. (1993) Polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) in amerindian populations of Panama and Colombia: high frequencies of M3 mutation. *Pharmacogenetics*. 3: 328-331.

139. Ilett, K.F., Chiswell, G.M., Spargo, R.M., Platt, E., Minchin, R.F. (1993) Acetylation phenotype and genotype in Aboriginal leprosy patients from the north-west region of Western Australia. *Pharmacogenetics*. 3: 264-269.
140. Karim, A.K.M.B., Elfellah, M.S., Evans, D.A.P. (1981) Human acetylator polymorphism: Estimate of allele frequency in Libya and details of global distribution. *J. Med. Genet.* 18: 325-330.
141. Jose, A.G., Agundez, J.B. (1993) Debrisoquine polymorphism mechanism for very rapid oxidative phenotype. *Lancet* 341:689-692.
142. Agundez, A.G.J., Martinez, C., Ledesma, M., Ladona, G.M., Ladero, M.J., and Benitez, J. (1994) Genetic basis for differences in debrisoquin polymorphism between a Spanish and other white populations. *Clin. Pharmacol Ther.* 55:412-417.
143. Nei, M., Roychoudhury, A.K. (1982) Genetic relationship and evolution of human races. *Evol. Biol.* 14: 1-59.
144. Nei, M., Saitou, N. (1986) Genetic relationship of human populations and ethnic differences in reaction to drug and food. In: Kalow, W, Goedde H.W., Agarwal, D.P. (eds). New York: Alan R Liss. *Ethnic differences in reactions to drugs and xenobiotics*, pp. 21-37.
145. Armstrong, A.R., and Peart, H.E. (1960) A comparison between the behavior of Eskimos and non- Eskimos to the administration of isoniazid. *Am. Rev. Respir. Dis.* 81: 588-594.
146. Hashem, N., Khalifa, S., and Nour, A. (1969) The frequency of isoniazid acetylase enzyme deficiency among Egyptians. *Am. J. Phys. Anthropol.* 31: 97-102.
147. Hir, M.R., Chicou, J., Hetrick, G., Mercier, A., Neel, R., and Rise, N. (1964) Essai clinique controle de trois types de traitement oral de la tuberculose pulmonaire. *W.H.O.* 30: 701-732.
148. Weber, W.W. (1997) *Pharmacogenetics*, In: Oxford Monographs on Medical Genetics 32: 189-201.
149. Agundez, J.A.G., Martinez, C., Olivera, M., Ledesma, M.C., Ladero, J.M. and Benitez, J. (1994) Molecular analysis of the arylamine N-acetyltransferase polymorphism in a Spanish population. *Clin Pharmacol Ther.* 56 : 202-208.
150. Hickman, D., Sim, E. (1991) N-acetyltransferase polymorphism. Comparison of phenotype and genotype in humans. *Biochem. Pharmacol.* 42: 1007-1012.
151. Droller, M.J.A. (1996) In: . Dekernion, J.B. and Howards S.S. (eds). *Year Book of Urology. A comment.* 19:155.
152. Theodorescu, D. (1996) Commentary on genetic prognostic markers for transitional cell carcinoma of the bladder : From microscopes to molecules. *J. Urol.* 155: 2.
153. Cardon - Cardo, C., Dalbagni, G., Sarkis, A.S. and Reuter ,V.E. (1994). Genetic alterations associated with bladder cancer. *Important. Adv. Oncol.*, 71: 768-785.



154. Stein, J.P., Grossfeld, G.D., Ginsberg, D.A., Esrig, D., Freeman, J.A., Figueroa, A.J., Skinner, D.G., Cote, R.J. (1998) Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J. Urol.* 160: 645-659.
155. Taylor, J.W. (1977) Simple estimation of population attributable risk from case-control studies. *Amer. J. Epidemiol.* 106: 260.
156. Hirvonen, A., Nylund, L., Kociba, P., Husgafvel-Pursiainen, K., and Vainio, H. (1994) Modulation of urinary mutagenicity by genetically determined carcinogen metabolism in smokers. *Carcinogenesis*. 15: 813-819.
157. Risch, A., Wallace, D.M., Bathers, S. and Sim, E. (1995) Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Hum. Mol. Genet.* 4: 231- 236.
158. Hickman, D., Sim, E. (1991). N-acetyltransferase polymorphism. Comparison of phenotype and genotype in humans. *Biochem. Pharmacol.* 42: 1007-1014.
159. Blum, M., Demierre, A., Grant, D.M., Heim, M., Meyer, U.A. (1991). Molecular mechanism of slow acetylation of Drugs and carcinogens in Humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 5237-5241.
160. Hirvonen A. (1995) Genetic factors to individual responses to environmental exposures. *J. Occup. Environ. Med.* 37: 37-43.
161. Dewan, A., Chattopadhyay, P., Kulkarni, P., K. (1995). N-acetyltransferase activity--a susceptibility factor in human bladder carcinogenesis. *Indian. J. Cancer.* 32:15-19.
162. Kato R. and Yamazoe Y. (1994). Metabolic activation of N-hydroxylated metabolites of carcinogenic and mutagenic arylamines and arylamides by esterification. *Drug. Metab. Rev.* 26: 413-417.
163. Kadlubar, F.F. (1994) DNA adducts of carcinogenic aromatic amines. In: Hemminki, K., Dipple, A., Shuker, D.E.G., Kadlubar, F.F., Segerback, D., Bartsch, H. (eds). University Press: Oxford, U.K. IARC Sci Publ. DNA Adducts Identification and significance. pp199-216.
164. Gabbani, G., Hou, S.M., Nardini, B., Marchioro, M., Lambert, B. Clonfero, E. (1996). GSTM1 and NAT2 genotypes and urinary mutagens in coke oven workers. *Carcinogenesis*. 17: 1677-1671.
165. Okkels, H., Sigsgaard, T., Wolf, H., Autrup, H. Arylamine (1997) N-acetyltransferase 1 (NAT-1) and 2 (NAT-2) polymorphisms in susceptibility to bladder cancer: the influence of smoking. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 6: 225-231.
166. Vineis, P., Bartsch, H., Caporaso, H., Harrington, A.M., Kadlubar, F.F., Landi, M.T., Malaveille, C., Shields, P.G., Skipper, P., Talaska, G. (1994). Genetically based N- acetyltransferase metabolic polymorphism and low- level environmental exposure to carcinogens. *Nature*. 369: 154-156.
167. Filiadis, I.F., Georgiou, I., Alamanos, Y., Kranas, V., Giannakopoulos, X., and Lolis, D. (1999) Genotypes of N- acetyltransferase-2 and risk of bladder cancer: a case- control study. *J. Urol.* 161: 1672-1675.

168. Nakayama, T., Zaman, M.M., Tanaka, H. (1998) Reporting of attributable and relative risks, 1996-1997. *Lancet*. 351: 1179.
169. Schalken, J.A. (1998) Molecular prognostic factors in bladder cancer. *Eur. Urol.* 33 (Suppl 4): 13-14.
170. Brockmoller, J., Kaiser, R., Kerb, R., Cascorbi, I., Jaeger, V., Roots, I. (1996) Polymorphic enzymes of xenobiotic metabolism as modulators of acquired p53 mutations in bladder cancer. *Pharmacogenetics*. 6: 535- 545.
171. Sarkis, A., Dalbagni G., Cordon- Cardo, C., Zhang, Z.F., Sheinfeld, J., Fair, W.R., Herr, H.W. and Reuter, V.E. (1993). Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J. Natl. Cancer. Inst.* 85: 53-59.
172. Bell, D.A., Taylor, J.A., Paulson, D.F., Robertson, C.N., Mohler, J.L., Lucier, G.W. (1993). Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.* 85: 1159-1163.
173. Rothman, N., Hayes, R.B., Zenser, T.V., DeMarini, D.M., Bi, W., Hirvonen, A., Talaska, G., Bhatnagar, V.K., Caporaso, N.E., Brooks, L.R., Lakshmi, V.M., Feng, P., Kashyap, S.K., You, X., Eischen, B.T., Kashyap, R., Shelton, M.L., Hsu, F.F., Jaeger, M., Parikh, D.J., Davis, B.B., Yin, S., Bell, D.A. (1996) The glutathione S-transferase M1 (GSTM1) null genotype and benzidine- associated bladder cancer, urine mutagenicity, and exfoliated urothelial cell DNA adducts. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 5: 979-983.
174. Filiadis, I.F., Georgiou, I., Alamanos, Y., Giannakis, D., Giannakopoulos, X., and Lolis, D. (1999) Polymorphism of Glutathione S-transferase and predisposition for bladder carcinogenesis. *Eur. Urol.* 35 (Suppl 2): 80.
175. Georgiou, I., Filiadis, I.F., Alamanos, Y., Bouba, I., Giannakopoulos, X., and Lolis, D. (2000). Glutathione S-transferase null genotypes and risk of bladder cancer. *Eur. Urol.* (accepted for publication).

