



Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Suzana Inkret

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **BIOKEMIJA KANCEROGENIH TVARI U DUHANSKOM DIMU**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: Doc.dr.sc. Morana Dulić

Zagreb, godina 2019.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

8. srpnja 2019

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2019

Mentor rada: Doc.dr.sc. Morana Dulić

Potpis:



## Sadržaj

|  |              |
|--|--------------|
| <b>§ SAŽETAK.....</b>  | <b>VII</b>   |
| <b>§ 1. UVOD.....</b>  | <b>1</b>     |
| <b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>                         | <b>2</b>     |
| <b>2.1. Opći sastav.....</b>                                   | <b>2</b>     |
| <b>2.2. Kancerogene tvari.....</b>                             | <b>2</b>     |
| 2.2.1. <i>Policiklički aromatski ugljikovodici .....</i>       | <i>3</i>     |
| 2.2.2. <i>Specifični duhanski N-nitrozamini .....</i>          | <i>5</i>     |
| 2.2.3. <i>Nespecifični N-nitrozamini.....</i>                  | <i>8</i>     |
| 2.2.4. <i>Aromatski i heterociklički aromatski amini .....</i> | <i>9</i>     |
| 2.2.5. <i>Etilen-oksidi .....</i>                              | <i>12</i>    |
| 2.2.6. <i>Aldehidi.....</i>                                    | <i>13</i>    |
| 2.2.7. <i>Arsen.....</i>                                       | <i>15</i>    |
| <b>2.3. Citokrom P450 .....</b>                                | <b>16</b>    |
| <b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>                            | <b>XVIII</b> |



## § Sažetak

Duhanski dim je kompleksna smjesa raznih vrsta spojeva, od kojih su mnoge kancerogene, što može biti posljedica genotoksičnosti, citotoksičnosti ili uzrokovanja raznih upala.

Većina karcinogena je stabilna i nereaktivna, pa ulaskom u organizam dolazi do metaboličke aktivacije najčešće pomoću enzima citokroma P450 1A2. Aktivacijom nastaju reaktivne vrste koje mogu tvoriti kovalentne adukte s DNA koji smetaju u točnom prenošenju genske informacije. Interakcija DNA s aktiviranim metabolitima dešava se pretežito na gvaninima, ali nisu ni ostale baze isključene.

Mehanizmi djelovanja i aktivacije istraživani u *in vitro* uvjetima ili na modelu miševa, zbog čega još uvijek nije u potpunosti jasan način djelovanja kancerogenih sastavnica na ljudski organizam zbog puno veće kompleksnosti u odnosu na mišji.

Ovaj rad prikazuje dosad utvrđene kancerogene sastavnice dima, njihova kemijska obilježja te način metaboličke aktivacije i kako utječu na pojavu raka.

## § 1. UVOD

Duhanski dim je aerosol koji sadrži oko 9000 identificiranih komponenti, dok se pretpostavlja da ukupan broj dostiže 100 000. U dimu je sadržano jako puno vrsta spojeva poput, ugljikovodika (jednostavnih, aromatskih i heterocikličkih), aldehida, alkohola, kiselina, amina i dr., no ni jedna vrsta ne zauzima većinski dio sastava.<sup>1</sup> Konzumiranje duhana razlog je 30% ukupne smrtnosti uzrokovane tumorom u razvijenim zemljama jer utječe na razvoj karcinoma respiratornog, probavnog i mokraćnog sustava.<sup>2</sup>

Poznato je da pušenje izaziva razne bolesti, no točan način djelovanja na organizam, inicijacija i progresija nastale bolesti, nije u potpunosti jasan zbog kompleksnosti sastava dima,<sup>1</sup> ali i postojanja raznih puteva kojim kancerogene tvari dovode organizam do istog rezultata: tumora.<sup>3</sup> Mehanizmi djelovanja mogu biti direktni; mutacijama gena DNA, ili indirektni; izazivanje raznih upala. Duhanski dim djeluje na imunološki sustav zbog čega su pušači podložniji infekcijama, te potiče lučenje tumorskih faktora,<sup>4</sup> no ni jedna komponenta samostalno ne izaziva pojavu tumora, već niz pojedinačnih mutacija s različitim uzrocima dovodi do pojave raka.<sup>3</sup> Posljedice dulje izloženosti duhanskom dimu su obično mutacije koje u krajnosti dovode do kroničnog bronhitisa, ali i nastanka raka pluća i kože.

Neki čimbenici, iako nemaju velik udio u sastavu dima, imaju znatan kancerogeni potencijal, zbog čega i u maloj količini štete organizmu.<sup>1</sup> Kancerogene sastavnice se još istražuju, no poznato je da spojevi poput aldehida, policikličkih aromatskih molekula, nitrozamina i arsena imaju najnegativniji učinak na organizam i znatno pridonose mutacijama koje uzrokuju rak ili neku kroničnu bolest.<sup>3,5-7</sup>

U ovom radu su prikazane sastavnice duhanskog dima koje su kroz istraživanja utvrđene kao one s najvećim utjecajem na organizam, odnosno s najvećim kancerogenim potencijelom. Kako potpun sastav dima nije identificiran te se mehanizmi djelovanja još istražuju, postoji mogućnost da neke neidentificirane komponente pridonose više kancerogenosti dima.<sup>5</sup>



## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Opći sastav

Duhanski dim ima kompleksan sastav aerosola nastao gorenjem duhana na zraku pri visokoj temperaturi zbog čega se mnoge komponente dima razlikuju od onih u duhanu jer gorenjem smjese komponenata nastaju kompleksnije molekule koje imaju drugačija, potencijalno kancerogena svojstva. Prve otkrivane komponente su bili alkaloidi, od kojih je nikotin u najvećem udjelu, amonijak i ugljikov monoksid, a kasnije su otkriveni spojevi koji se danas koriste u pesticidima poput arsenova oksida, toksafena, tetraetil pirofosfata, i dr.<sup>8</sup> Iako smatrani toksičnim komponentama, alkaloidi izazivaju ovisnost, no zasebno nisu razlog kancerogenosti dima, već transformacijom pomoću drugih karcinogena postaju štetni za zdravlje na način da se uz određene enzime metabolički pretvore u kancerogene spojeve ili stvaraju mikroklimu za rast tumora aktivacijom pojedinih signalnih puteva.<sup>2,9</sup> Novija istraživanja pokazuju kako dim sadrži čitav niz organskih molekula te metala, od kojih gotovo sve komponente imaju doprinos nekoj bolesti, odnosno respiratorni i kardiovaskularni su toksini te toksični u razvoju ili reprodukciji.<sup>8,9</sup>

### 2.2. Kancerogene tvari

Kancerogene tvari se definiraju kao supstance koje promoviraju karcinogenezu, odnosno nastanak raka.<sup>3</sup> Duhanski dim se sastoji od mnogo kancerogenih tvari koje na različite načine djeluju na organizam; neke od njih poput policikličkih aromatskih ugljikovodika, N-specifičnih duhanskih nitrozamina i aromatskih nitrozamina imaju značajan utjecaj na nastanak tumora dok primjerice acetaldehid koji se nalazi u većoj količini nema toliko izraženo kancerogeno djelovanje.<sup>1,3</sup> Ukupna količina karcinogena u dimu jedne cigarete varira od 1-3 mg. Načini izazivanja nastanka tumora ovise o organizmu u koji se unosi duhanski dim jer su sastavnice dima većinom nereaktivne molekule koje prolaze metaboličku aktivaciju te mogu služiti kao elektrofilna sredstva za alkiliranje nukleofilnih mjesta na DNA  $S_N1$  ili  $S_N2$  mehanizmom. Opasniji su agensi koji djeluju  $S_N1$  mehanizmom (specifični duhanski *N*-nitrozamini i nespecifični *N*-nitrozamini) jer imaju veću tendenciju alkilacije kisika na bazama DNA od  $S_N2$  agensa, a nastali adukt na gvaninu je glavni uzrok pretvorbe baze u adenin. S druge strane toksični nepolarni spojevi se prevode u spojeve topljive u vodi zbog specifičnog mehanizma

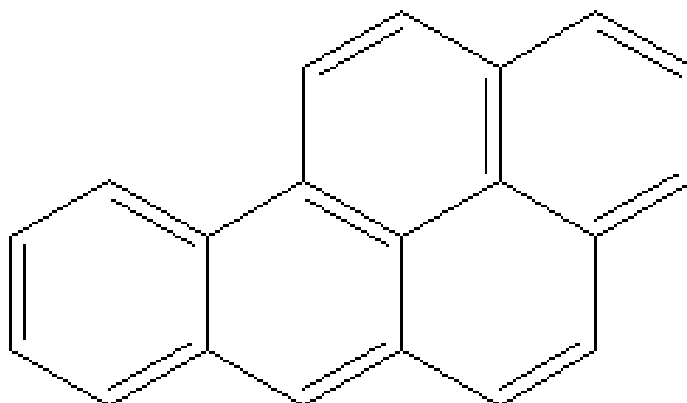
obrane od citotoksičnog efekta koji prevodi spojeve u topljive kako bi se mogle izlučiti iz organizma, no umjesto spojeva s manjom toksičnošću se dobivaju reaktivnije tvari koje mogu interagirati s DNA. Više enzimskih sustava poput citokroma P450, glutation *S*-transferaze, sulfotransferaze je odgovorno za nastanak reaktivnijih vrsta iz policikličkih aromatskih ugljikovodika te aromatskih amina i aromatskih nitrozamina.<sup>3</sup> Alkaloidi, posebice nikotin, izazivaju ovisnost te promoviraju nastanak raka aktivacijom signalnih puteva koji zatim olakšavaju rast stanica raka, migraciju i invaziju.<sup>2</sup> Metabolička aktivacija nije nužno potrebna za mutagenost: etilen-oksidi izazivaju stvaranje raznih adukata DNA i proteina direktnom interakcijom bez aktivacije.<sup>10</sup> Osim spojeva koji interagiraju s DNA i smatraju se genotoksinima, druge sastavnice duhanskog dima, poput aldehida i arsena indirektno utječu na pojavu raka izazivanjem raznih upalnih procesa, oksidativnog stresa u plućima što doprinosi zajedno s drugim komponentama karcinogenezi.<sup>7</sup> Aldehidi, iako u manjem dijelu, mogu utjecati na DNA mutacije zbog nastanka reaktivnih kisikovih vrsta biotransformacijom.<sup>11</sup>

### 2.2.1. Policiklički aromatski ugljikovodici

Policiklički aromatski ugljikovodici (PAH, engl. *polycyclic aromatic hydrocarbons*) su organski spojevi koji se sastoje od dva ili više povezanih aromatskih prstenova, a nastaju nepotpunim izgaranjem drugih organskih tvari, najčešće u industriji.<sup>12</sup> Kao jedna od prvih otkrivenih skupina kancerogenih tvari u duhanskom dimu, PAH su najopasnije istraživani kao uzročnici povećane pojave raka pluća kod pušača. Iako su u počecima istraživanja bili teško dokazivi zbog nepimjerenih metoda određivanja, danas je identificirano oko 90 osnovnih policikličkih aromatskih struktura razne veličine; od bicikličkih do dekakličkih. Nadalje je dokazano postojanje raznih mono- ili poli- metiliranih osnovnih spojeva te se njihov broj procjenjuje na 600.<sup>5</sup> Manji PAH nisu toliko opasni zasebno, no u smjesi istih može doći do reakcije pri čemu nastaju kompleksniji i toksičniji produkti. Kako se duhanski dim sastoji i od čestične i plinske faze, razlikuje se i djelovanje PAH-a u različitim stanjima na zdravlje: utvrđen je veći udio PAH-a s jače izraženom kancerogenosti vezan na čestice, dok je u plinskoj fazi veći udio manjih PAH-a.<sup>12</sup> Osim samih PAH-a, u duhanskom dimu se nalaze i neki prekursori iz kojih se mogu dobiti PAH ciklizacijom, dehidratacijom i aromatizacijom, a takvi su terpeni, fitosteroli i zasićeni alifatski ugljikovodici, pa i oni doprinose kancerogenosti dima.<sup>5</sup>

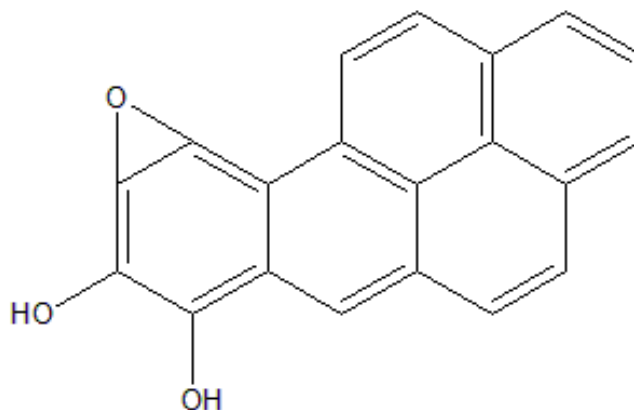
Najpoznatiji, a ujedno i najistraživaniji predstavnik PAH-a je benzo[a]piren (B[a]P)<sup>5,12</sup>, koji se sastoji od 5 kondenziranih aromatskih prstenova (slika 1). Iako nije uvijek u najvećem udjelu

naspram ostalih PAH-a najviše doprinosi kancerogenosti takve smjese spojeva,<sup>12</sup> pa će svojstva i načini djelovanja PAH-a biti prikazani na primjeru B[a]P.



Slika 1. Strukturalna formula benzo[a]pirena,  $C_{20}H_{12}$

Budući da je B[a]P aromatski spoj, ima veliku stabilnost i nije reaktivan u odsutnosti enzima, što znači da unosom u organizam dolazi do procesa metaboličke aktivacije i dobivaju se reaktivniji, potencijalno toksičniji derivati.<sup>3</sup> B[a]P je lipofilan zbog čega lako prolazi kroz stanične membrane te u stanici tvori kompleks s arilnim ugljikovodičnim receptorom i translocira se u jezgru stanice gdje dimerizira zajedno s arilnim ugljikovodičnim nuklearnim translokatorom. Novonastali dimer se veže na specifične dijelove DNA te tako inducira ekspresiju citokroma P450 koji sudjeluje u pretvorbi B[a]P u reaktivniji benzo[a]piren-7,8-diol-9,10-epoksid (BPDE) (slika 2). Produkt se može vezati na DNA, posebice na gvanin, te stvarati adukte koji dovode do mutacija gena, od koji su najvažnije mutacije gena tumorskih supresora jer su obično povezane pojavom raka pluća.<sup>13</sup> BPDE nije jedini produkt koji nastaje metaboličkom aktivacijom B[a]P, nastaje i benzo[a]piren-7,8-dihidrodiol, benzo[a]piren-kinon i dr., no najreaktivniji je i ima najizraženije djelovanje, dok drugi djeluju na različite načine i nisu toliko značajni.<sup>3,12</sup>



Slika 2. Strukturalna formula benzo[a]piren-7,8-diol-9,10-epoksida,  $C_{20}H_{10}O_3$

S druge strane, dio nastalog aktiviranog B[a]P ne interagira s DNA jer se stanica brani od nepoželjnih adukata na način da pretvara netopljive metabolite u topljive prilikom detoksikacije te oni izlaze iz organizma. Drugi način kontrole štete ako je već nastao kompleks BPDE-DNA je neki od mehanizama popravka DNA, od kojih je najznačajniji izrezivanje nukleotida zbog specifičnog djelovanja BPDE na gvaninski nukleotid. Iako postoji načini kontroliranja štete, zbog mutacija na genima tumorskih supresora, kompleks BPDE-DNA ima mogućnost izbjegavanja kontrolnih točaka ispravnosti DNA, pa ne dolazi nužno do izrezivanja promijenjenih nukleotida.<sup>13</sup>

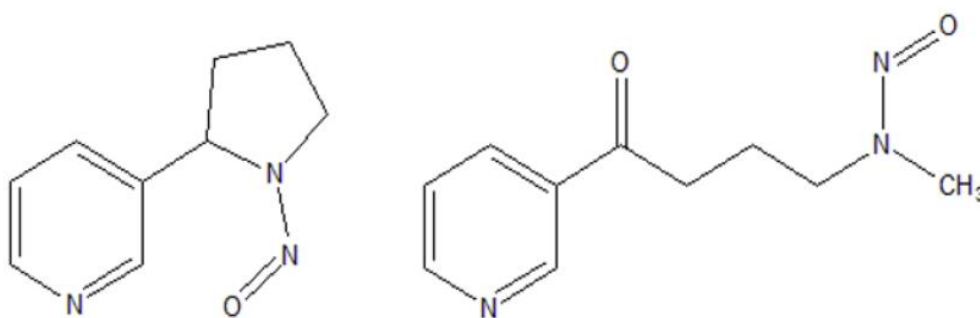
Važan učinak u izazivanju raka imaju i upalni procesi: izloženost duhanskom dimu izaziva pojavu upale u plućima, tijekom koje se aktiviraju neutrofilni koji otpuštaju reaktivne kisikove vrste (radikali ili peroksidni i superoksidni anioni) čijim djelovanjem nastaje većina štete na tkivu i DNA. B[a]P može izazvati oksidativni stres pri čemu dolazi do otpušanja reaktivnih kisikovih vrsta, ali i povećane ekspresije proupalnih citokina poput interleukina i tumorskog nekroznog faktora.<sup>13</sup>

U stanici, točnije neutrofilima postoje enzimi koji djelomično promoviraju metaboličku aktivaciju kancerogenih tvari; mijeloperoksidaza i  $\beta$ -glukuronidaza no mehanizam njihova djelovanja na kancerogene tvari nije točno utvrđen jer enzimi sudjeluju u inhibiciji metaboličke aktivacije karcinogena, ali u određenim uvjetima promoviraju istu. Iako je nepoznat način na koji sudjeluju, utvrđena je povezanost između tih enzima i ekspresije pojedinih metabolita koji sudjeluju u aktivaciji B[a]P.<sup>13</sup>

### 2.2.2. *Specifični duhanski N-nitrozamini*

Nitrozamini su spojevi koji se sastoje od NO skupine vezane na dušik u aminu, a u duhanskom dimu najčešće nastaju nitroziranjem te dodatnom redukcijom ili oksidacijom alkaloida poput nikotina, nornikotina i anatabina. Takvi nitrozamini nazivaju se specifični duhanski N-nitrozamini (TSNA, engl. *tobacco specific N-nitrosamines*) jer nastaju specifičnim nitroziranjem prilikom procesa pušenja, no isto tako prilikom sušenja i obrade duhana što objašnjava prisutnost N-nitrozamina u bezdimnom duhanu (duhanu koji nije zapaljen). Spomenuti alkaloidi su sekundarni ili tercijarni amini, stoga su pogodni za nitroziranje pomoću nitrita ili nitrata koji su također prisutni u duhanskom dimu te tako pridonose kancerogenosti istog. Količina TSNA u dimu varira od 100-1200 ng po cigareti, što je mali udio s obzirom na ukupnu količinu kancerogenih tvari u dimu jedne cigarete.<sup>14</sup>

Identificirano je nekoliko TSNA-a prisutnih u duhanskom dimu poput 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK) (slika 3) koji je predstavnik nitrozaminoketona dobivenih iz nikotina, *N'*-nitrozonornikotin (NNN) (slika 3), *N'*-nitrozoanatabin (NNT) i *N'*-nitrozoanabazin (NAB) od kojih NNK i NNN imaju najveći utjecaj na kancerogenost dima. Utvrđena je povezanost strukture *N*-nitrozamina s kancerogenosti: prisutnost metilne ili metilenske skupine na  $\alpha$  položaju s obzirom na *N*-nitrozo skupinu znatno doprinosi štetnosti jer  $\alpha$ -hidroksilacija povećava reaktivnost takvog spoja te lakše može tvoriti adukte.<sup>2,14</sup>

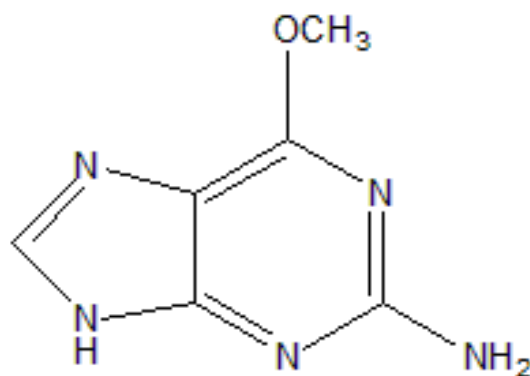


Slika 3. Strukturne formule *N'*-nitrozonornikotina (NNN-lijevo), C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O, i 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK-desno), C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

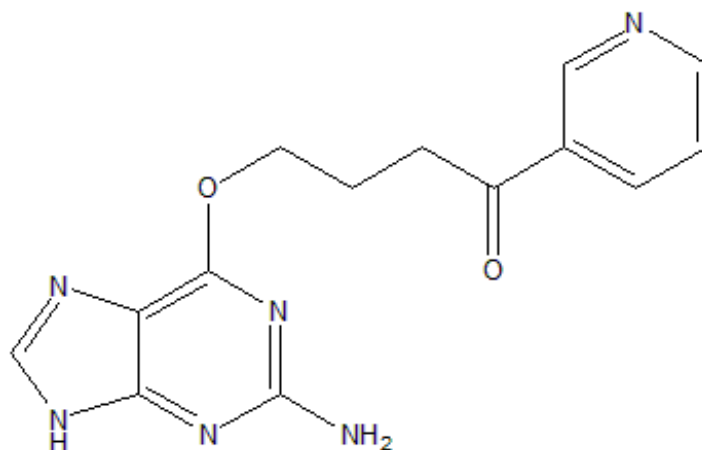
NNK i NNN prolaze aktivaciju pomoću citokroma P450 pri čemu nastaju reaktivni i nestabilni međuprodukti koji se raspadaju na manje, također reaktivne produkte. Karcinogeneza kao posljedica djelovanja NNN i NNK je proces u više koraka koji uključuju genetske promjene zbog čega posljedično dolazi do inicijacije i progresije bolesti. Reaktivni produkti nastali metaboličkom aktivacijom mogu reagirati s DNA dajući adukte, koji su razlog pojave mutacija koje se replikacijom dalje prenose i uzrok su pojave raka. S druge strane može doći do popravka DNA jednim od mehanizama, čime će se ispraviti greške i ne će doći do prijenosa mutacije, zbog čega adukti na DNA nisu nužno uzroci trajnih mutacija na DNA.<sup>2</sup>

Jedna od važnijih reakcija aktivacije NNK je  $\alpha$ -hidroksilacija na metilnom ugljikovom atomu pri čemu nastaje  $\alpha$ -hidroksimetil NNK na kojem može zbog stabilnosti doći do glukuronidacije, nakon čega spontano gubi formaldehid i nastaje piridiloksobutildiazohidroksid koji spremno reagira s DNA dajući adukte piridiloksobutilacije (POB). Zatim može doći do redukcije do 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanola (NNAL) koji također ulazi u

reakciju glukuronidacije, pri čemu nastaje NNAL glukuronid koji se  $\alpha$ -hidroksilacijom dodatno aktivira za reakciju s DNA.<sup>2,3</sup> Glukuronidacija dodatno čini metabolit topljivijim u vodi što ga čini štetnijim za organizam, no do reakcije ne dolazi odmah jer NNAL može cirkulirati kroz organizam zbog svoje stabilnosti.<sup>15</sup> S druge strane, hidroksilacija na  $\alpha$ -metilenskom ugljikovom atomu NNK daje metildiazonijev ion koji stvara adukte na gvaninu, a kao primjer služi  $O^6$ -metilgvanozin (slika 4).<sup>2,3</sup> Nadalje, na NNN aktivacijom pomoću citokroma P450, dolazi do  $\alpha$ -hidroksilacije na metilenskom ugljikovom atomu te daljnjim pretvorbama nastaju POB-DNA adukti, kao što je  $O^6$ -[4-(3-piridil)-4-oksobut-1-il]-2'-deoksigvanozin (slika 5). DNA reagira s aktiviranim produktima na način da se metilira, piridiloksobutilira ili piridilhidroksobutilira te tako daje adukte od kojih nisu nužno svi mutageni: izazivaju pretvorbu gvanina u adenin ili timin, no takve mutacije se brzo isprave izrezivanjem baze ili nukleotida i nemaju pretjerano štetan učinak. Ako ne dođe do popravka DNA nastali adukti mogu pridonositi, ali samostalno nisu dovoljni za indukciju raka: inicijacija i progresija uključuju deaktivaciju tumorskih supresorskih gena, upalne procese i promjene u tkivima zbog čega samo oko 20% pušača dobije rak pluća.



Slika 4. Strukturna formula  $O^6$ -metilgvanozina,  $C_6H_7N_5O$



Slika 5. Strukturna formula  $O^6$ -[4-(3-piridil)-4-oksobut-1-il]-2'-deoksigvanozina,  $C_{14}H_{14}N_6O_2$

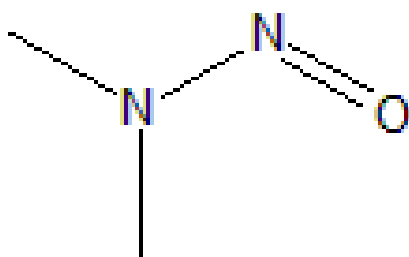
S druge strane, NNN i NNK imaju puno veći afinitet vezanja, u odnosu na nikotin, na nikotinski acetilkolinski receptor (nAChR), koji se nalazi u membranama nekih neurona i u neuromuskularnom spoju te vezanjem liganda na receptor šalje signal za otvaranje kanala u membrani. Zbog funkcije nAChR, vezanje navedenih karcinogena utječe na stvaranje mikrookoline pogodne za razvoj stanica tumora. Vezanjem NNK na nAChR dolazi do ulaska kalcijevih kationa u citosol plućnih stanica, pri čemu dolazi do depolarizacije membrane, a posljedično i do aktivacije raznih kinaza (npr. serinske i treoninske) i transkripcijskih faktora što dovodi do proliferacije stanica karcinoma.<sup>2</sup>

Nadalje prisutnost nekog upalnog stanja u tijelu tijekom pušenja znatno olakšava razvoj stanica raka uzrokovanih primarno *N*-nitrozaminima, zbog čega do pojave adenokarcinoma (najčešći kod pušača u usporedbi s ostalim vrstama raka pluća) dolazi kod ljudi s kroničnom opstruktivnom plućnom bolešću jer je afinitet vezanja NNK na nAChR još veći nego kod zdravih stanica pluća.<sup>2</sup>

Navedeni mehanizmi djelovanja *N*-nitrozamina nisu jedini mogući, no drugi putevi nisu toliko istraženi, ili nisu uopće definirani jer su *N*-nitrozamini novije otkriveni karcinogeni u sastavu duhana i duhanskog dima.<sup>2</sup>

### 2.2.3. Nespecifični *N*-nitrozamini

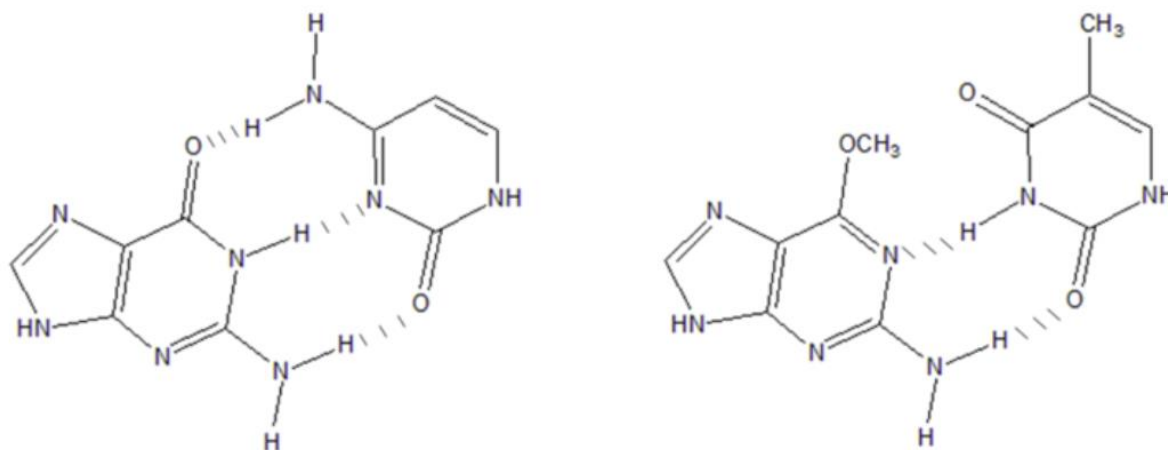
Osim specifičnih duhanskih *N*-nitrozamina, koji se dobivaju reakcijama nitroziranja alkaloida, postoje i oni koji se mogu osim u duhanskom dimu naći i u drugim izvorima, te sadrže obično jednostavnije amine, koji nisu nužno specifični za duhanski dim. Predstavnici takve vrste spojeva u duhanskom dimu su *N*-nitrozodimetilamin (NDMA) (slika 6), *N*-nitrozoetilmetilamin i *N*-nitrozopirolidin. Navedeni spojevi spadaju u lako hlapive tvari, koje se nalaze u manjim količinama u duhanskom dimu u odnosu na TSNA-e.<sup>16</sup>



Slika 6. Strukturna formula *N*-nitrozodimetilamina, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O

NDMA od navedenih predstavnika ima najizraženiju kancerogenost: utječe znatno na pojavu raka jetre. NDMA, kao i ostali spojevi, prolazi aktivaciju pomoću citokroma P450 pri čemu dolazi do  $\alpha$ -hidroksilacije te nastaje formaldehid i  $\alpha$ -hidroksi-NDMA koji se zatim spontano

raspada i nastaje metil diazohidroksid koji dalje služi kao metilirajući agens za DNA.<sup>3,15</sup> Metilacija se događa većinom na kisiku (O6) gvanina, za koju je poznato da ima svojstvo pogrešnog kodiranja, no može doći i do metilacije kisika timina koja također ima svoju ulogu u stvaranju lezija koje uzrokuju inicijaciju tumorigeneze.<sup>15</sup>



Slika 7. Prikaz Watson-Crick-ovog sparivanja gvanina i citozina (lijevo) i sparivanja gvanina metiliranog na kisiku (O6) s timinom (desno)

U usporedbi s metabolitima NNK koji su jači metilirajući agensi u plućima, aktivirani NDMA je jači DNA metilirajući agens u jetri, no s obzirom da NNK ima više različitih načina djelovanja i aktivacije, smatra se jačim tumorgenom od NDMA. Aktivirani NDMA jako brzo djeluje na organizam, za razliku od NNK koji pretvorbom u NNAL cirkulira kroz organizam prije daljnje aktivacije i reakcije s DNA.<sup>15</sup>

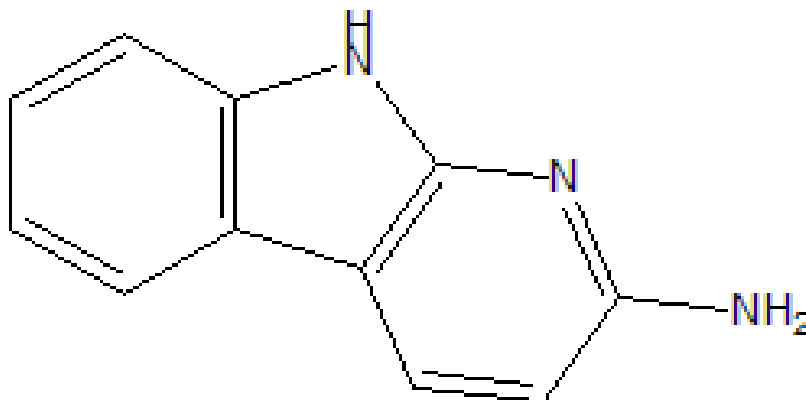
#### 2.2.4. Aromatski i heterociklički aromatski amini

Aromatski (AA) i heterociklički aromatski (HAA) amini su strukturno slične vrste spojeva koje su dokazane kao kancerogene, no izloženost njima ne mora nužno biti zbog izloženosti duhanskom dimu, već postoje i drugi značajni izvori poput kozmetičke i tekstilne industrije, ali je duhanski dim daleko najveći izvor.<sup>17</sup> Dok PAH i TSNA uzrokuju većinom rak pluća, AA i HAA su uzroci pojave raka mjehura, ali i sudjeluju u karcinogenezi gušterače, debelog crijeva i prostate.<sup>18</sup> Kvantitativnim istraživanjima dokazano je da je prisutnost AA i HAA manja u dimu koji udiše sam pušač nego u onome koji se otpušta u okoliš samim gorenjem duhana.<sup>17</sup>

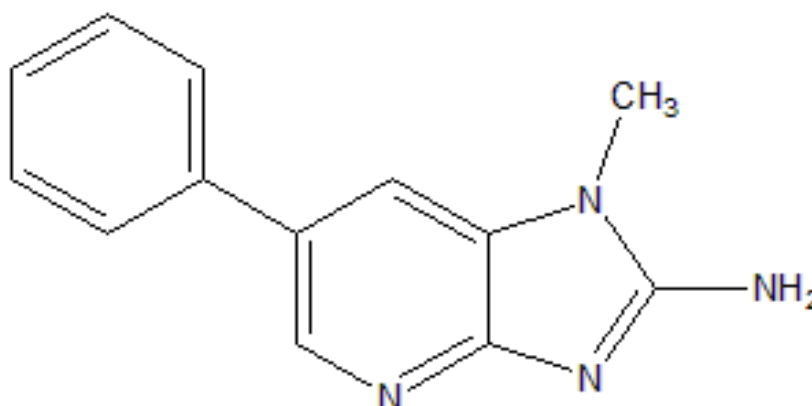
Dva kancerogena HAA koja se nalaze u značajnoj količini u duhanskom dimu su 2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol (AαC) (slika 7) i 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-p]piridin (PhIP) (slika 8) te oni prolaze metaboličku aktivaciju pomoću citokroma P450, kao i ostali HAA. Za razliku od aktivacije PAH-a i TSNA-a koja se odvija u plućnim stanicama, aktivacija HAA



odvija se u stanicama jetre te ovisi o količini dostupnog enzima P450: inhibicijom istog pomoću ljudskog autoimunog antiseruma ili 7,8-benzoflavona dolazi do smanjene aktivacije karcinogena. Za aktivaciju AA i HAA je zaslužana podvrsta enzima P450: P450 1A2, dok druge vrste ili slabo ili uopće ne aktiviraju navedene spojeve. S obzirom na to da se istraživanja provode na životinjama, razlike u ljudskom i životinjskom enzimu P450 te njihovim podvrstama je ključno za određivanje koliko će jako enzim aktivirati HAA.<sup>17-20</sup>



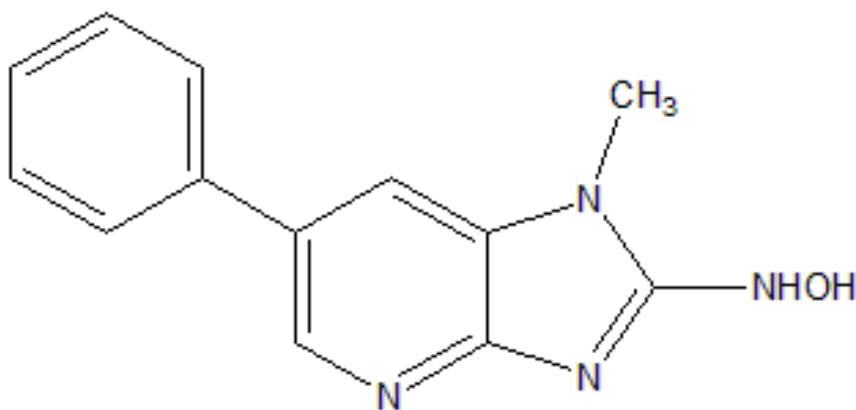
Slika 8. Strukturna formula 2-amino-9H-pirido[2,3-b]indola (A $\alpha$ C), C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>



Slika 9. Strukturna formula 2-amino-1-metil-fenilimidazo[4,5-b]piridina (PhIP), C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>

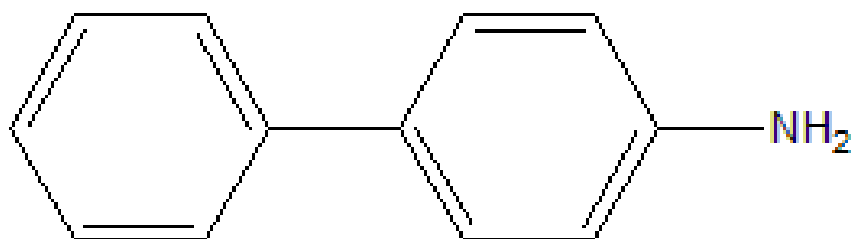
Metabolička aktivacija HAA obično uključuje *N*-hidroksilaciju pri čemu nastaju *N*-hidroksi metaboliti koji zbog svoje reaktivnosti mogu dati kancerogene DNA adukte zbog čega se HAA smatraju genotoksinima.<sup>20</sup> Metabolit koji nastaje aktivacijom PhIP je 2-hidroksiamino-1-metil-fenilimidazo[4,5-b]piridin (PhIP-HNOH) (slika 9), koji može biti supstrat za *N*-acetiltransferaze ili sulfotransferaze te tako formirati reaktivne estere koji se mogu kovalentno vezati na DNA. Aktivacija PhIP ne znači da će se nužno aktivirani metabolit vezati na DNA jer dolazi do detoksikacije, kako aktiviranih metabolita, tako i samog PhIP-a mehanizmom glukuronidacije, te se izlučuju van iz organizma preko mokraćne. Aktivacija i detoksikacija A $\alpha$ C-a ide istim mehanizmom kao i kod PhIP, no prilikom glukuronidacije *N*-hidroksiliranih metabolita može

doći do dodatne aktivacije, ako se glukuronid veže na dušik preko kisika, a ne direktno. Na taj način nastaje metabolit koji ima sposobnost kovalentnog vezanja na DNA.<sup>18</sup> Iako je poznato da aktivirani PhIP i AαC interagiraju s DNA stvarajući lezije, nisu poznata specifična mjesta na DNA za interakciju, no nastali DNA adukti uzrokuju pojavu karcinoma.<sup>18,20</sup>



Slika 10. Strukturna formula N-hidroksi-2-amino-1-metil-fenilimidazo[4,5-]piridina (PhIP-HNOH), C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O

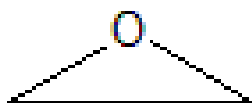
Nadalje, jedan od glavnih predstavnika aromatskih amina u duhanskom dimu je 4-aminobifenil (4-ABP) (slika 10) te su istraživanja karcinogeneze provedena na djelovanju 4-aminobifenila. Kako bi došlo do ekspresije kancerogenih svojstava spoja, potrebna je metabolička aktivacija što većinom označuje *N*-oksidaciju pomoću citokroma P450, a u manjem udjelu *N*-metilaciju ili peroksidaciju. Novonastali hidroksiarilamin može ići dalje u detoksikaciju pomoću *N*-acilacije ili stvaranjem konjugata sa acetatom, sulfatom ili glukuronatom, pri čemu sulfatni i acetatni konjugati mogu odmah reagirati s DNA, dok glukuronatni odlaze u mokraćni sustav gdje se hidroliziraju. Hidrolizom nastaje reaktivni kation koji se veže na C8 gvanina u DNA te tako nastaje *N*-(deoksigvanozin-8-il)-4-aminobifenil koji destabilizira DNA zavojnicu najviše tijekom replikacije jer kovalentno vezani karcinogen konformacijski mijenja gvanin na način da dolazi do pogrešnog sparivanja s adeninom ili gvaninom u komplementarnom lancu, što posljedično uzrokuje pogrešnu replikaciju i pojavu više mutacija koje se dalje prenose. Nastali adukt je specifičan za aromatske amine i usko je povezan s karcinogenezom u mjehuru.<sup>21</sup> Osim vezanja na C8 gvanina, arilamini daju DNA-adukte na N2 i O6 gvanina te C8 i N6 adenina.<sup>3</sup>

Slika 11. Strukturna formula 4-aminobifenila,  $C_{12}H_{11}N$ 

Iako je većina mehanizama stvaranja mutacija na DNA pomoću aromatskih amina i heterocikličkih amina poznata, način ispoljavanja tih mutacija i hoće li posljedično doći do pojave raka nije poznat, zbog čega se još uvijek vrše *in vitro* i *in vivo* eksperimenti na životinjama, te se utvrđuju razlike između djelovanja navedenih metabolita na životinjski i ljudski organizam.<sup>21</sup>

#### 2.2.5. Etilen-oksidi

Etilen-oksidi (slika 12) je najjednostavniji epoksid koji se sastoji od tročlanog prstena dva ugljika i kisika. Sastavnica je duhanskog dima i zagađenog zraka te dokazano sudjeluje u pojavi leukemije te karcinogenezi. Osim preko duhanskog dima etilen-oksidi može nastati u organizmu aktivacijom unesenog etilena, koji se često koristi za sazrijevanje voća kao biljni hormon.<sup>10</sup>

Slika 12. Strukturna formula etilen oksida,  $C_2H_4O$ 

S obzirom na napetost tročlanog prstena i nestabilnost takvog epoksida, etilen-oksidi ne treba metaboličku aktivaciju jer je reaktivan i elektrofilan zbog čega može reagirati s raznim nukleofilima, kao što su DNA i proteini.<sup>10</sup> Reakcijom s DNA dolazi do alkiliranja pretežno na gvaninskom fragmentu pri čemu nastaje N7(2-hidroksietil)gvanin u većoj količini, a alkilacija na O6 gvanina, i dušicima adenina nisu toliko učestale, no pretpostavlja se da imaju veću mutagenost od navedenog N7 gvaninskog adukta. Genske mutacije kao posljedica interakcije etilen-oksida s DNA najučestalije su plućima, T-limfocitima, koštanoj srži te su izražene u eksperimentima s miševima i štakorima izloženim etilen-oksidu.<sup>22</sup>

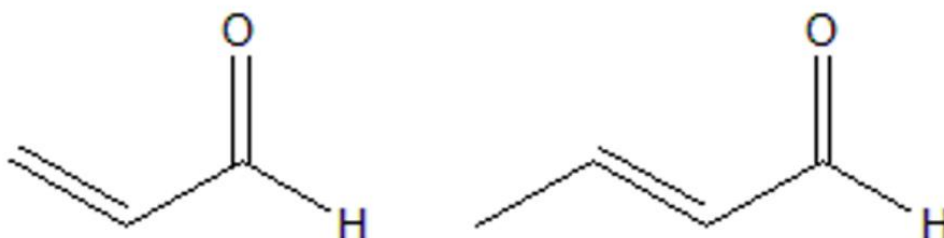
Na proteinima, posebice hemoglobinu reagira s 3 aminokiseline: cistein, histidin i N-terminalni valin, a nastali adukti su stabilni i ne popravljaju se, već dolazi do razgradnje cijelog proteina. Najizraženija od svih reakcija je ona s N-terminalnim valinom hemoglobina, pri čemu nastaje N-(2-hidroksietil)valin (HOEtVal), jer su izmjerene količine dobivenog produkta proporcionalne količini unesenog etilen-oksida ili količini unesenog etilena koji se

metabolizirao do etilen-oksida, ali su isto tako nastali DNA adukti linearno povezani unesenom količinom etilen oksida, odnosno duhanskog dima, zbog čega se HoEtVal može koristiti kao biomarker za unos etilen-oksida, odnosno duhanskog dima.<sup>10</sup> Količina HOEtVal je lako mjerljiva, pa se može koristiti za određivanje rizika od nastanka raka, najčešće limfoidnog i raka dojke.<sup>22,23</sup>

Iako nisu poznati točni mehanizmi kako etilen oksid izaziva mutagenost na više mjesta, poznato je da izaziva genotoksičnost i mutagenost što su važne predispozicije za karcinogenezu. Osim genskih mutacija, izaziva i promjene u samim kromosomima poput delecija i translokacija, što znatno mijenja funkciju tumorskih supresorskih gena. Etilen oksid ne izaziva oksidativnu štetu u organizmu, no prisutnost iste tijekom djelovanja etilen oksida znatno doprinosi njegovoj štetnosti.<sup>22</sup> Smatra se potencijalnim karcinogenom s primarnim izvorom u duhanskom dimu, što je dokazano istraživanjima u kojima su sudjelovali pušači, nepušači i pasivni pušači.<sup>10</sup>

#### 2.2.6. Aldehidi

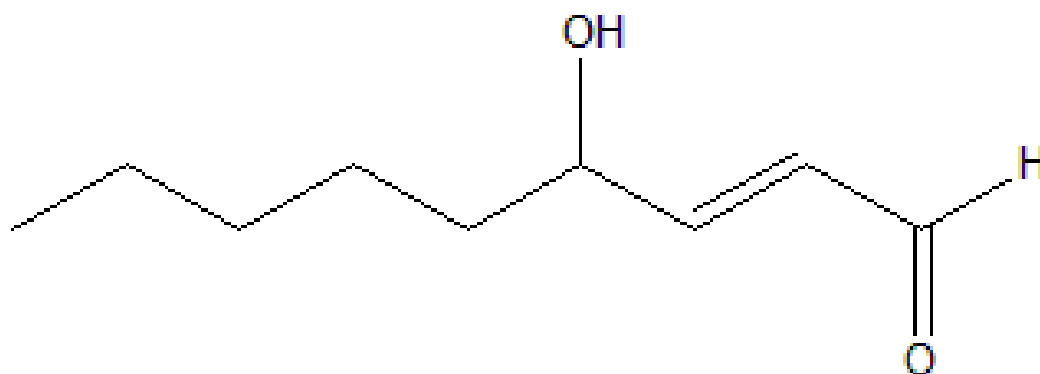
Aldehidi su široka skupina organskih spojeva s karakterističnom CHO skupinom. Nalaze se u velikim količinama u duhanskom dimu, te imaju svoju ulogu u kancerogenosti istog, a nastaju većinom tijekom gorenja duhana pri visokim temperaturama te se nalaze u plinskoj fazi duhanskog aerosola. Najzastupljeniji su akrolein (slika 12), krotonaldehid (slika 12) i acetaldehid, a najodgovorniji iz skupine aldehida za citotoksičnost i kancerogenost su nezasićeni aldehidi, odnosno akrolein i krotonaldehid, dok acetaldehid iako u velikom udjelu ne djeluje znatno kancerogeno.<sup>7</sup>



Slika 13. Strukturna formula akroleina (lijevo), C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O i krotonaldehida (desno), C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O  
Pretpostavlja se da alveolarni makrofagi igraju ključnu ulogu u pojavi kronične upale koja dovodi do pojave kronične opstruktivne plućne bolesti (COPD) zbog otpuštanja proupalnih

citokina poput tumorskog nekroznog faktora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i interleukina 8 (IL-8). Izloženost duhanskom dimu izaziva također povećane količine navedenih proupalnih citokina, zbog aktivacije aveolarnih makrofaga.<sup>4,7</sup> Istraživanjem učinka aldehida u duhanskom dimu na stanice pluća, dokazano je da akrolein izaziva prekomjernu ekspresiju IL-8 i TNF- $\alpha$ , dok krotonaldehid izaziva preveliku ekspresiju IL-8.<sup>7</sup>

Udisanjem duhanskog dima dolazi do pretvorbe spojeva, pri čemu se oslobađaju reaktivne kisikove vrste (ROS) koje stvaraju oksidativni stres u tijelu i glavni su odgovorni za pojavu COPD, a kasnije i karcinoma. ROS mogu reagirati s fosfolipidnim membranama stvarajući nusprodukte s polinezasićenim masnim kiselinama što posljedično dovodi do stvaranja reaktivnih karbonilnih vrsta poput 4-hidroksi-2-nonenala (4-HNE) (slika 14) i akroleina, koji se dobiva reakcijom ROS-a, ali se i nalazi u sastavu dima. 4-HNE je jedan od najzastupljenijih nezasićenih aldehida koji nastaju lipidnom peroksidacijom te ima sposobnost aktivacije signalnih puteva alkiliranjem DNA i biološki aktivnih proteina, zbog čega dolazi do aktivacije raznih upalnih i citotoksičnih puteva.<sup>7</sup> Zbog svoje lipofilnosti može doći do velike akumulacije 4-HNE na membranama.<sup>11</sup>



Slika 14. Strukturna formula 4-hidroksi-2-nonenala (4-HNE),  $C_9H_{16}O_2$

Nadalje, enzim koji sudjeluje u biotransformaciji aldehida je aldehyd-oksidadza koja spada u skupinu molibdenskih hidroksilaza te sadrži dehidrogenazno i oksidadzno aktivno mjesto. Dehidrogenazno mjesto koristi  $NAD^+$  kao kofator za oksidadciju aldehida do karboksilne kiseline, pri čemu nastaje NADH kojeg oksidadzno mjesto koristi za redukciju kisika te nastaju reaktivne kisikove vrste kao što je superoksidni ion i vodikov peroksid. Slobodni radikali koji nastaju procesom, mogu izazvati štetu na jetri do kakve inače dolazi zbog alkohola, ali i kancerogene mutacije na DNA koje posljedično dovode do pojave raka dojke. Osim toga, aldehyd-oksidadza ima širu specifičnost: djeluje na velik broj aldehida, ali i na neke lijekove kao

što su antitumorski agensi akridin i karboksamid te kemoterapeutske agensi što može dovesti do smanjenog ili pogrešnog djelovanja s obzirom na njihovu namjenu.<sup>11</sup>

#### 2.2.7. Arsen

Metali su, osim organskih spojeva, također u sastavu duhanskog dima, pa tako i arsen u malim količinama. Arsen se ne smatra genotoksinom jer ne postoje dokazi o interakciji s DNA, no kako kancerogenost ne označuje nužno genotoksičnost, postoje i drugi načini indirektnog utjecaja na mutacije u DNA. Neki od indirektnih načina izazivanja genotoksičnosti su interakcija s proteinima koji sudjeluju u mitotskim procesima ili promjene u kromosomima te inhibicijom enzima koji sudjeluju u popravku mutirane ili oštećene DNA.<sup>24</sup>

Arsen unosom u organizam prolazi niz metaboličkih reakcija pretvorbe iz oksidacijskog stanja +V do +III te metilaciju pri čemu nastaje dimetilarsenitna kiselina (DMA), i monometilarsenska(III) kiselina (MMA) i metilacijom trimetilarsenov(III) oksid (TMAO).<sup>6,24</sup> TMAO je metabolički produkt arsena ako u organizmu ima puno As, dok je udio u duhanskom dimu mali, ali dugom izloženosti dolazi do akumulacije i s vremenom se količine u organizmu povećavaju. TMAO nije produkt biotransformacije arsena u malim količinama jer je dimetilarsenitna kiselina loš supstrat za enzim koji katalizira metilaciju, pa je potrebno puno istog da dođe do reakcije, zbog čega je u organizmu prosječno izloženom duhanskom dimu TMAO prisutan u malim gotovo zanemarivim količinama.<sup>24</sup>

Dokazano je u različitim staničnim sustavima da je trivalentna forma arsena kancerogena: koncentracije od 0,1-10  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$  u stanicama su kancerogene, a veće koncentracije su letalne za sve vrste stanica. S druge strane peterovalentni arsen je gotovo netoksičan, ako ne dođe do redukcije: koncentracije potrebne za toksičnost su reda veličine 1  $\text{mmol}/\text{dm}^3$ , što je nemoguće postići izlaganjem duhanskom dimu.<sup>24</sup> Eksperimentalnim mjerenjem udjela arsena, u duhanu, duhanskom dimu i pepelu nastalom gorenjem duhana, dokazano je da se As u jako maloj količini prenosi iz duhana u dim jer je temperatura gorenja preniska da bi mogao ispariti, pa As većinom zaostaje u pepelu.<sup>6</sup>

Nadalje, tiolacijom trovalentnog i peterovalentnog arsena dobivaju se spojevi koji imaju sličnu citotoksičnost jer prolaze slične reakcije ulaskom u stanicu. Lako se prenose preko staničnih membrana kao i trovalentni netiolirani arsen, dok se peterovalentni netiolirani arsen gotovo i ne može prenositi. Pretpostavlja se da prolaskom kroz membranu dolazi do pretvorbe u oksigenirane spojeve koji su jako reaktivni i zbog toga toksični.<sup>24</sup>

Kancerogenost arsena temelji se na citotoksičnosti koja posljedično dovodi do regenerativne proliferacije te u konačnici do nastanka karcinoma najviše u mjehuru, plućima i koži. Iako su utjecaji transformiranog arsena dokazani *in vitro*, postoje indicacije koje upućuju na to da se jako slični procesi s relativno istim rezultatima odvijaju *in vivo*. Dokazano je da su MMA i DMA toksični i za životinjski i ljudski organizam, toksičnost ostalih derivata arsena nije u potpunosti jasna jer su eksperimenti rađeni na miševima, pa će razlike u nekim enzimima biti važne za uspoređivanje toksičnosti u ljudskom organizmu.<sup>24</sup>

### 2.3. Citokrom P450

Citokrom P450 je skupina od 30-ak enzima koji se smatraju oksidazama s miješanom funkcijom odnosno monooksidazama. Ime skupine temeljeno je na svojstvima: citokrom jer su enzimi hemoproteini, P jer su pigmentirani i 450 zbog apsorpcijskog maksimuma reduciranog kompleksa enzima i CO na 450 nm. Skupina ima oko 5000 različitih gena, no sličnost u polipeptidnom slijedu je oko 40%, dok je sličnost među proteinima koje kodira isti gen uvijek veća od 55% kod sisavaca.<sup>25</sup>

Aktivno mjesto enzima se sastoji od 4 zavojnice (D, E, I, L) i prostetičke skupine hema (slika 15), koja je vezana na distalnu zavojnicu I, proksimalnu zavojnicu L i na cistein-hem-ligandnu petlju koja sadrži aminokiselinski slijed tipičan za proteine s apsorpcijskim maksimumom 450 nm. Prepoznavanje i vezanje supstrata odvija se na 6 fleksibilnih proteinskih regija (SRS) u strukturi enzima. Smatanje P450 enzima je dosta očuvano, no postoji neka raznolikost koja omogućuje drugačije vezanje više supstrata.<sup>26</sup>



Slika 15. Nativna struktura P450 enzima s označenim regijama prepoznavanja (SRS), C- i N-krajem i zavojnicama (L, E, D, G, B')

Izvor: referenca 26

Enzimi P450 se zbog polimorfije, više načina indukcije i inhibicije vrlo razlikuju po specifičnosti i aktivnosti u određenoj okolini. Najznačajnija je skupina enzima za metabolizam lijekova, steroida i karcinogena, te varijacije u njihovim razinama utječu na kliničke posljedice konzumiranih lijekova. Hepatociti su glavno mjesto ekspresije većine enzima P450, no postoje i neki poput P450 1A1, 2B1 i 2F1 koji se većinom nalaze u plućima ili drugim tkivima. Najvažniji enzimi za aktivaciju navedenih karcinogena u radu su 1A1 i 1A2, od kojih se 1A1 nalazi u nekoliko vrsta tkiva, najviše u stanicama pluća, a 1A2 samo u hepatocitima. Najspecifičnija aktivacija pomoću enzima P450 1A1 je aktivacija benzo[a]pirena, a najbolji supstrati za 1A2 enzim su arilamini i heterociklički amini.<sup>19,27</sup>

Enzimi P450 kataliziraju raznolike reakcije poput hidroksilacije, dealkilacije, deaminacije, peroksidacije, no i mnogo drugih te imaju razne supstrate poput masnih kiselina, steroida, lijekova, organskih otapala, pesticida i karcinogena, zbog čega se funkcija i regulacija enzima komplicirane i još uvijek se istražuju.<sup>25</sup>



### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. R. Stabbert, R. Dempsey, J. Diekmann, C. Euchenhofer, T. Hagemeister, H.J. Haussmann, A. Knorr, B.P. Mueller, P. Pospisil, W. Reininghaus, E. Roemer, F.J. Tewes, D.J. Veltel, Studies on the contributions of smoke constituents, individually and in mixtures, in a range of in vitro bioactivity assays, *Toxicol. In Vitro* **42** (2017) 222-246.
2. J. Xue, S. Yang, S. Seng, Mechanisms of Cancer Induction by Tobacco-Specific NNK and NNN, *Cancers (Basel)* **14** (2014) 1138-1156.
3. R.D. Harbison, M.M. Bourgeois, G.T. Johnson, Hamilton and Hardy's Industrial Toxicology, 6.izdanje, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2015., str. 1135-1172.
4. J. Zhao, X. Li, F. Xie, Z. Yang, X. Pan, M. Zhu, P. Shang, C. Nie, H. Liu, J. Xie, Immunomodulatory effects of cigarette smoke condensate in mouse macrophage cell line, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **30** (2017) 315-321.
5. A. Rodgman, C.J. Smith, T.A. Perfetti, The composition of cigarette smoke: a retrospective, with emphasis on polycyclic components, *Hum. Exp. Toxicol.* **19** (2000) 573-595.
6. T. Iwai, K. Chiba, T. Narukawa, Arsenic Speciation and Cadmium Determination in Tobacco Leaves, Ash and Smoke, *Anal. Sci.* **32** (2016) 957-962.
7. F. Facchinetti, F. Amadei, P. Geppetti, F. Tarantini, C. Di Serio, A. Dragotto, P.M. Gigli, S. Catinella, M. Civelli, R. Patacchini, Alpha,beta-unsaturated aldehydes in cigarette smoke release inflammatory mediators from human macrophages, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **37** (2007) 617-623.
8. A. Rodgman, T.A. Perfetti, The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke, CSC Press, Florida, 2013, str. 27-50.
9. <https://www.fda.gov/tobacco-products/rules-regulations-and-guidance/harmful-and-potentially-harmful-constituents-tobacco-products-and-tobacco-smoke-established-list> (datum pristupa: 4.lipnja 2019.)
10. R. Bono, M. Vincenti, V. Meineri, C. Pignata, U. Saglia, O. Giachino, E. Scursatone, Formation of N-(2-hydroxyethyl)valine due to exposure to ethylene oxide via tobacco smoke: A risk factor for onset of cancer, *Environ. Res.* **81** (1999) 62-71.

11. T.K. Kundu, R. Hille, M. Velayutham, J.L. Zweier, Characterization of superoxide production from aldehyde oxidase: an important source of oxidants in biological tissues, *Arch. Biochem. Biophys.* **460** (2007) 113-121.
12. K.F. Chang, G.C. Fang, J.C. Chen, Y.S. Wu, Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Asia: a review from 1999 to 2004, *Environ. Pollut.* **142** (2006) 388-396.
13. Q. Shi, R.W.L. Godschalk, F.J. van Schooten, Inflammation and the chemical carcinogen benzo[a]pyrene: Partners in crime, *Mutat. Res.* **774** (2017) 12-24.
14. D. Hoffmann, K.D. Brunnemann, B. Prokopczyk, M.V. Djordjevic, Tobacco-specific N-nitrosamines and Areca-derived N-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans, *J. Toxicol. Environ. Health.* **41** (1994) 1-52.
15. S.S. Hecht, N. Trushin, A. Castonguay, A. Rivenson, Comparative tumorigenicity and DNA methylation in F344 rats by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and N-nitrosodimethylamine, *Cancer Res.* **46** (1986) 498-502.
16. A.R. Tricker, C. Ditrich, R. Preussmann, N-nitroso compounds in cigarette tobacco and their occurrence in mainstream tobacco smoke, *Carcinogenesis* **12** (1991) 257-261.
17. K.V. Pathak, T.L. Chiu, E.A. Amin, R.J. Turesky, Methemoglobin Formation and Characterization of Hemoglobin Adducts of Carcinogenic Aromatic Amines and Heterocyclic Aromatic Amines, *Chem. Res. Toxicol.* **29** (2016) 255-269.
18. T. Cai, L. Yao, R.J. Turesky, Bioactivation of Heterocyclic Aromatic Amines by UDP Glucuronosyltransferases, *Chem. Res. Toxicol.* **29** (2016) 879-891.
19. R.J. Turesky, A. Constable, J. Richoz, N. Varga, J. Markovic, M.V. Martin, F.P. Guengerich, Activation of heterocyclic aromatic amines by rat and human liver microsomes and by purified rat and human cytochrome P450 1A2, *Chem. Res. Toxicol.* **11** (1998) 925-936.
20. T. Shimada, F.P. Guengerich, Activation of amino-alpha-carboline, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and a copper phthalocyanine cellulose extract of cigarette smoke condensate by cytochrome P-450 enzymes in rat and human liver microsomes, *Cancer Res.* **51** (1991) 5284-5291.
21. A. Besaratinia, S. Tommasi, Genotoxicity of tobacco smoke-derived aromatic amines and bladder cancer: current state of knowledge and future research directions, *FASEB J.* **27** (2013) 2090-2100.

22. J. Jinot, J.M. Fritz, S.V. Vulimiri, N. Keshava, Carcinogenicity of ethylene oxide: key findings and scientific issues, *Toxicol. Mech. Methods*. **28** (2018) 386-396.
23. R. Bono, M. Vincenti, U. Saglia, C. Pignata, R. Russo, G. Gilli, Tobacco smoke and formation of N-(2-hydroxyethyl)valine in human hemoglobin, *Arch. Environ. Health*. **57** (2002) 416-421.
24. S.M. Cohen, A. Chowdhury, L.L. Arnold, Inorganic arsenic: A non-genotoxic carcinogen, *J. Environ. Sci*. **49** (2016) 28-37.
25. R. Bernhardt, Cytochrome P450 as versatile biocatalysts, *J. Biotechnol*. **124** (2006) 128-145.
26. I.G. Denisov, T.M. Makris, S.G. Sligar, I. Schlichting, Structure and chemistry of cytochrome P450, *Chem. Rev*. **105** (2005) 2253-2277
27. F.P. Guengerich, Human cytochrome P-450 enzymes, *Life Sci*. **50** (1992) 1471-1478.