Epigenetički i molekularni mehanizmi tumorigeneze uzrokovane duhanskim dimom

Horvat, Luka

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:219519

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

EPIGENETIČKI I MOLEKULARNI MEHANIZMI TUMORIGENEZE UZROKOVANE DUHANSKIM DIMOM

EPIGENETIC AND MOLECULAR MECHANISMS OF TUMORIGENESIS CAUSED BY TOBACCO SMOKE

SEMINARSKI RAD

Luka Horvat
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular biology)
Mentor: Prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

Zagreb, 2012.

SADRŽAJ

1. UVOD.....2

2. EPIGENETIČKI MEHANIZMI.....4

3. TUMORIGENEZA UZROKOVANA DUHANSKIM DIMOM..... 6

3.1. Inicijacija tumorigeneze.....6

3.2. Promocija.....7

3.2.1. Učinak duhanskog dima na signalne putove proliferacije.....**7**

3.2.2. Učinak duhanskog dima na signale protiv proliferacije.....**9**

3.2.3. Otpornost na apoptozu kao posljedica učinka duhanskog dima.....**10**

3.2.4. Učinak duhanskog dima na životni vijek stanice.....**11**

3.2.5. Učinak duhanskog dima na mobilizaciju hranjivih tvari.....**12**

3.3. Progresija.....12

4. UČINAK DUHANSKOG DIMA NA ANGIOGENEZU.....13

5. UČINAK DUHANSKOG DIMA NA INVAZIJU I METASTAZIRANJE TUMORA 14

6. ZAKLJUČAK.....16

7. SAŽETAK 18

8. SUMMARY.....19

9. LITERATURA.....20

1. UVOD

Epigenetika (grč. *επί-* pokraj, povrh; ‘iznad genetike’) proučava nasljedne promjene u genskoj aktivnosti koje mogu biti naslijeđene ali ne uključuju mijenjanje genske sekvence kao i čimbenike koji upravljaju ponašanjem nasljedne informacije od spolne stanice do smrti [1]. Aktivnost gena je i pod utjecajem vanjskih čimbenika a ne samo unutarnjih, genima određenih obrazaca ekspresije [1,2]. Epigenetički biljezi nalaze se duž molekule DNA ili na histonima. Oni su prekidači koji uključuju ili isključuju gene. Epigenom predstavlja skup epigenetičkih biljega. Za razliku od gena kojima je za promjenu strukture i funkcije potreban dugi vremenski period, epigenetička promjena se može dogoditi relativno brzo. Epigenetički signali protežu se na nekoliko naraštaja. Promjene epigenoma događaju se za vrijeme specifičnih razvojnih perioda (razvoj embrija, pubertet) ali mogu biti i posljedica individualnog stila života (prehrana, pušenje, alkohol) i okoliša (onečišćenje, stres). Molekularna baza epigenetike je vrlo kompleksna. Najčešće epigenetičke promjene odnose se na promjene u metilaciji DNA, modifikacije histona i nekodirajuće RNA molekule, a služe u regulaciji važnih staničnih funkcija poput genske ekspresije i genomskog utiska (engl. genomic imprinting) [1].

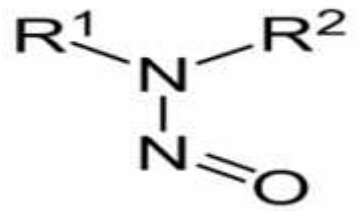
Tumorigeneza ili karcinogeneza je složeni proces kojim se normalne stanice transformiraju u tumorske stanice. Odlikuje se nizom promjena na staničnoj i genskoj razini koje u konačnici uzrokuju reprogramiranje staničnih mehanizama te dovode do nekontrolirane diobe stanica i stvaranja maligne mase-tumora [3,4]. Tradicionalno postoje tri stadija tumorigeneze: inicijacija (ireverzibilna modifikacija DNA, aktivacija onkogena, inaktivacija tumor-supresorskih gena), promocija (stimulacija rasta iniciranih stanica) i progresija (dodatne promjene genoma, proliferacija stanica s oštećenom DNA, indukcija dodatnih oštećenja DNA) [5]. Karcinogene promjene u DNA najčešće uzrokuju aktivaciju onkogena i inaktivaciju tumor-supresorskih gena.. **Onkogeni** su oni geni koji snažno aktiviraju proces umnožavanja stanica. Tako dugo dok ti geni ne mutiraju odnosno sve dok obavljaju svoju funkciju u pravo vrijeme i u pravom obimu, nazivaju se protoonkogeni. **Tumor-supresorski geni** kodiraju protu proliferirajuće signale i proteine koji kontroliraju stanični ciklus. To su transkripcijski faktori koje aktivira stanični stres ili oštećenje DNA. Uzrokuju zaustavljanje stanične diobe i tako omogućuju popravak molekule DNA. U razvitku tumora dolazi do njihovog utišavanja. Jedan od najpoznatijih tumor-supresorskih gena je gen *p53.*

Kako bi normalna stanica postala tumorskom najmanje šest putova mora biti izmijenjeno što uključuje da stanica postane neovisna o signalima rasta, neosjetljiva na

signale koji zaustavljaju rast, da izbjegava apoptozu, da započne invaziju u tkiva i metastaziranje, kontinuiranu angiogenezu te da ima neograničeni replikacijski potencijal. Promjene u tim glavnim putovima mogu se pojaviti kroz genske promjene u dobro definiranim genima ili putem brojnih epigenetičih procesa (metilacija DNA, post-translacijska modifikacija proteina, modifikacija genske ekspresije). Rast tumora zahtjeva i molekularne promjene mijenjajući interakciju između tumorskih stanica i okolne strome te imunološkog sustava [6]. Da bi tumorska stanica proliferirala ne smije biti prepoznata od imunološkog sustava jer bi inače bila uništena. Navedene promjene na kraju dovode do rasta tumora, invazije i metastaziranja. Karcinogenom se smatra bilo koji agens koji uzrokuje formaciju tumora, a dijelimo ih na genotoksične, epigenetičke i neklasificirane.

Duhanski dim nastaje izgaranjem suhog lista biljke *Nicotiana tabacum* L., a u ljudskoj populaciji konzumira se pušenjem cigareta. Pušenje povisuje rizik za razvoj bolesti srca, kronične opstruktivne plućne bolesti, moždanog udara te akutnih bolesti dišnog sustava. Osim ovih netumorskih bolesti velika je povezanost pušenja i sa razvojem karcinoma u ljudi.

U duhanskome dimu ima preko 5000 kemijskih spojeva, a 62 su ocijenjena od internacionalne agencije za istraživanja raka IRAC (engl. International Agency for Research on Cancer) kao karcinogeni u životinja i ljudi [7,8]. Glavne karcinogene tvari uključuju spojeve poput N-nitrozamina (Slika 1), policikličkih aromatskih ugljikovodika (**PAH)**, benzena i radioaktivnog polonija [9]. PAH-ovi i nitrozamini su najgenotoksičnije komponente duhanskog dima.



Slika 1. Opća formula nitrozamina

Većina genotoksičnih istraživanja rađena je na kondenzatu duhanskog dima (**CSC**- engl. cigarette smoke condensate). CSC se pokazao genotoksičan u skoro svim sustavima uzrokujući izmjenu sestrinskih kromatida (**SCE** – engl. sister chromatid exchanges), mikronukleuse, DNA lomove i slična oštećenja ali i mutacije molekule DNA. Duhanski dim je danas najekstremniji primjer sustavnog mutagena i karcinogena u ljudi [6].

Komponente duhanskog dima uzrokuju tumorigenezu pomoću nekoliko mehanizma koji uključuju sve tri faze tumorigeneze [9].

Osim genotoksičnih učinaka, negenotoksični (epigenetički) učinci duhanskog dima su vrlo važni. Oni mogu djelovati kao modulatori staničnih funkcija te kao takvi mogu povećati rizik nastanaka tumora.

2. EPIGENETIČKI MEHANIZMI

Kromatin je kompleks molekule DNA i malih bazičnih proteina **histona**. DNA koja omata histonski oktamer (H2A, H2B, H3, H4), stvara interakcije s proteinima uglavnom preko svoje fosfodiesterske okosnice i preko funkcionalnih grupa A-T parova baza u malom utoru. Dvolančana DNA duga 146 pb obavija histonski oktamer 1,8 puta i tvori **nukleosom.** Nukleosomi se pakiraju u uređeniju solenoidnu strukturu koja se zatim pakira (kondenzira) u kompaktni eukariotski kromosom. Nukleosomi služe kao opći represori pri eukariotskoj transkripciji [10]. Pri replikaciji ne dolazi do 'raspadanja' nukleosoma. Stari nukleosomi ostaju vezani za novu dvolančanu DNA nastalu kontinuiranom replikacijom, dok se novosintetizirani nukleosomi vežu za diskontinuirano repliciranu dvolančanu DNA.

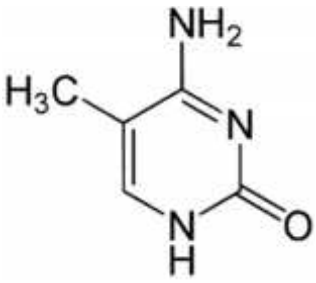
Kod eukariota kromatin utječe na kompleksniju regulaciju ekspresije gena. Geni koji se eksprimiraju nalaze se u manje kompaktnim regijama kromatina. Takva manje kompaktna regija kromatina naziva se **eukromatin**. Heterokromatinom nazivamo kromatin koji je gušće pakiran od eukromatina i transkripcijski je inaktivan. Eukromatin zbog 'rahlog' pakiranja omogućava pristup RNA polimerazi te je zbog toga transkripcijski aktivan. Struktura kromatina se za vrijeme transkripcije remodulira. Eukromatin je biokemijski različit od heterokromatina, a te razlike su posljedica različitih modifikacija histona. Nukleosomalni histoni su acetilirani, nukleosomalni histon H2B je manje fosforiliran, a histon H1 vezan je slabije na nukleosome koje povezuje s vanjske strane. Također zbog takvih modifikacija histona aktivni kromatin selektivno veže neke proteine koji pospješuju daljnje remoduliranje kromatina [10, 1].

Histon-acetiltransferaza (**HAT**) acetilira lizin na amino-terminalnom kraju histona. Amino-terminalni rep histona H3 proteže se u džep u kojem lizinski bočni ogranak može prihvatiti acetilnu skupinu s acetil-CoA. Acetiliranjem histona smanjuje se afinitet prema DNA i dolazi do interakcije s proteinima koji imaju **bromodomenu**. (acetil-lizin-veznu domenu). Takvu domenu sadrže **TAF proteini** (engl. TATA-box-binding protein associated factors) (proteini aktivatori transkripcije) te proteini koji uz pomoć ATP-a remoduliraju strukturu kromatina [10].

Deacetiliranje histona histon-deacetilazama (**HDAC**) doprinosi represiji transkripcije. Aktivacijom gena se kromatin ne mijenja trajno, nego dolazi do dinamičkog procesa u kojemu se nukleosom rearanžira na aktivnom promotoru, a potom se inaktivacijom gena opet formira 'čvršći' nukleosom. Osim acetilacije histona moguća je i metilacija histonskih repova. Metilacija povećava bazičnost i hidrofobnost histona te se oni kao takvi bolje vežu za

anionsku molekulu kao što je DNA. Metilacija se postiže pomoću enzima histon metiltransferaza (**HMT**) a demetilacija pomoću još neidentificiranih histon demetilaza (**HDM**). Metilacijom histona stvara se kompaktniji kromatin koji služi utišavanju ekspresije gena [1].

Osim pakiranja DNA s histonima, promjene u metilaciji DNA su u vezi s genskom aktivnosti. DNA metilacija se odnosi na kovalentno dodavanje metilne grupe sa S-adenozil-L-metionina na peti ugljikov atom citozinskog prstena formirajući tako bazu 5-metil citozin (5meC) (Slika 2). **Metilacija DNA** može promijeniti obrazac ekspresije gena za određeni tip stanice. Metilacija promotora dovodi do utišavanja ekspresije gena dok metilacija u kodirajućoj regiji može pojačati ekspresiju gena [11]. Najčešća je metilacija citozina unutar dinukleotidnog slijeda CpG ili trinukleotidnog slijeda CpNpG. Enzim metiltransferaza MET1 metilira CpG dok DRM1, DRM2 i CMT3 metiliraju citozin u drugačijim slijedovima. Ugljikov atom broj 5 u citozinu može se metilirati specifičnim metiltransferazama i ometati vezanje aktivacijskog proteina. Metilna skupina 5-metilcitozina prodire u veliki utor molekule DNA gdje može ometati vezanje proteina koji potiču transkripciju.



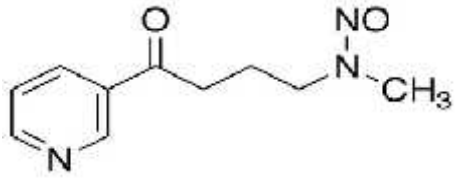
Slika 2. 5-metil citozin

Također postoji skupina proteina poznatih kao metil citozin vezujući proteini (MeCP) koji specifično prepoznaju CpG metilirane sekvence te stvaraju smetnje pri vezanju transkripcijskih faktora (TF) na njihove regulatorne elemente. MeCP prizivaju histonske deacetilaze i histonske metiltransferaze, enzime koji posreduju modifikaciji histona, te uzrokuju stvaranje represivnih kromatinskih struktura [1]. Oko 75% sekvenci 5’ CpG 3’ u genomu čovjeka je metilirano. Obrasci metilacije DNA su uspostavljeni za vrijeme razvoja organizma [10].

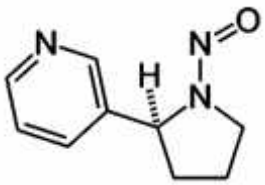
3. TUMORIGENEZA UZROKOVANA DUHANSKIM DIMOM

3.1. Inicijacija tumorigeneze

Vrlo je teško odrediti početni uzrok za većinu specifičnih vrsta tumora. Tumorigeneza može biti rezultat biološkog ili kemijskog izlaganja normalnih stanica kroz cijeli niz procesa koji uključuju promjene u DNA. To mogu biti promjene same molekule DNA (mutacije) ili promjene epigenetičke prirode (primjerice metilacija koja uzrokuje povećanu ekspresiju onkogena). Neki od sastojaka duhanskog dima djeluju direktno na molekulu DNA, ali većina njih iziskuje **enzimsku konverziju** prije nego što postanu kancerogeni [12]. Većina takvih konverzija uključuje metaboličke promjene preko citokroma P450 pri čemu nastaju elektrofilni spojevi koji se mogu vezati s DNA i tvoriti DNA adukte. Takvo stvaranje adukata je uobičajeno na dijelovima DNA s adeninom ili gvaninom i vode k mutacijama sličnim onima koje su primijećene u onkogenu *KRAS* (važna uloga u normalnoj tkivnoj signalizaciji) ili onima u genu *TP53,* a koji su karakteristični za rak pluća [6]. Ireverzibilna modifikacija DNA, aktivacija onkogena te inaktivacija tumor-supresorskih gena predstavljaju tzv. inicijacijski korak u karcinogenezi.



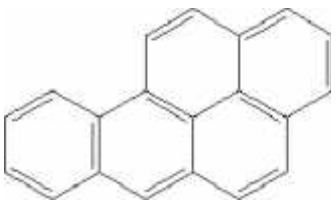
Slika 3. 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK)



Slika 4. N'-nitrosonornikotin (NNN)

4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK) (Slika 3) i N'-nitrozonornikotin (**NNN**) (Slika 4) su najjači duhan-specifični nitrozamini u duhanskom dimu. Ovi spojevi nastaju iz duhanskih alkaloida (poput nikotina) za vrijeme sušenja duhana i važni su karcinogeni koji mogu utjecati na različita tkiva. NNK je potencijalni karcinogen koji uzrokuje rak pluća, jetre pa čak i tumore nosne šupljine. NNN je potencijalni karcinogen jednjaka, nosne šupljine i dišnog trakta. U ljudi su identificirani metaboliti NNK u urinu pušača pa stoga urin pušača može biti mutagen [6].

Benzo[a]piren (**BaP**) (Slika 5), jedan od PAH spojeva, svrstan je u grupu I. kancerogenih spojeva za ljude [8]. Dokazan je veliki tumor inducirajući potencijal u razvoju tumora pluća, dušnika i mliječnih žlijezdi [9]. Njegovi metaboliti stvaraju DNA adukte sa mjesno specifičnom mutacijom u tumor supresorskom genu *p53*. To potvrđuje pozitivna korelacija takvih adukata i tumora u tkivu pluća pušača. Iako treba istaknuti da formiranje DNA adukata još uvijek ne



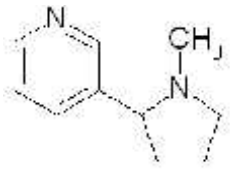
Slika 5. Benzo[a]piren

može predstavljati glavni rizik za razvoj tumora u pušača. Tomu ide u korist činjenica da iako je veća učestalost tumora gušterače u pušača nego u nepušača, test prisutnosti metabolita NNK u tkivu gušterače obiju skupina pacijenata ne pokazuju značajnu razliku [7]. Dakle, očito je da sam NNK nije odgovoran za razvoj tumora gušterače u pušača. Ipak NNK i njegovi metaboliti su jedini poznati okolišni karcinogeni koji induciraju tumor gušterače u laboratorijskih životinja. Zato doprinos NNK razvoju tumora gušterače u ljudi ne smije biti zanemaren. Moguće je da osim oštećenja DNA, sinergističke interakcije između DNA reaktivnosti i epigenetičkih promjena uzrokovanih drugim komponentama duhanskog dima, mogu biti dovoljni za razvoj tumora.

3.2. Promocija

Promocija tumora okarakterizirana je deregulacijom signalnih putova koji kontroliraju staničnu proliferaciju, apoptozu i dr. Iako su mogući različiti putovi koji vode do nastanka tumora neki biljezi karakteristični su za sve tumore. Primjerice većina tumora ima defektan gen *p53*.

3.2.1 *Učinak duhanskog dima na signalne putove proliferacije*



Slika 6. Nikotin

Normalne stanice iziskuju signal rasta kako bi krenule u proliferaciju. Ti signali se prenose u stanicu preko receptora koji vežu različite signalne molekule. U tumorskim stanicama receptori koji provode takve signale česte su mete deregulacije za vrijeme tumorigeneze. Pojačana ekspresija tih receptora omogućava tumorskoj stanici da postane hipersenzitivna na niske razine faktora rasta koji nisu dovoljni da izazovu proliferaciju normalnih stanica [13]. Zanimljivo je da neki sastojci duhanskog dima mogu oponašati takve signalne molekule.

Nikotin (Slika 6), glavni sastojak duhanskog dima, igra važnu ulogu u tumorigenezi. Nikotin se ponaša poput faktora rasta i djeluje kroz nikotinski acetilkolinski receptor (**nAChR**), β-adrenergički receptor (**β-AR**) ili preko receptora za epidermalni faktor rasta (**EGFR**). Ovi receptori su tkivno specifični, a razina njihove ekspresije i senzitivnosti može biti izmijenjena djelovanjem nikotina [7]. Nedavna studija ukazala je na povećanu ekspresiju **α9 nAChR** kod tumora dojke te kako taj receptor ima važnu ulogu u tumorigenezi. Nikotin posreduje u signalizaciji i povećava ekspresiju ciklina D3 u tkivu tumora dojke. Povećana ekspresija α9 nAChR kroz AKT signalizaciju (protein kinaza B- serin/treonin protein kinaza koja ima važnu ulogu u kontroliranju staničnih procesa poput metabolizma glukoze, apoptoze, proliferacije itd.) povećava fosforilaciju adhezijskih molekula bitnih za metastaziranje tumora.

Nikotin također potiče proliferaciju mezoteliomskih stanica. Mezoteliom čine stanice tumora koje se razvijaju iz transformiranih stanica podrijetlom iz mezoteliuma, zaštitne ovojnice unutarnjih organa. Ta signalizacija ide preko **α7** nAChR s aktivacijom **ERK1/2** kaskade (engl. extracellular-signal-regulated kinases). Svi ti događaji konačno dovode do inhibicije apoptoze i tako povećavaju rizik za nastanak tumora [7].

Također je pokazano da nikotin preko α7 nAChR potiče proliferaciju posredovanu aktivacijom MAP kinaza (p44/p42-**MAPK,** engl. Mitogen-activated protein kinases). Između ostalog α7 nAChR potiče proliferaciju stanica mokraćnog mjehura preko ERK1/2 i Stat3 smanjujući ekspresiju α7 nAChR i β-AR. Sve te studije dokazuju da nikotin kao jedan od glavnih sastojaka duhanskog dima ima važnu ulogu u poticanju stanične proliferacije koja pak ima kritičnu ulogu u nastanku tumora tj. u tumorigenezi [7].

Osim nikotina i nitrozamini poput NNK i NNN potiču proliferaciju tumorskih stanica preko nAChR. NNK potiče tumorigenezu vežući se za nAChR, pogotovo za α7 nAChR, dok se NNN uglavnom veže za α4/β2 nAChR [7]. Dokazano je da nikotin ili NNK stimuliraju proliferaciju stanica tumora pluća preko α7 nAChR aktivirajući različite protein kinaze i transkripcijske faktore [7]. Kako je pojačana ekspresija određenih receptora tkivno specifična (pokazano na primjeru nAChR) postoji mogućnost da oni budu molekularne mete za potencijalnu kliničku terapiju [14]. Nažalost većina nAChR prisutnih u tumorskim tkivima još nije funkcionalno okarakterizirana. Tu se otvara prostor za nova istraživanja koja bi trebala dati odgovor na pitanje kako pojedini podtipovi nAChR i njihova promijenjena ekspresija utječu na tumorigenezu.

NNK potiče rast plućnih adenokarcinoma (vrsta malignog tumora koji se javlja u žljezdastom tkivu) *in vitro* ali i *in vivo* uzrokujući otpuštanje arahidonske kiseline preko **COX-2** enzima odgovornog za upalne procese i bol i 5-lipoksigenaze (**5-LOX)** koji su regulirani preko β-AR. Postoje naznake da **antagonisti β-AR** mogu inhibirati razvoj plućnog adenokarcinoma uzrokovanog NNK. Takvi antagonisti smanjuju i stimulirajući efekt nikotina. Nikotin preko α7 nAChR povisuje razinu noradrenalina dovodeći do značajnih promjena u rastu i angiogenezi tumora želuca i debelog crijeva [7].

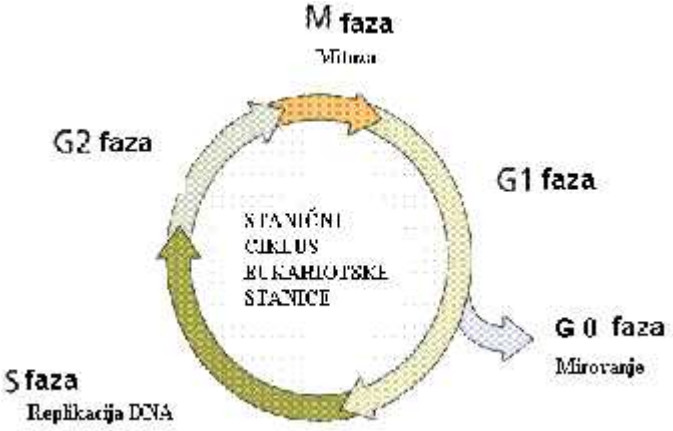
Nikotin doprinosi razvoju adenokarcinoma izvodnog kanala gušterače (**PDAC** engl. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma) potičući povećanu razinu neurotransmitera odgovornih za stres (adrenalin i noradrenalin) ali smanjuje razinu γ-amino-maslačne kiseline (**GABA**). GABA posjeduje tumor supresijsku funkciju suprimirajući rast i migraciju stanica u uvjetima *in vitro*. Oslobađanje adrenalina i noradrenalina preko nAChR ima važnu ulogu u

tumorigenezi uzrokovanoj duhanskim dimom iako točan mehanizam još nije u potpunosti poznat [7].

Ukratko sva istraživanja aktivacije preko nAChR ali i njegove transaktivacije preko drugih receptora idu u prilog tome da nAChR ima ključnu ulogu u regulaciji staničnih kaskada, staničnih funkcija ali i u tumorigenezi.

U zadnje vrijeme velika se pažnja posvećuje negenotoksičnom djelovanju PAH-ova. Biološki efekti PAH-ova su posredovani preko arilnog ugljikovodičnog receptora (**AhR**) . Primjerice jedan od PAH-ova je benz[a]antracen (**BaA**) koji povećava sintezu DNA i promovira G1-S fazu ciklusa, dakle potiče stanice na proliferaciju. Većina PAH-ova imaju djelovanje slično estrogenu te zbog toga mogu potaknuti staničnu proliferaciju [7].

3.2.2. Učinak *duhanskog dima na signale protiv proliferacije*



Slika 7. Stanični ciklus [15]

U normalnim tkivima signali protiv proliferacije rade na održavanju staničnog mirovanja i homeostaze tkiva. Signali protiv proliferacije blokiraju diobu stanica tako što prisiljavaju stanicu da uđe u G0 fazu staničnog ciklusa. Stanica ulazi u G0 fazu u točci R koja se nalazi unutar faze G1 (Slika 7). Prijelaz stanice iz G1 faze u S fazu predstavlja ključni regulatorni korak u staničnom ciklusu,a kontroliran je pomoću kompleksa ciklin-ovisnih kinaza CDK4/6-ciklin D i CDK2-ciklin E (engl. Cyclin-Dependent Kinases). Ovi kompleksi induciraju fosforilaciju proteina **pRb** (engl. retinoblastoma protein - tumor supresor) i oslobađaju transkripcijski faktor E2F koji usmjerava stanicu u proliferaciju. Poremećaj u Rb putu mogao bi učiniti stanice neosjetljivima na signale koji zaustavljaju proliferaciju [7]. Nikotin inducira vezanje Raf-1 kinaze na pRb uz aktivaciju ciklina kao i samu aktivaciju pRb-a. Nikotin i NNK djeluju preko receptora nACHR i β-AR potičući pojačanu ekspresiju ciklina D1 koja potiče prijelaz iz G1 u S fazu te tako potiču proliferaciju.

Kinaza P13K (fosfatidil-inozitol kinaza) i AKT-ovisna proliferacija također je potaknuta pomoću NNK. PI3K/AKT put je kritičan u tumorskim stanicama jer utječe na samu tumorigenezu, rast tumora, metastaziranje, ali i na otpornost na lijekove [7]. PI3K/AKT aktivacija je zabilježena u mišjim stanicama A/J soja (miševi s razlikom u proteinskoj

sekvenci NLR, engl. NOD-like receptors) tretiranim NNK-om, ali i u tumorskom tkivu pluća pušača [7]. Ipak PI3K/AKT-ovisna proliferacija se ne pojavljuje u svim tumorskim stanicama induciranim nikotinom. Važno je napomenuti da i druge komponente duhanskog dima osim nikotina i NNK također mogu omesti mehanizme koji sprečavaju proliferaciju i tako pojačati razvoj i promociju tumora.

3.2.3. *Otpornost na apoptozu kao posljedica učinka duhanskog dima*

Apoptoza ima važnu funkciju u kontroli normalnog razvoja, homeostaze i imunosne obrane organizma tako što eliminira višak stanica ili one koje su abnormalne. Neuspjeh u eliminaciji nepotrebnih stanica odnosno otpornost na apoptozu može voditi nekontroliranom rastu istih. Otpornost na apoptozu je česta u tumorskim stanicama koje su izgubile proapoptotski potencijal zbog mutacije određenih gena. Najvažnije mutacije uključuju tumor-supresorske gene kao što je *p53*.

Nikotin inhibira apoptozu uzrokovanu faktorom tumorske nekroze (**TNF**), ultraljubičastim zračenjem (UV) ili kemoterapijskim lijekovima poput cisplatine, vinblastina i paklitaksela [16]. Ovakva inhibicija odvija se preko kaskada signalnih putova od kojih su neki objašnjeni u daljnjem tekstu. Inhibicija apoptoze i poticanje proliferacije stanica epitela bronhija inducirana NNK-om preko aktivacije α3/α4 nAChR slijedi povećanom ekspresijom AKT-a (poznate kao i protein kinaza B, PKB), mitogen-aktivirajuće protein kinaze (**MAPK**), ali i PKC-a (protein kinaza C) [7]. Protein kinaza bitnih u regulaciji proliferacije stanica.

Zanimljivo je da lijekovima uzrokovana povećana ekspresija *p53* i *p21* može biti suprimirana nikotinom. Taj protu-apoptotski mehanizam posredovan je *α*3 nAChR-om. NNK može spriječiti apoptozu modulirajući protuapoptotske proteine Bcl-2 i c-Myc [7]. Hem oksigenaza-1 (**HO-1**) je protein čija se ekspresija inducira za vrijeme oksidacijskog stresa. Njegova funkcija je povezana sa staničnom proliferacijom, a zapaženo je da je njegova ekspresija povećana za vrijeme razvoja nekih tumora poput želučanog i tumora štitnjače. Usporedbom ekspresije HO-1 u tumorskome tkivu pušača i nepušača zapažena je izrazito povećana ekspresija u oba tkiva. Iz tih činjenica lako je zaključiti da NNK i njegovi metaboliti uzrokuju oksidacijski stres u plućnome tkivu, a tako i povisuju ekspresiju HO-1. Takav događaj u konačnici vodi do izbjegavanja apoptoze i stanične proliferacije [12].

Stanična proliferacija i apoptoza mogu biti modulirane pomoću peroksisomalnog proliferatorom-aktiviranog receptora (**PPAR**). PPAR su članovi velike superfamilije jezgrinih receptora hormona, a ovisno o ligandu djeluju kao transkripcijski faktori. Najveće skupine PPAR su α, β/δ, i γ [7]. PPAR **β/δ** su eksprimirani u većini tkiva, a povezani su s rastom

tumora, osobito tumora jetre, debelog crijeva, dojke i pluća. Nikotin povećava ekspresiju PPAR β/δ preko α3 nAChR i unutarstaničnog signalnog puta važnog u apoptozi PI3K/mTOR (mTOR, engl. mammalian target of rapamycin) što ima za posljedicu proliferaciju tumorskih stanica. PPAR **γ** ima suprotno djelovanje jer vezan s odgovarajućim ligandom uzrokuje apoptozu i inhibira staničnu proliferaciju. Njegova aktivacija smanjuje rizik nastanka tumora. Zanimljivo je da je aktivacija PPAR γ utišana u tkivu tumora pluća [7].

Suprotno nikotinu, PAH-ovi induciraju ili sprječavaju apoptozu. Primjerice BaP djeluje preko receptora **IGFR** (engl. Insulin-like Growth Factor Receptor) koji povećava preživljavanje stanice preko aktivacije PI3K. PI3K zatim aktivira AKT i ERK1/2 koji djeluju protiv apoptotskih signala fosforilirajući Bad **(**proapoptotska molekula regulirana fosforilacijom). BaP inducira apoptozu preko *p53* i *p21*. Dok apoptotski signal BaP-a uzrokuje smrt stanice (citotoksično djelovanje), njegovo antiapoptotsko djelovanje važno je u tumorigenezi. Točan faktor koji određuje put njegova djelovanja nije poznat [17].

Mehanizmi kojima sastojci duhanskog dima sprječavaju apoptozu vrlo su složeni. Očito je da apoptoza igra jednu od ključnih uloga u tumorigenezi uzrokovanoj duhanskim dimom. Ako izmijenjena stanica krene u apoptozu to neće imati posljedicu ali ako je stanica izmijenjena a odlazak u apoptozu je spriječen bilo kojim od navedenih mehanizama dolazi do definitivne tumorigeneze. Nužna su daljnja istraživanja jer točno razumijevanje molekularnih mehanizama regulacije apoptoze može nam omogućiti nove strategije u razvoju lijekova i borbi protiv tumora.

3.2.4 *Učinak duhanskog dima na životni vijek stanice*

Kada neka stanična populacija prođe određeni broj dioba ona se prestane dijeliti te ulazi u proces zvan senescencija ili starenje. Tumorske stanice mogu se dijeliti neograničeno za vrijeme progresije tumora, one su imortalne tj. besmrtne. Ključni enzim koji im omogućava tu prilagodbu je **telomeraza** (RNA ovisna DNA polimeraza). Telomeraza je enzim koji se sastoji od proteinske i RNA komponente i ona u kompleksu s potrebnim proteinima produljuje krajeve kromosoma specifičnim kratkim ponavljajućim sekvencama (TTAGGG)n [10]. Telomere su važne za normalnu strukturu i vijabilnost stanice. Ne mogu se replicirati pomoću DNA polimeraze, te se skraćuju u svakom ciklusu replikacije DNA i diobe stanice. Tu dolazi do izražaja važnost adicije TTAGGG ponavljanja. Bitno je napomenuti da se telomeraza u normalnim somatskim stanicama inaktivira te se takve stanice ne mogu beskonačno dijeliti, gube replikativnu sposobnost i stare zbog skraćivanja telomera.

Telomeraza se ne inaktivira u nekim tumorskim stanicama koje stoga imaju mogućnost neograničene diobe. Detekcija aktivnosti telomeraze važna je u dijagnostici i potencijalno u terapeutici. U nekim tumorima produženje telomera nije povezano s aktivnom telomerazom, što ukazuje na alternativne mehanizme produženja telomera.

Primijećena je visoka korelacija između aktivnosti telomeraze i izloženosti stanica bronhijalnog epitela duhanskome dimu. Povećana telomerazna aktivnost produljuje životni vijek stanicama i tako povećava rizik za malignu transformaciju i tumorigenezu [7].

Činjenica da izloženost stanica duhanskome dimu povećava aktivnost telomeraze naglašava potencijal duhanskog dima u promociji tumora. Nažalost još se uvijek ne zna koja točno komponenta duhanskog dima djeluje na povećanje aktivnosti telomeraze.

3.2.4. *Učinak duhanskog dima na mobilizaciju hranjivih tvari*

Tumorigeneza zahtjeva veliku količinu hranjivih tvari i energije. Sinteza pojedinih proteina i mitohondriji imaju određenu ulogu u neoplastičnoj transformaciji (transformacija normalne stanice u tumorsku). Dobro je poznata činjenica da **mTOR** (engl. mammalian target of rapamycin) i MAPK moduliraju fosforilaciju transkripcijskih faktora, stabilnost mRNA i sintezu proteina. Nikotin i njegovi metaboliti (NNK) mogu izazvati ekspresiju inhibitora apoptoze **survivina,** preko AKT-mTOR puta i također posredovati u njegovoj *de novo* sintezi u normalnim stanicama epitela pluća (HBE stanice). Ekspresija survivina ima značajnu ulogu u malignoj transformaciji HBE stanica stimulirajući putove preživljavanja [18].

Duhanski dim može smanjiti funkciju dišnog lanaca u mitohondrijima te tako izazvati oksidacijski stres koji vodi do nefunkcionalnih mitohondrija. Izlaganje organizma nikotinu rezultira smanjenjem aktivnosti mitohondrijskih enzima gušterače, degranulacijom β-stanica, povišenim oksidacijskim stresom otočnih stanica te smanjenom sekrecijom inzulina [7]. Kontinuirana izloženost slobodnim radikalima kisika (**ROS** engl. Reactive oxygen species), dobivenih izazivanjem 'mitohondrijskog stresa', može dovesti do mutacija u mitohondrijskoj DNA koje imaju važnu ulogu u tumorigenezi [19]. Analizom kliničkih uzoraka stanica bukalne sluznice pušača pokazano je kako tumorske stanice sa mutacijama u mtDNA rastu brže nego stanice bez takvih mutacija [19].

3.3. Progresija

Malignost nekog tumora procijenjena je po njegovoj sposobnosti invazije i metastaziranja kao i s angiogenezom. Za progresiju su karakteristične dodatne promjene genoma, proliferacija

stanica s oštećenom DNA i indukcija dodatnih oštećenja DNA. Postoji obilje dokaza koji povezuju duhanski dim sa procesom angiogeneze, invazije i metastaziranja kojima ću se baviti u ostatku ovoga rada.

4. UČINAK DUHANSKOG DIMA NA ANGIOGENEZU

Angiogeneza je proces nastajanja novih krvnih žila iz endotelnih stanica (**EC**). To je vrlo važan proces jer njime nastaju žile koje opskrbljuju tumorsko tkivo hranjivim tvarima i kisikom. Angiogeneza uključuje promjene zrelih krvnih žila, odvajanje pericita (stanice koje obavijaju endotel kapilara), degradaciju ekstracelularnog matriksa, proliferaciju, migraciju i formaciju novih endotelnih stanica u cjevaste strukture. Tumorske stanice potiču angiogenezu mijenjajući balans induktora angiogeneze poput **VEGF** (engl. vascular endothelial growth factor) i **bFGF** (engl. basic fibroblast growth factor) i kompenzacijom inhibitora kao što je trrombospondin-1. VEGF potiče angiogenezu i limfoangiogenezu u tumoru omogućavajući mu tako mogućnost širenja [7].

Nikotin može uzrokovati angiogenezu *in vitro* i *in vivo* te tako pridonijeti rastu tumora [20]. Slično kao i **FGF** (engl. fibroblast growth factor) nikotin potiče migraciju, proliferaciju, formaciju cjevčica i produkciju dušikovog(II) oksida (NO) u endotelnim stanicama. NO potiče širenje krvnih žila ali je i medijator u angiogenezi. Nikotin također potiče ekspresiju vaskularnih endotelnih faktora rasta poput VEGF, bFGF, PDGF, TGF-α i TGF-β u endotelnim stanicama i u glatkome mišiću. Osim toga nikotin inducira sekreciju prostaciklina, vazodilatirajuće molekule koja može uzrokovati proliferaciju, preživljavanje i migraciju stanica endotela [7]. Ove činjenice nas upućuju na to da duhanski dim utječe na hiperplaziju intime (najdubljeg sloja arterije koji je u izravnom kontaktu s krvlju) krvnih žila što znači kolagenozno zadebljanje ili fibrozu intime krvnih žila.

Tumorska angiogeneza može biti modulirana preko nAChR. α7 nAChR je važan i u fiziološkoj ali i u tumorskoj angiogenezi. α7 nAChR mora biti podražen ili aktiviran hipoksijom ili ishemijom kako bi inducirao angiogenezu. Specifični antagonist α7 nAChR je α-bungaratoksin koji inhibira angiogenezu induciranu nikotinom. Inhibicijom ERK1/2, p38, MAPK i PI3K/AKT moguće je u potpunosti blokirati i spriječiti formaciju cjevčica iz endotela koja je inducirana nikotinom preko receptora α7 nAChR [7]. Nikotin pojačava angiogenezu tako što aktivira PKC,PI3K/AKT, ERK1/2, mTOR, i Src u tumorskim stanicama pluća **NSCLC** (engl. Non-small cell lung cancer). U tim istim stanicama nikotin može

potaknuti proangiogenetski učinak estradiola. Također je zabilježena indukcija angiogeneze u debelome crijevu potaknuta nikotinom preko β-AR i puta arahidonske kiseline [7].

5. UČINAK DUHANSKOG DIMA NA INVAZIJU I METASTAZIRANJE TUMORA

Sposobnost invazije i metastaziranja omogućava tumorskim stanicama da 'pobjegnu' od primarnog tumora i zauzmu nova područja u tijelu. Metastaza je završna i najdestruktivnija faza razvoja zloćudnih tumora. Sam proces invazije i metastaziranja je vrlo kompleksan, a njegov mehanizam vrlo slabo istražen. Unatoč tome postoje brojni dokazi kako duhanski dim uzrokuje proliferaciju stanica ali potiče i metastaziranje [7]. Kliničke i epidemiološke studije ukazuju na to da je kod pušača brže napredovanje tumora i njegovog metastaziranja.

Zasad je poznato da su ovi procesi ovisni o staničnoj i stromalnoj interakciji ali i o degradaciji izvan staničnog matriksa. E-kadherin je molekula koja je zaslužna za interakciju između dvije stanice, eksprimirana je na površini epitelnih stanica. Gubitak ekspresije E-kadherina je jedna od glavnih patoloških manifestacija koja uzrokuje metastaziranje tumora. Kronična ekspozicija stanica nikotinu uzrokuje smanjenje ekspresije vanstaničnih proteina (ECM; engl. extracellular matrix) poput E-kadherina i β-katehina s istodobnim povećanjem ekspresije fibronektina i vimentina u stanicama tumora pluća. Neke studije pokazuju da NNK-om inducirane tumorske stanice debelog crijeva migriraju u smjeru opadanja ekspresije E-kadherina [21]. Opadanje ekspresije E-kadherina je uzrokovano tako što je NNK povećao ekspresiju **Snail** i **ZEB1**, dva glavna transkripcijska represora ekspresije E-kadherina. Nikotin također preko α7 nAChR/ERK aktivacije uzrokuje povećanje ekspresije kontaktina-1, glikofosfatidilinozitolom usidrene adhezijske molekule, te tako povećava invazivnost tumorskih stanica pluća.

Drugi ključni faktor za invaziju i metastaziranje su izvanstanične proteaze [13]. Razgradnju izvanstaničnog matriksa potpomaže familija enzima zvanih matriks metaloproteinaze (**MMP**). MMP su potrebne kako bi se tumorske stanice oslobodile i 'napale' susjedna tkiva (metastazirale). Istraživanja su pokazala da nikotin povisuje ekspresiju MMP-2, MMP-9 kao i aktivatore plazminogena (COX-2). Osteopontin (**OPN**) je protein kojeg sintetiziraju različite vrste stanica, uključujući i epitelne, a izlučuju ga u izvanvanstanični prostor. Djelujući kao citokin i kao protein izvanvanstaničnog matriksa, OPN se veže za receptore na staničnoj površini i time pobuđuje prijenos signala kojim se reguliraju brojni

fiziološki i patološki procesi. Povećana ekspresija OPN-a, utvrđena u pokusima *in vitro* i u nekim humanim tumorima *in vivo*, upućuje na njezin značaj u procesu invazije i metastaziranja tumora. Njegova ekspresija može biti pojačana nikotinom. OPN služi kao dobar marker za metastaze adenokarcinoma izvodnog kanala gušterače (PDAC), osobito u populaciji pušača [7].

PAH-ovi, uključujući BaP, potiču metastaziranje tumora. Pojačanjem ekspresije COX-2 i PGE2 preko AhR-a, BaP potiče invaziju stanica tumora dojke [7]. Mješavina PAH-ova i BaP-a inducira invaziju stanica tumora i metastaziranje preko pojačavanja ekspresije MMP-a, aktiviranog proteoaznog receptora-2, fibronektina i Bcl-2 proteina. BaP povećava invazivni potencijal tumorskih stanica pluća *in vitro*. To postiže povećanjem ekspresije FGF-a (engl. fibroblast growth factor) preko p38 i ERK1/2 [7].

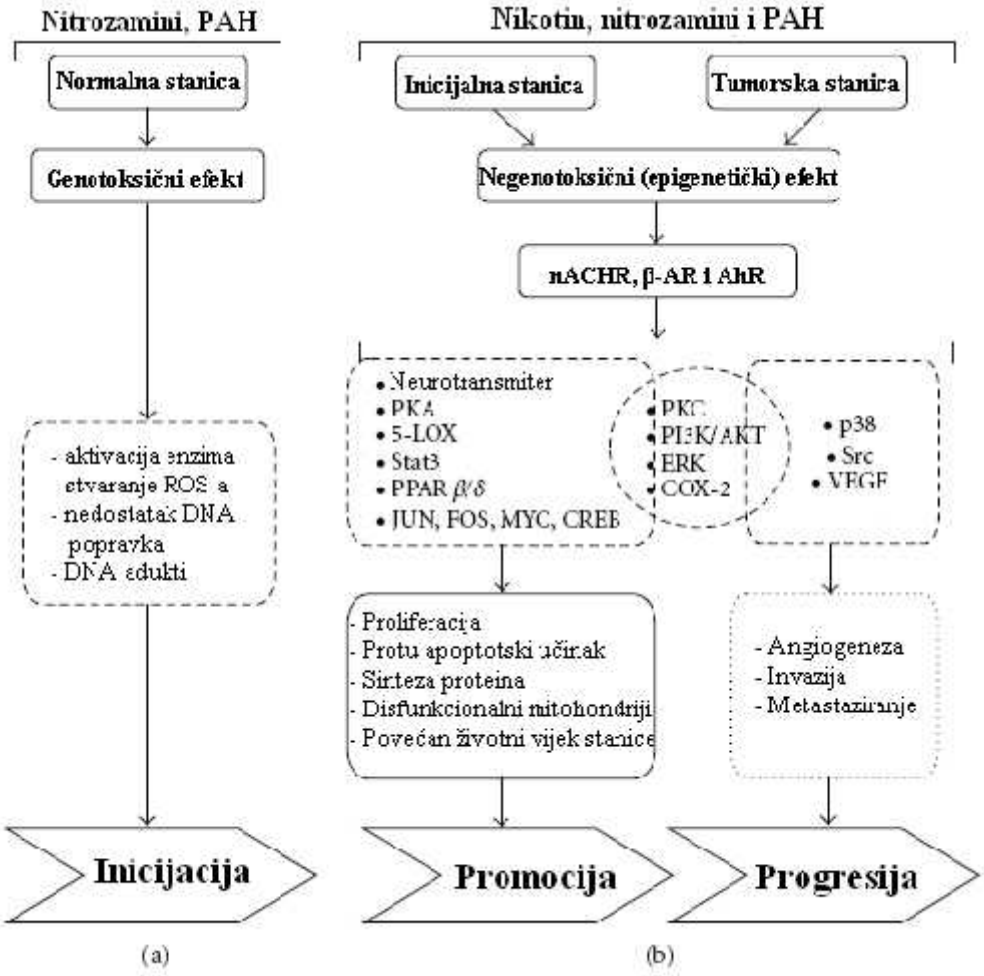
Za vrijeme metastaziranja, tumorske stanice koriste signale koji kontroliraju promet leukocita i kemokinima upravljanu migraciju stanica. Među te kemokine spadaju CXCR4 (engl. chemokine receptor type 4) i njegov prirodni ligand CXCL12 kao medijatori metastaziranja. Nikotin povećava ekspresiju nekih CXC kemokinskih receptora (CXCR2, CXCR3, CXCR4 i CCL12) u malim stanicama tumora pluća (SCLC,engl. Small Cell Lung Cancer) [22]. Stoga možemo zaključiti da nikotin stimulira migraciju tumorskih stanica i metastaziranje [21,7].

6. ZAKLJUČAK

Stanični signalni putovi igraju važnu ulogu u nastanku tumora. To su veoma složene interakcije te je zbog toga dat i shematski pregled osnovnih molekularnih mehanizama kojima duhanski dim utječe na tumorigenezu (Slika 8).

Izbjegavanje duhanskog dima je najbolji način prevencije tumorigeneze inducirane pušenjem i/ili duhanskim dimom. No nažalost danas je pušenje duhanskih proizvoda dozvoljeno iako su znanstveno dokazane štetne posljedice konzumacije duhanskog dima. Zbog toga je nužno stalno istraživati učinke duhanskog dima na zdravlje ljudske populacije. Razumijevanje procesa i mehanizama tumorigeneze uzrokovane duhanskim dimom je prvi korak ka rješenju tog globalnog problema.

Kao što mnogi prirodni spojevi iz duhana djeluju štetno, tako bi mnogi drugi prirodni spojevi mogli djelovati pozitivno u svrhu sprječavanja rasta i razvoja tumora. Mnogi prehrambeni dodaci, ali i biljni ekstrakti kao lijekovi značajno utišavaju učinke duhanskog dima te općenito pomažu u borbi protiv tumora. Potrebna su opsežnija ali perspektivna istraživanja prirodnih spojeva koji bi mogli pomoći u smanjivanju rizika dobivanja tumora. Kada se još detaljnije istraže mehanizmi i putovi kojima štetni sastojci duhana, pogotovo oni koji djeluju epigenetičkim mehanizmima, uzrokuju tumorske promijene oni će biti smjernica za pronalazak prirodnih spojeva protutumorskog djelovanja.



Slika 8. Shematski prikaz pojednostavljenih molekularnih mehanizama genotoksičnih i ne- genotoksičnih (epigenetičih) učinaka duhanskog dima, preuzeto iz [7].

a) Nitrozamini i PAH-ovi su kancerogeni genotoksičnog djelovanja

b) Epigenetički učinak duhanskog dima (nikotin, nitrozamini i PAH) u promociji i progresiji tumora. Aktivacija nAChR, β-AR i AhR popraćena je oslobađanjem neurotransmitera, aktivacijom signalnih putova (PKA, 5-LOX, Stat3 i PPAR β/ δ) i povećanom ekspresijom transkripcijskih faktora (JUN, FOS, MYC i CREB) koji reguliraju promociju tumora uzrokovanu duhanskim dimom. PKC, PI3K/AKT, ERK i COX-2 su signalni putovi koji smanjuju ekspresiju receptora i tako igraju važnu ulogu u promociji i progresiji tumora. Otpuštanje p38, Src-a, VEGF-a i NO-a uzrokuje unapređenje progresije tumora uzrokovane duhanskim dimom.

7. SAŽETAK

U ovome radu opisani su osnovni procesi nastanka i razvoja tumora te njihovi mehanizmi. Svi opisani procesi su povezani sa duhanskim dimom kao karcinogenom. Iako komponenata duhanskoga dima sa karcinogenim potencijalom ima mnogo (preko 62), većina istraživanja je usmjerena na tri komponente: nikotin, 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK) i policiklički aromatski ugljikovodici (PAH). Nikotin i NNK su specifični za duhanski dim dok su PAH-ovi spojevi koji se mogu naći i u okolišu, a nastaju industrijskim zagađenjem.

U radu su opisani genotoksični mehanizmi, ali i vrlo važni ne-genotoksični odnosno epigenetički mehanizmi tumorigeneze. Najčešće epigenetičke promjene odnose se na promjene u metilaciji DNA, modifikacije histona i nekodirajućih RNA molekula, a služe u regulaciji važnih staničnih funkcija Takve modifikacije vode do promjena u ekspresiji proteina bitnih za normalni stanični ciklus.

Mehanizmi koji uzrokuju promociju i progresiju tumora su kompleksni i uključuju mnoge molekularne mete kao što su: receptori, regulatori staničnog ciklusa, MAP kinaze, medijatori apoptoze, faktori angiogeneze te medijatori invazije i metastaziranje. Među receptorima, nAChR, β-AR i AhR su najznačajniji posrednici u tumorigenezi uzrokovanoj duhanskim dimom. Pojačana ekspresija ili aktivacija ovih receptora može rezultirati oslobađanjem neurotransmitera i faktora rasta koji sudjeluju u inhibiciji apoptoze, staničnoj proliferaciji, angiogenezi te invaziji i metastaziranju tumorskih stanica. Signalni putovi PI3K/AKT, Stat3, ERK1/2 imaju važnu ulogu u procesima tumorigeneze. To su također zajednički putovi na koje djeluju komponente duhanskog dima (nikotin, NNK i PAH). Signalni putovi poput PKC, AKT, ERK i COX-2 uključeni su u promocijski i progresijski korak tumorigeneze uzrokovane duhanskim dimom. Pretpostavlja se da bi se ove molekule mogle iskoristiti kao potencijalne mete za budući razvoj terapija i lijekova protiv tumora.

8. SUMMARY

This paper described the basic processes responsible for the emergence and development of tumors (tumorigenesis) and their mechanisms. All the described processes were associated with tobacco smoke as the carcinogen. There are many (over 62) components of tobacco smoke with carcinogenic potential; however, most research has focused on three components: nicotine, 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Nicotine and NNK are specific to tobacco smoke while the PAH compounds are found in the environment as a result of industrial pollution.

In this paper genotoxic mechanisms were described, but the focus was placed on the the very important non-genotoxic i.e. epigenetic mechanisms of tumorigenesis. The most common epigenetic changes are related to the changes in DNA methylation, histone modifications, and noncoding RNA molecule, which serve to regulate important cellular functions. These modifications lead to changes in the expression of proteins essential for normal cell cycle.

Mechanisms that cause tumor promotion and progression are complex and involve many molecular targets, such as receptors, cell cycle regulators, mitogen-activated protein kinases, apoptosis mediators, angiogenic factors, and invasion and metastasis mediators. Among the receptors, nAChR, β-AR, and AhR have the closest association with cigarette smoke-induced carcinogenesis. Over expression or activation of these receptors may result in a release of neurotransmitters and growth factors that participate in apoptosis inhibition, cell proliferation, angiogenesis, cancer cell invasion and metastasis. Signaling pathways PI3K/AKT, Stat3, and ERK1/2 play an important role in the carcinogenetic processes. They are also common paths affected by cigarette smoke components, including nicotine, NNK, and PAHs. In addition, PKC, AKT, ERK, and COX-2 signaling pathways are involved in both promotion and progression stages of tumorigenesis caused by cigarette smoke. It is assumed that these molecules could be used as potential targets for future development of therapies and medicines against tumors.

9. LITERATURA

[1] Tang W.Y.and S.M. Ho, 2007, "Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease," *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 8: 173–182.

[2] http://en.wikipedia.org/wiki/Epigenetics

[3] http://en.wikipedia.org/wiki/Carcinogenesis

[4] Boranić M., "Karcinogeneza, " Zagreb: Medicinska naklada, 2000.

[5] Carbone M. and H. I. Pass, 2004, "Multistep and multifactorial carcinogenesis: when does a contributing factor become a carcinogen?" *Seminars in Cancer Biology* 6: 399–405.

[6] DeMarini D. M., 2004, "Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review, " *Mutation Research* 567: 447–474.

[7] Chen R.J., L.W. Chang, P. Lin, and Y.J.Wang, 2011. "Epigenetic Effects and Molecular Mechanisms of Tumorigenesis Induced by Cigarette Smoke: An Overview, " *Journal of Oncology* , doi:10.1155/2011/654931.

[8] IARC, 2010, "*Some Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbones and Some Related Exposures*", *International Agency for Research on Cancer*, Lyon, France.

[9] Hecht S. S., 2006, "Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens,and mechanisms," *Langenbeck's Archives of Surgery* 6: 603–613.

[10] Nelson D. L., M. M. Cox, "Lehniger principles of biochemistry, " New York: W.H. Freeman and company, 2008.

[11] Costello J.F., C. Plass., 2001, "Methylation matters," *Journal of Medical Genetics* 38: 285–303.

[12] Akopyan G.and B. Bonavida, 2006, "Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis," *International Journal of Oncology* 4: 745–752.

[13] Hanahan D. and R. A. Weinberg, 2000, "The hallmarks of cancer,"*Cell* 1: 57–70.

[14] Grozio A., L. Paleari, A. Catassi et al., 2008, "Natural agents targeting the *α*7-nicotinic-receptor in NSCLC: a promising prospective in anti-cancer drug development," *International Journal of Cancer* 8: 1911–1915.

[15] http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/biobk/biobookmito.html

[16] Xu J., H. Huang, C. Pan, B. Zhang, X. Liu, and L. Zhang, 2007, "Nicotine inhibits apoptosis induced by cisplatin in human oral cancer cells," *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 8: 739–744.

[17] Solhaug A., M. Refsnes, and J. A. Holme, 2004, “Role of cell signalling involved in induction of apoptosis by benzo[a]pyrene and cyclopenta[c,d]pyrene in hepa1c1c7 cells,” *Journal of Cellular Biochemistry* 6: 1143–1154.

[18] Jin Q., D. G. Menter, LI. Mao, W. K. Hong, and HO. Y. Lee, 2008, “Survivin expression in normal human bronchial epithelial cells: an early and critical step in tumorigenesis induced by tobacco exposure,” *Carcinogenesis* 8: 1614–1622.

[19] Penta J.S., F. M. Johnson, J. T. Wachsman, W. C. Copeland, 2001, “Mitochondrial DNA in human malignancy,”*Mutation Research* 2: 119–133.

[20] Heeschen C., J. J. Jang, M. Weis et al., 2001, “Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis,” *Nature Medicine* 7: 833–839.

[21] Dasgupta P., W. Rizwani, S. Pillai et al., 2009, “Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines,” *International Journal of Cancer* 1: 36–45.

[22] Martınez-Garcıa E., M. Irigoyen, O. Gonzalez-Moreno et al., 2010, “Repetitive nicotine exposure leads to a more malignant and metastasis-prone phenotype of SCLC: a molecular insight into the importance of quitting smoking during treatment,” *Toxicological Sciences* 2: 467–476.