

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**KARCINOGENEZA UZROKOVANA**  
**PUŠENJEM**

**SMOKING-INDUCED CARCINOGENESIS**

**SEMINARSKI RAD**

Krešimir Ferencak

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Inga Marijanović

Zagreb, 2011.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. SASTAV DUHANSKOGA DIMA .....	3
2.1. NIKOTIN (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> ).....	3
2.2. KARCINOGENE KOMPONENTE DUHANSKOGA DIMA.....	4
2.2.1. Mehanizmi ošte enja DNA i karcinogeneza organskih spojeva.....	6
2.2.1.1. Policikli ki aromatski ugljikovodici .....	6
2.2.1.2. Nitrozamini.....	7
2.2.1.3. Aromatski amini .....	9
2.2.2. DNA popravak i konverzija adukata u mutacije.....	10
2.2.3. Metali .....	11
2.2.3.1. Arsen (As) .....	11
2.2.3.2. Polonij-210 (Po-210).....	11
2.2.3.3. Kadmij (Cd).....	12
2.2.3.4. Krom (Cr).....	13
2.2.4. Oksidativna ošte enja DNA .....	14
3. ZAKLJU AK.....	16
4. LITERATURA .....	17
5. SAŽETAK .....	19
6. SUMMARY.....	20



## 1. UVOD

Štetni učinci pušenja prvi su puta dokazani tek prije pedesetak godina. Od donošenja duhana u Europu stavovi prema konzumaciji duhana bili su različiti - od toga da ga se smatralo lijekom za brojne bolesti do toga da se pušenje kažnjavalo. U prvim desetljećima 20. stoljeća pušenje je postalo društveno prihvatljivom navikom.

Sredinom 20. stoljeća započelo istraživanje radi utvrđivanja utjecaja pušenja na zdravlje. Godine 1952. engleski liječnici R. Doll i A. B. Hill (Richard Doll 1952) dokazali su na skupini od 4.000 pacijenata uzrokovano povezanost između pušenja i karcinoma bronha i pluća, te infarkta miokarda i kronične opstruktivne plućne bolesti.

Godine 1964. objavljen je izvještaj američke zdravstvene službe (Surgeon General's Report on Smoking and Health) u kojem je pušenje definitivno proglašeno rizikom i uzrokom niza bolesti koje znatno smanjuju kvalitetu života i dovode do prerane smrti (Vlasta Hrabak-Žerjavi 2007). Od tada su brojne kliničke, laboratorijske i epidemiološke studije u svijetu ispitivale učinke pušenja na zdravlje i potvrdile da konzumiranje duhana i duhanskih proizvoda, i to posebice pušenje cigareta, ali i izloženost duhanskom dimu odnosno tzv. pasivno pušenje, znatno pridonose oboljevanju i prijevremenom umiranju od niza bolesti (P.N. Lee 1986; Carlos Iribarren 1999).

Pušenje se danas smatra glavnim rizikom za nastanak raka bronha i pluća, usne šupljine, ždrijela (nazo-, oro- i hipofarngksa), nosne šupljine i paranazalnih sinusa, grkljana, jednjaka, gušterače, bubrega, mokra noga mjehura, a i planocelularni karcinom vrata maternice, rak želuca i mijeloidna leukemija i su u osoba koje puše (Vlasta Hrabak-Žerjavi 2007). Dokazi se temelje na povećanom riziku pojave bolesti kod pušača u odnosu na nepušače te s porastom trajanja ili intenziteta pušenja i smanjenju rizika uzduž i broj godina od prestanka pušenja. Procijenjeno je da je 30% svih smrti uzrokovano rakom povezano s konzumacijom duhanskih proizvoda (Ruddon 2007).

Rak je nenormalan rast stanica uzrokovan brojnim promjenama u ekspresiji gena koje vode do narušene ravnoteže proliferacije stanica i stanične smrti te se na kraju razvija u populaciju stanica koja može prodrijeti u tkiva i metastazirati na udaljenija mjesta uzrokujući značajan morbiditet i ako se ne liječi, smrti. Razvoj tumora je proces koji se odvija u više koraka. To su inicijacija, promocija i progresija. Inicijacija maligne transformacije normalne stanice nekim karcinogenom uključuje trajnu, nasljednu promjenu u genskoj ekspresiji transformirane stanice dok događaj može doći i direktno kada karcinogen reagira s DNA (nastanak

mutacija), ili indirektno ako karcinogen modulira ekspresiju gena bez direktne reakcije s DNA molekulom. Promocija je faza stani ne proliferacije te klonalne ekspanzije transformiranih stanica pod utjecajem karcinogena koji se ponašaju kao mitogeni. Progresija je postepeni razvoj genotipski i fenotipski promijenjenih stanica te uspostavljanje stani ne heterogenosti unutar tumora.

Razlikujemo dobro udne (beningne) i zlo udne (maligne) tumore. Dobro udne novotvorine su dobro diferencirane, tj. njihova struktura je vrlo sli na normalnom zdravom tkivu ili organu. Osim toga, benigne promjene sporije rastu, nemaju sposobnost prodiranja u okolna tkiva i stvaranja metastaza. Zlo udni tumor može dati sliku dobro diferenciranog, ali eš e je to slabo diferencirano tkivo. Taj manjak diferencijacije stanica je bitna karakteristika zlo udnih promjena. Maligni tumor raste brže, prodire u okolno tkivo i stvara metastaze (Ruddon 2007).

## 2. SASTAV DUHANSKOGA DIMA

Sagorijevanjem jedne cigarete nastaju oko dvije litre duhanskog dima koji sadrži preko 4000 kemijskih spojeva. Najzastupljeniji sastojci su dušik, ugljični dioksid, kisik, nikotin, ugljični monoksid, policikli i aromatski ugljikovodici, metali (kadmij, arsen, olovo, krom) i cijanovodik (Vlasta Hrabak-Žerjavi 2007). Razlikujemo dvije podkategorije dima – glavni (Mainstream smoke (MS)) i sporedni dim (Sidestream smoke (SS)). MS je dim koji osoba udahne, a SS nastaje samim gorenjem cigarete bez uvlačenja dima. Budući da obje vrste nastaju spaljivanjem duhana, kemijski sastav im je kvalitativno sličan. Međutim, postoje značajne kvantitativne razlike između MS-a i SS-a. Temperatura pri kojoj nastaje MS je puno veća od one pri kojoj nastaje SS jer osoba uvlači dim iz cigarete, a posljedica toga je činjenica da sporedni dim ne prolazi kroz filter je da SS sadrži veće količine organskih kemijskih spojeva nego MS. Zbog toga se smatra da je SS možda više kancerogen od MS-a pri istim koncentracijama (Harris 1996).

### 2.1. Nikotin ( $C_{10}H_{14}N_2$ )

Nikotin je alkaloid koji se nalazi u svim duhanskim proizvodima. U udahnutom duhanskom dimu iz pluća ulazi u krvotok te do mozga dolazi za 7-10 sekundi. Potiče brojne kemijske reakcije koje stvaraju privremeni osjećaj zadovoljstva koji popusti već nakon nekoliko minuta. Dolazi do otpuštanja adrenalina, a kao posljedica povećava se broj otkucaja srca i krvni tlak, ograničava se protok krvi u srčani mišić, osoba počinje ubrzano i plitko disati te se u krvotok otpušta glukoza. S druge strane nikotin inhibira otpuštanje inzulina iz gušterače. Inzulin je hormon odgovoran za uklanjanje viška šećera iz krvi. Osoba tada proživljava hiperglikemiju, tj. u krvi se nalazi veća razina šećera od normalne, čime se smanjuje apetit.

Način na koji nikotin izaziva ovisnost je aktivacija puteva nagrada u mozgu, slično poput nekih droga (npr. kokaina ili amfetamina). Pritom se povećava razina dopamina u mozgu, neurotransmitera odgovornog za osjećaj zadovoljstva i blagostanja. Učinci popuste već nakon nekoliko minuta, tako da osoba mora nastaviti doziranje tijekom dana kako bi održala ugodne učinke nikotina (Benowitz 2009).

## 2.2. Karcinogene komponente duhanskoga dima

Karcinogeni su agensi koji uzrokuju genetske promjene, što dovodi do formiranja kanceroznih izraslina. Spoj je označen kao karcinogen nakon što se istraživanjem na ljudima, životinjama ili stanicama utvrdi statistička vjerojatnost da izlaganje tom spoju dovodi do pojave tumora. Američka zdravstvena služba je 1989. godine objavila izvješće u kojem navodi 43 karcinogena agensa iz duhanskog dima. Prema Meunarodnoj agenciji za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer, IARC) karcinogeni su razvrstani u sljedeće tablice (Canada 1999).

**Tablica 1.** Grupa 1: karcinogeni spojevi

(Canada 1999)

4-aminobifenil
arsen
benzen
kadmij
krom
2-naftilamin
nikal
polonij-210
vinil klorid

**Tablica 2.** Grupa 2a: vjerojatno karcinogeni spojevi

(Canada 1999)

akrilonitril
benzo[ <i>a</i> ]antracen
benzo[ <i>a</i> ]piren
1,3-butadien
dibenz( <i>a,h</i> )antracen
formaldehid
<i>N</i> -nitrozodietilamin
<i>N</i> -nitrozodimetilamin

**Tablica 3.** Grupa 2b: mogu e karcinogeni spojevi  
(Canada 1999)

acetaldehyd
benzo[ <i>b</i> ]fluoranten
benzo[ <i>j</i> ]fluoranten
benzo[ <i>k</i> ]fluoranten
dibenz[ <i>a,h</i> ]akridin
dibenz[ <i>a,j</i> ]akridin
7H-dibenz[ <i>c,g</i> ]karbazol
dibenzo( <i>a,i</i> )piren
dibenzo( <i>a,l</i> )piren
1,1-dimetilhidrazin
hidrazin
indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]piren
olovo
5-metilkrizen
4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK)
2-nitropropan
<i>N</i> -nitrozodietanolamin
<i>N</i> -nitrozometiletilamin
<i>N</i> -nitrozomorfolin
<i>N'</i> -nitrozonornikotin (NNN)
<i>N</i> -nitrozopirolidin
kinolin
<i>orto</i> -toluidin
uretan (etil karbamat)



**Tablica 4.** Grupa 3: spojevi koje je nemoguće svrstati prema karcinogenezi  
(Canada 1999)

krizen
krotonaldehid
<i>N'</i> -nitrozoanabazin (NAB)
<i>N'</i> -nitrozoanatabin (NAT)

Općenito, ja i se karcinogeni poput policikličkih aromatskih ugljikovodika, (PAHs, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) nitrozamina i aromatskih amina pojavljuju u manjim količinama (1-200ng po cigareti) u odnosu na slabije karcinogene poput acetaldehida (oko 1mg po cigareti) (S.Hecht 2003).

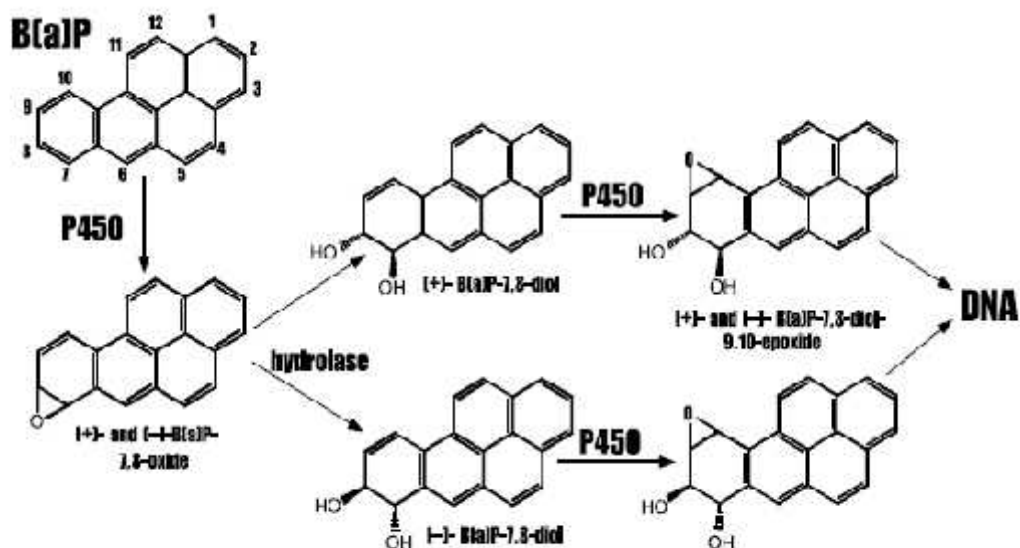
### 2.2.1. Mehanizmi oštećenja DNA i karcinogeneza organskih spojeva

Citokrom P-450 je enzim koji dodaje kisikov atom na kemijske spojeve povećavajući njihovu topljivost u vodi i pretvaraju ih u oblik u kojem se lakše izlučuju. S druge strane, neki su od intermedijera nastalih interakcijom s enzimom dosta reaktivni. Taj proces kojim se neaktivni karcinogeni pretvaraju u oblik koji se veže na DNA naziva se metabolička aktivacija. Većina karcinogena iz duhanskog dima zahtjeva metaboličku aktivaciju. Takvi metaboliti mogu reagirati s DNA te stvarati DNA adukte. (Tsutomu Shimada 2004).

DNA adukti su najvažniji biomarkeri jer su oni centralni događaj u procesu karcinogeneze inducirane duhanom i pružaju nam direktnu vezu s rakom. Važni su za određivanje doze karcinogena kod ljudi koji se izlažu ili su izloženi duhanskim proizvodima te u razumijevanju mehanizama karcinogeneze. (S.Hecht 2003).

#### 2.2.1.1. Policiklički aromatski ugljikovodici

Diol epoksidi su među najvažnijim PAH metabolitima uključeni u formiranje DNA adukata. Svaki diol epoksid ima 4 izomerne forme, a svaka forma reagira s DNA na različitim stupnjevima, bilo to egzociklička amino grupa deoksigvanozna ( $N^2$ -) ili deoksiadenozina ( $N^6$ -) (Gerd P. Pfeifer 2002). Princip metaboličke aktivacije PAH-a prikazan je na Slici 1. na primjeru benzo[*a*]pirena (B[*a*]P-a).



**Slika 1.** Metaboli ka aktivacija B[a]P enzimima citokrom P-450 i epoksid hidrolazom (Tsutomu Shimada 2004)

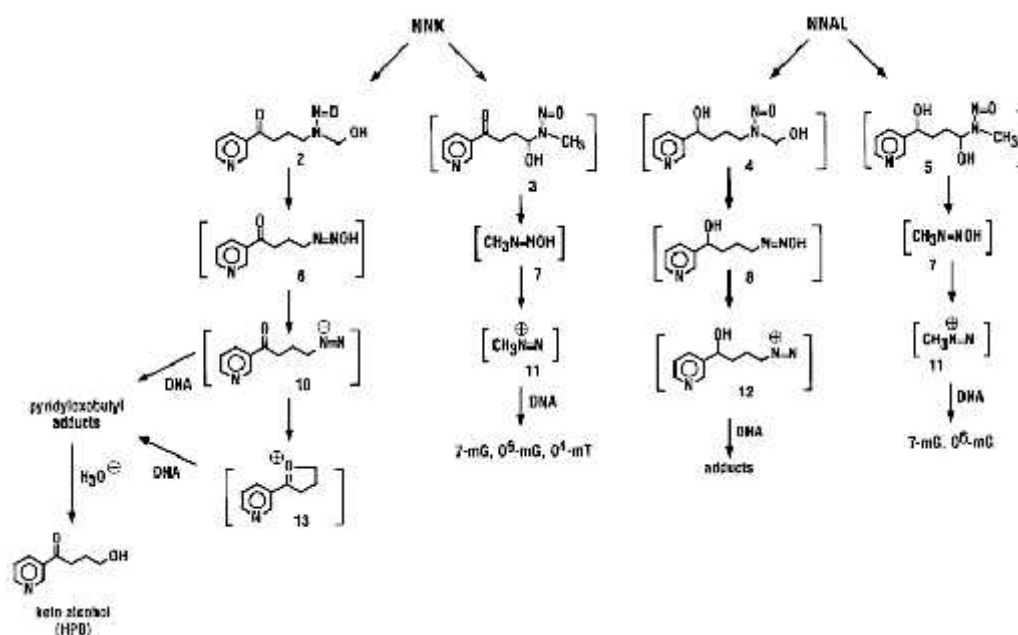
Prvi korak je oksidacija B[a]P-a pomoću enzima citokrom P-450 u (+)- i (-)-B[a]P-7,8 okside, gdje je koncentracija (+) enantiomera puno veća od (-) oblika. Zatim slijedi hidroliza ovih oksida enzimom epoksid hidrolazom u (+)- i (-)-B[a]P-7,8 diole. Konačan rezultat je aktivacija diola enzimom citokrom P-450 te nastanak (+)- i (-)-B[a]P-7,8-diol-9,10-epoksida (Tsutomu Shimada 2004).

### 2.2.1.2. Nitrozamini

Nitrozamini su grupa karcinogena koji nastaju iz nikotina i određenih alkaloida. Najjače karcinogeno djelovanje imaju 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK) te N'-nitrozonornikotin (NNN) (Stephen S. Hecht 1994).

Glavni put metaboličke aktivacije NNK-a i NNAL-a (4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanola) je  $\alpha$ -hidroksilacija, a najvažniji enzim koji katalizira tu reakciju je citokrom P-450. NNAL predstavlja glavni metabolit NNK koji nastaje redukcijom karbonilne grupe. Ova reakcija je katalizirana karbonil reduktazama. Postoje dva tipa NNK-DNA adukata: metil adukti nastali  $\alpha$ -metilen hidroksilacijom i piridiloksobutil adukti nastali  $\alpha$ -metil hidroksilacijom. Hidroksilacijom  $\alpha$ -metilena nastaje nestabilan intermedijer  $\alpha$ -metilenhidroksiNNK (Slika 2.-3), koji se potom spontano raspada na metan diazohidroksid (Slika 2.-7) (ili odgovarajućeg diazonij ion) i keto aldehid. Metan diazohidroksid metilira DNA stvarajući brojne adukate poput 7-mG, O<sup>6</sup>-mG i O<sup>4</sup>-mT.  $\alpha$ -metil hidroksilacijom nastaje  $\alpha$ -

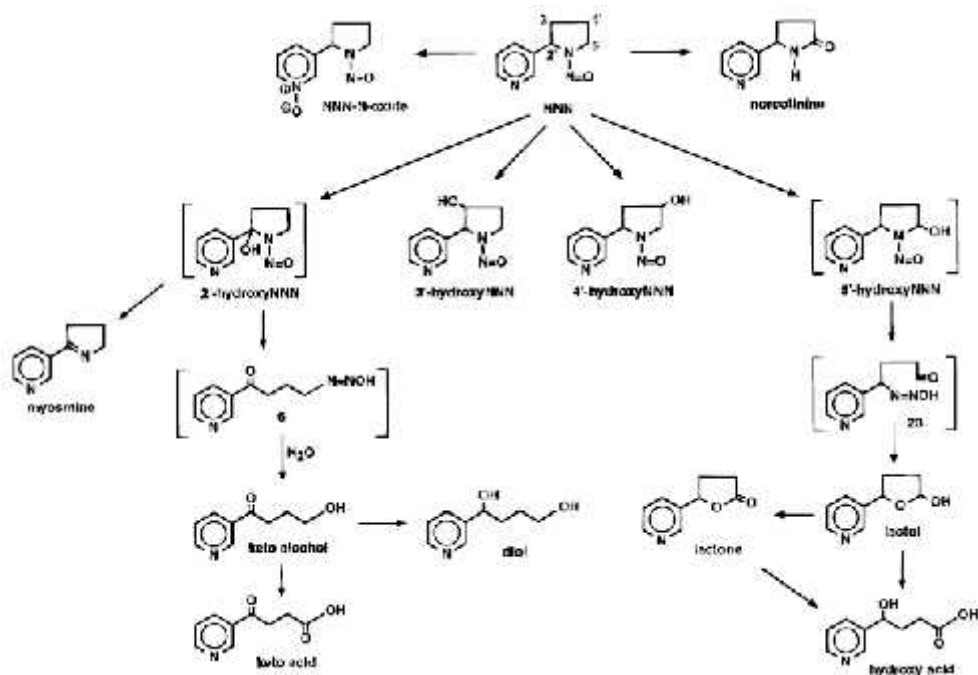
hidroksimetilNNK (Slika 2.-2). Ovaj spoj se raspada na formaldehid i 4-(3-piridil)-4-oksobutan-1-diazohidroksid (Slika 2.-6) (ili odgovaraju i diazonij ion). Nastali diazohidroksid piridiloksobutilira DNA, a može i reagirati s vodom stvaraju i keto alkohol 4-hidroksi-1-(3-piridil)-1-butanon (HPB). Strukture tih adukata još nisu u potpunosti određene, ali smatra se da su većina adukata derivati deoksigvanozina (Hecht 1998).



Slika 2. Nastajanje DNA adukata iz NNK i NNAL

(Hecht 1998)

*N*'-nitrozonornikotin (NNN) se također aktivira  $\alpha$ -hidroksilacijom (2'- i 5'-hidroksilacija).  $\alpha$ -hidroksilacijom na 2'-mjestu nastaje nestabilan intermedijer 2'-hidroksiNNN koji spontano gubi HONO te nastaje miozmin ili se otvara prsten i nastaje 4-(3-piridil)-4-oksobutan-1-diazohidroksid (Slika 3.-6), isti intermedijer koji nastaje  $\alpha$ -metilhidroksilacijom NNK-a. Konačni metaboliti nastali ovim putem su keto alkohol, diol i keto kiselina. Nastajanje adukata iz NNN-a u ovom je samo navedenim procesom. 5'-hidroksilacijom NNN-a dobiva se 5'-hidroksiNNN. Taj spoj također spontano otvara prsten i nastaje 1-(3-piridil)-4-oksobutan-1-diazohidroksid (Slika 3.-23) koji reagira i s vodom daje hidroksi aldehyd. Aldehyd ciklizira stvarajući i laktol, a kao krajnji produkti nastaju lakton i hidroksi kiselina (Hecht 1998).

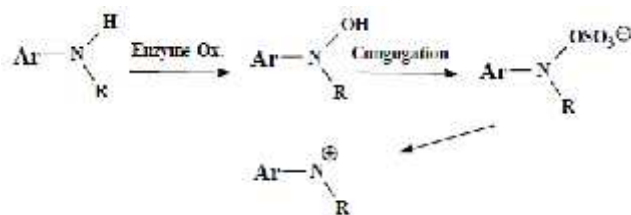


Slika 3. Metaboli ki putevi NNN-a

(Hecht 1998)

### 2.2.1.3. Aromatski amini

Metaboli ka aktivacija aromatskih amina odvija se kroz proces N-oksidacije do aril-N-hidroksilamina. Enzim koji katalizira tu reakciju je citokrom P-450. N-oksidirati se mogu slobodni amini i acetamidi te izme u ta dva procesa postoji ravnoteža. Raspodjela spojeva u ravnoteži je veoma važna jer je acetilacija amina do acetamida inaktivacijska reakcija, kao i C-oksidacija aromatskog sustava. N-hidroksilamini i N-hidroksiacetamidi mogu se dodatno aktivirati na na in da se aktivira odlazna skupina konjugacijom hidroksi skupina sa sulfatom ili acetatom. Kona ni metabolit koji reagira s DNA (ali i s RNA i proteinima) je nitrijum ion, a veže se na C-8-gvanin (Cancer 2010).



Slika 4. Metabolizam aromatskih amina

(Cancer 2010)

### 2.2.2. DNA popravak i konverzija adukata u mutacije

Sustavi popravka DNA su evoluirali tako da mogu eliminirati DNA adukate iz genoma. Primjerice, popravak izrezivanjem nukleotida eliminira DNA adukate koji se pretežno sastoje od ve ih kemijskih grupa vezanih za baze, kao i intra/interlan ana unakrsna povezivanja molekula DNA. PAH adukti se popravljaju mehanizmom izrezivanja nukleotida (Gerd P. Pfeifer 2002). Mehanizam izrezivanja baza uklanja baze na koje su vezane manje kemijske grupe ili baze fragmentirane ioniziraju im zra enjem ili oksidacijom. Direktni sustav popravka djeluje preko alkiltransferaza kojima se popravljaju krivo metilirane baze (npr.  $O^6$ -metilgvanin). Ako se ošte enje u DNA ne popravi te je prisutno tijekom replikacije dolazi do zaustavljanja DNA polimeraze na mjestu lezije (zaustavljanje replikacije i smrt stanice ili kromosomske aberacije) ili polimeraza zaobi e leziju s mogu nosti ugradnje krive baze (Gerd P. Pfeifer 2002).

Aktivacija onkogeni i inaktivacija tumor supresorskih gena dva su najvažnija doga aja uklju ena u karcinogenezu. Ti se geni mogu aktivirati, odnosno inaktivirati mutacijama koje nastaju kao rezultat DNA adukata. Jedan od brojnih onkogeni je aktivacija povezana s pušenjem je *K-ras* gen. Mutacije u jednom kodonu (kodonu 12) dovoljne su za aktivaciju (Rom 2007). U aktiviranom *K-ras* genu to su mutacije GGT→TGT (58%), GGT→GTT (16%), GGT→GAT (19%). Postoji velika specifi nost u vezi izme u DNA adukata uzrokovanih karcinogenima iz duhanskog dima i tipa mutacija koje oni uzrokuju. To su G→T transverzije (uglavnom posljedica PAH-a) i G→A tranzicije (uglavnom posljedica N-nitrozamina).

Tumor supresorski geni služe kao to ke koje reguliraju stani nu proliferaciju. Naj eš e mutiran tumor supresorski gen u stanicama raka je *p53*. *p53* ima veoma važnu ulogu u odgovoru stanice na ošte enje DNA; regulira ulazak stanice u G<sub>0</sub> fazu stani nog ciklusa te na taj na in sprje ava replikaciju nepopravljene DNA ili usmjerava stanicu u apoptozu ako je ošte enje nepopravljivo. Stanice s mutiranim *p53* genom ne e ulaziti u G<sub>0</sub> fazu ili umirati programiranom smrću, nego e se DNA replicirati zajedno s mutacijom koju je stekla. Naj eš e mutacije su to kaste mutacije gvanina na nekoliko egzona. To su G→T i G→A, isto kao i kod *K-ras* gena (Rom 2007).

Te promjene mogu dovesti do stvaranja novih fenotipova, a zbog mutacija gena koji su uklju eni u kontrolu rasta, i do transformacije stanica i nastanka tumora. Taj stalni napad na gene dovodi do šest obilježja raka: samodostatnost u signalima rasta, neosjetljivost na anti-

signale rasta, izbjegavanje apoptoze, tkivna invazivnost i metastaziranje, kontinuirana angiogeneza i neograničen replikacijski potencijal (Gerd P. Pfeifer 2002).

### 2.2.3. Metali

Određeni metali koji postoje u duhanskome dimu te su udišu tijekom pušenja mogu uzrokovati brojne bolesti. Ti metali nisu biorazgradivi pa se nakupljaju i zaostaju u tijelu u brojnim područjima dišnog sustava. Neki metali kojih nema u dimu, poput cinka (Zn), bakra (Cu), željeza (Fe) i kalcija (Ca), aktivno sudjeluju u važnim staničnim procesima. S druge strane, toksični metali su sposobni oponašati funkcije tih „korisnih” biometala te ih zamijeniti u staničnim procesima uzrokujući i nepravilno odvijanje procesa. Najštetniji metali u duhanu su arsen, polonij-210, kadmij i krom (Stavrides 2006).

#### 2.2.3.1. Arsen (As)

Arsen ne reagira direktno s DNA i uzrokuje mutacije gena (osim u manjoj mjeri kada se nalazi u visokim koncentracijama). U manjim dozama može uzrokovati pojačanje aktivnosti gena i oštećenje kromosoma te povećati mutagenezu drugim agensima na način da inhibira DNA popravak. Može biti uzrok aneuploidije jer remeti strukturu diobenog vretena na način da ubrzava polimerizaciju mikrotubula. Kronično izlaganje arsenu iducira pojavu malignih novotvorina, što je povezano s globalnom hipometilacijom DNA, smanjenom DNA metiltransferaznom aktivnošću i aktivacijom protoonkogenog *c-myc*. Suprotan način arsena, tj. metilacija, događa se na promotoru gena *p53*. Metilacija CpG sekvenci unutar promotora sprječava transkripciju gena koji je izrazito važan tumor supresorski gen čiji protein ima važnu ulogu u kontroli staničnog ciklusa, apoptozi i kontroli popravka DNA (Charles O. Abernathy 1999).

#### 2.2.3.2. Polonij-210 (Po-210)

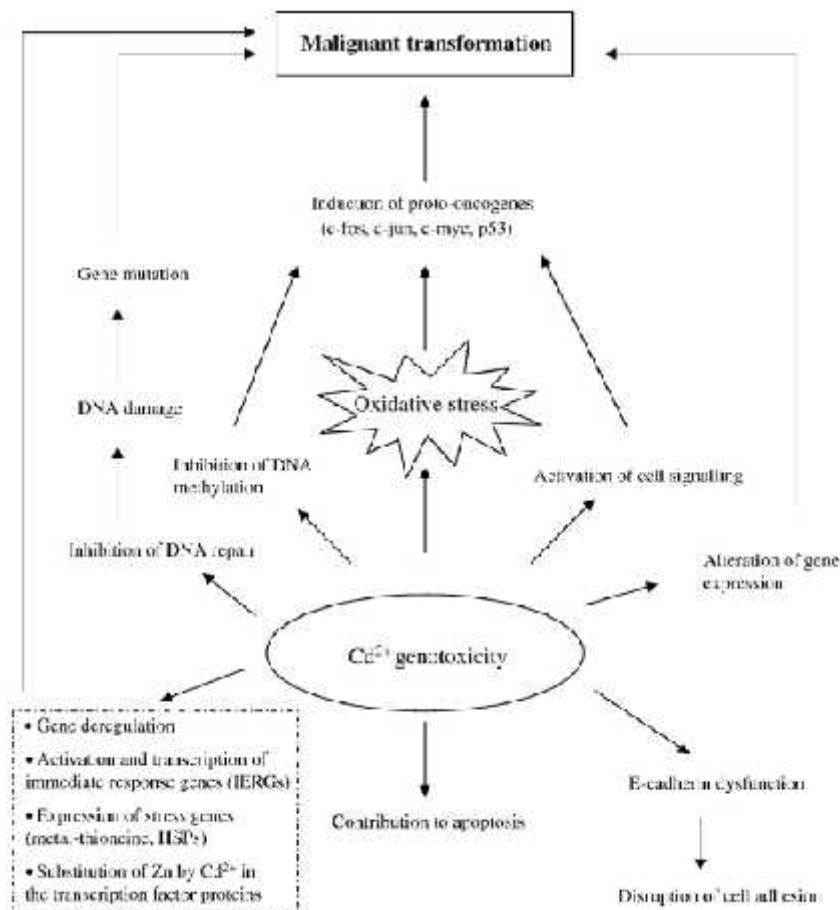
Izvor polonija su gnojiva koja se koriste u uzgoju biljaka duhana. Gnojiva su bogata radonom (Ra-226) te produktima njegova raspadanja olovom-210 (Pb-210) i polonijem-210. Listovi duhana akumuliraju Pb-210 i Po-210, a Pb-210 se s vremenom raspada u Po-210. Polonij emitira alfa čestice (ionizirajuće zračenje) koje putuju svega nekoliko centimetara u zraku. Lako se zaustavljaju brojnim zaprekama, primjerice listom papira, a u tkiva prodiru samo nekoliko mikrona. Pošto nakon emitiranja alfa čestice brzo izgube energiju, tvari koje emitiraju zračenje opasne su jedino ako se unesu u organizam udisanjem ili ingestijom (Vincenzo Zaga 2011). Općenito, ionizirajuće zračenje djeluje na DNA direktno i indirektno.

Direktni uinci zračenja su jednolanani (SSB, single strand break) i dvostrani lomovi (DSB, double strand break) molekula DNA, dok je indirektni učinak stvaranje slobodnih radikala (vidi poglavlje 2.2.4.) (Eric J. Hall 2006).

#### 2.2.3.3. Kadmij (Cd)

Razina kadmija u tijelu pušača je oko četiri puta viša u odnosu na nepušača, a životni vijek u plućima iznosi 9.4 godine. Ovaj metal je preko brojnih mehanizama uključen u karcinogenezu (Slika 5.). Kadmij aktivira ekspresiju brojnih protoonkogenih gena, poput *c-fos*, *c-jun* i *c-myc* te tumor supresorskog gena *p53* (Stavrides 2006). Pri tome Cd djeluje indirektno preko metaloproteina ili dolazi do zamjene cinkovih iona ( $Zn^{2+}$ ) kadmijevim ionom ( $Cd^{2+}$ ) u transkripcijskim faktorima. Drugi mehanizam deregulacije gena uključuje slobodne radikale (hidroksilni i superoksidni radikali, dušikov oksid, vodikov peroksid) i kalcijeve ione ( $Ca^{2+}$ ). Izlaganje kadmiju rezultira u povećanoj koncentraciji intracelularnog  $Ca^{2+}$ .  $Ca^{2+}$  direktno utječe na deregulaciju gena reagirajući i sa specifičnim elementima na promotorskim regijama.  $Cd^{2+}$  također narušava staničnu adheziju djelujući i preko E-kadherina. E-kadherin je transmembranski glikoprotein koji sudjeluje u adheziji stanica posredovanoj  $Ca^{2+}$ . Intracelularni dio E-kadherina je pomoću katenina vezan za aktin staničnog skeleta, dok se ekstracelularni dio sastoji od  $Ca^{2+}$  vezanih mjesta i područja kojim se kadherin veže za susjednu stanicu. Vezanje  $Cd^{2+}$  na kadherin smanjuje njegovu fleksibilnost i time mu smanjuje sposobnost povezivanja stanica. Ovaj događaj signalizira aktivaciju gena pomoću  $\beta$ -katenina.  $\beta$ -katenin modificira ekspresiju brojnih gena, uključujući i *c-jun* i *c-myc*.

Niske koncentracije  $Cd^{2+}$  blokiraju popravak DNA izrezivanjem baza. Također se smanjuje sposobnost stanice da se zaštiti od nastanka 8-okso-dGTP-a jer  $Cd^{2+}$  inhibira 8-okso-dGTPazu. Kao posljedica dolazi do AT→CG tranzicija (Stavrides 2006).



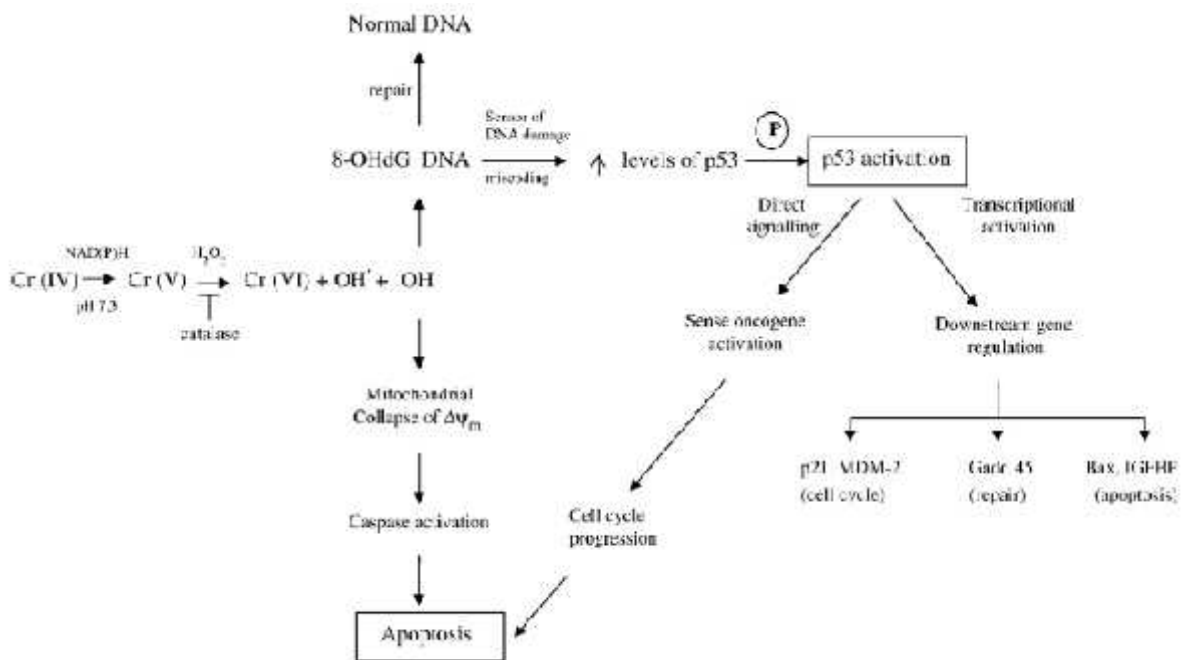
Slika 5. Mehanizam djelovanaj kadmija

(Stavriles 2006)

#### 2.2.3.4. Krom (Cr)

Krom(VI) kao kromat ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) lako prolazi kroz stani nu membranu, vjerojatno kroz ionske kanale. Zatim dolazi do intracelularne redukcije te kao produkt nastaje Cr(III). Tijekom redukcije nastaju intermedijeri Cr(V) i Cr(IV) koji reagiraju s vodikovim peroksidom ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) stvaraju i hidroksilne radikale ( $\cdot\text{OH}$ ). Radikali stvaraju DNA lomove te adukte s gvaninom, od kojih je najviše istraživan 8-hidroksideoksigvanozin (8-OHdG). Apoptoza potaknuta kromom ovisi o stanju proteina p53 koji se aktivira kao posljedica redukcije Cr(VI) i nastajanja slobodnih radikala te stanica može u i u apoptozu na dva na ina, kao što je prikazano na Slici 6. (Stavriles 2006).





Slika 6. Mehanizam djelovanja kroma

(Stavrides 2006)

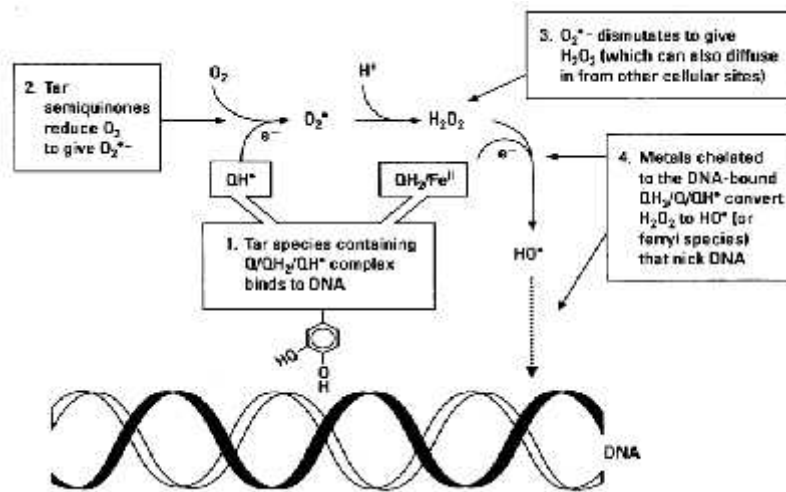
## 2.2.4. Oksidativna oštećenja DNA

Dim cigarete možemo podijeliti na dvije faze: plinsku fazu i katran. Katran je materijal koji ostane na filteru, dok plinska faza dima prođe kroz filter. Obje faze su veoma bogate slobodnim radikalima. Osoba koja puši udahne plin (Mainstream Smoke, MS), ali i estice koje prodiru kroz filter (filter ne zadržava 100%-tnu količinu estica) time se cijeli organizam izlaže oksidativnom stresu (Pryor 1997).

U plinskoj fazi se nalazi više od  $10^{14}$  ugljikovih i kisikovih radikala niske molekularne mase po jednom udahu. U dimu se također nalazi radikal dušikova oksida ( $\cdot NO$ ), a njegovom oksidacijom nastaje dušikov dioksid ( $\cdot NO_2$ ). Slobodni radikali u ovoj fazi nastaju dodatkom dušikova dioksida izoprenu ili sličnim spojevima u dimu time nastaju ugljikovi radikali, koji potom reagiraju s kisikom stvarajući oksiradikale (Pryor 1997).

Katran iz cigareta sadrži velike količine stabilnih radikala. Najvažniji među njima je niskomolekularni kinon/semikinon/hidrokinonski sustav ( $Q-QH\cdot-QH_2$ ) koji djeluje po sljedećem principu: semikinonski radikali ( $QH\cdot$ ) reduciraju kisik ( $O_2$ ) u superoksidni ion ( $O_2^{\cdot -}$ );  $O_2^{\cdot -}$  zatim dismutira te nastaje vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) koji reagira s  $Fe^{2+}$  (katran sadrži visoke koncentracije željeza) te nastaju hidroksilni radikali ( $\cdot OH$ ) (Slika 7.). Ovi jaki

oksidansi mogu dovesti do lipidne peroksidacije, oksidirati brojne proteine te cijepati DNA. Pocijepana DNA zahtjeva popravak u više koraka, što sugerira da bi popravak mogao biti sklon pogreškama (error prone repair). Tako er je dokazano da postoje specifi na mjesta na DNA na koja se vežu tvari koje sadrže kinon/semikinon/hidrokinonski kompleks (Pryor 1997).



Slika 7. Mehanizam djelovanja slobodnih radikala iz katrana na DNA  
(Pryor 1997)

Tablica 5. sumira mogu e mehanizme kojima radikali ošte uju DNA. Kao što se može vidjeti, mehanizmi su podijeljeni na 5 razreda na temelju koraka u koji su uklju eni radikali. Prvi mehanizam objašnjen je u poglavlju 2.2.1.1. te ne uklju uje slobodne radikale. Mehanizam II predstavlja aktivaciju prokracinogena (npr. BaP-a) radikalima koji nastaju zbog aktivnosti enzima prostaglanidin sintetaze (PGS-a). Rezultat aktivacije je isti kao i mehanizmom I, jedina je razlika sudjelovanje drugog enzima i slobodnih radikala. Mehanizmi III i IV koji uklju uju vezanje radikala na DNA su dosta rijetki, iako se slobodni radikali mogu vezati ako nastanu u neposrednoj blizini DNA. Nastanak oksiradikala, tj. mehanizam V je naj eš i na in na koji radikali ošte uju DNA. Duhanski dim te ioniziraju e zra enje (Po-210), stvaraju vodikov superoksid te brojne aktivirane kisikove spojeve što na kraju vodi nastanku hidroksilnih radikala.  $\cdot\text{OH}$  su zatim sposobni izvui vodikove ione iz DNA (pretvaraju i timin u hidroksimetiluracil) i vezati se na DNA (stvaraju i timin glikol). Tako er uzrokuju lomove DNA lanaca na na in da izvuku vodikov atom iz deoksiriboze. (Pryor 1987)

**Tablica 5.** Moguće uloge slobodnih radikala u karcinogenezi

(Pryor 1987)

<b>Mehanizam</b>	<b>Aktivacija prokarcinogenih radikalima</b>	<b>Radikali uključeni u vezanje karcinogenih na DNA</b>	<b>Primjer</b>
1	Ne	Ne	BaP/oksidacija citokromom P-450
2	Da	Ne	BaP/oksidacija PGS-om
3	Ne	Da	?
4	Da	Da	?
5	Oksiradikali oštećuju DNA bez vezanja karcinogenih		Ionizirajuće zračenje, duhanski dim

### 3. ZAKLJUČAK

U inke pojedinih tvari iz duhanskoga dima u procesu karcinogeneze teško je protumačiti na molekularnoj razini jer se tijelo izlaže kompleksnoj smjesi karcinogenih. Međutim, za njih dvadesetak je dokazano karcinogeno djelovanje. Najjači karcinogeni među njima su policiklički aromatski ugljikovodici, nitrozamini i aromatski amini. Oni stvaraju DNA adukte koji ako se ne poprave uzrokuju nastanak mutacija. Ako te mutacije nastaju u genima ključnim u kontrolu staničnog rasta i diferencijacije, dolazi do transformacije stanica i nastanka tumora. Brojne druge tvari, poput metala i slobodnih radikala također mogu izazvati nastanak raka, bilo direktno (npr. stvaranje DNA lomova) ili indirektno (npr. aktivacija karcinogenih poput PAH-a ili inhibicija sustava za poravak DNA). Još je važno spomenuti da je nikotin glavna supstanca u duhanu koja uzrokuje ovisnost te je stoga odgovoran što je pušenje jedan od glavnih uzroka pojave raka.

#### 4. LITERATURA

- Benowitz, N. L. (2009). "Pharmacology of Nicotine: Addiction, Smoking-Induced Disease, and Therapeutics." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*; NIH Public Access 49: 3, 4, 8.
- Canada, P. f. a. S.-F. (1999). "Tobacco Smoke Components: Carcinogens." 1, 2.
- Cancer, I. A. f. R. o. (2010). "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans." 99(Some Aromatic Amines, Organic Dyes and Related Exposures): 41-49.
- Carlos Iribarren, I. S. T., Stephen Sidney, Gary D. Friedman (1999). "Effect of cigar smoking on the risk of cardiovascular disease, chronic obstructive pulmonary disease, and cancer in men." *The New England Journal of Medicine* 340: 1773-1780.
- Charles O. Abernathy, Y.-P. L., David Longfellow, H. Vasken Aposhian, Barbara Beck, Bruce Fowler, Robert Goyer, Robert Menzer, Toby Rossman, Claudia Thompson, Michael Waalkes (1999). "Arsenic: Health Effects, Mechanisms of Actions, and Research Issues." 595.
- Eric J. Hall, A. J. G. (2006). "Radiobiology for the Radiologist." 11, 16.
- Gerd P. Pfeifer, M. F. D., Magali Olivier, Natalia Tretyakova, Stephen S. Hecht, Pierre Hainaut (2002). "Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers." *Oncogene* 21: 7437-7438.
- Harris, J. E. (1996). "Cigarette Smoke Components and Disease: Cigarette Smoke Is More Than a Triad of Tar, Nicotine, and Carbon Monoxide." *Smoking and Tobacco Control Monograph No. 7*: 59-60.
- Hecht, S. S. (1998). "Biochemistry, Biology, and Carcinogenicity of Tobacco-Specific N-Nitrosamines." *Chemical Research in Toxicology*: 560-592.
- P.N. Lee, J. C., M.R. Alderson (1986). "Relationship of passive smoking to risk of lung cancer and other smoking-associated diseases." *British Journal of Cancer* 54: 97-105.
- Pryor, W. A. (1997). "Cigarette Smoke Radicals and the Role of Free Radicals in Chemical Carcinogenicity." *Environmental Health Perspectives*: 875-879.
- Richard Doll, A. B. H. (1952). "A study of the aetiology of carcinoma of the lung." *British Medical Journal* 2: 1271-1277.

- Rom, W. N. (2007). "Environmental and Occupational Medicine." 104-105, 1546.
- Ruddon, R. W. (2007). "Cancer Biology." 4, 31, 34, 80-83.
- Stavrides, J. C. (2006). "Lung carcinogenesis: Pivotal role of metals in tobacco smoke." *Free Radical Biology & Medicine* 41: 1017-1030.
- S.Hecht, S. (2003). "Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer." *Nature Reviews Cancer*: 733-742.
- Stephen S. Hecht, S. G. C., Peter G. Foiles, et al. (1994). "Tobacco-specific Nitrosamines Biomarkers for Human Uptake and Metabolic Activation of." *Cancer Research*: 1912.
- Tsutomu Shimada, Y. F.-K. (2004). "Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1." *Cancer Science*: 2.
- Vincenzo Zaga, C. L., Kamal Chaouachi, Enrico Gattavecchia (2011). "Polonium and Lung Cancer." *Journal of Oncology*: 1, 3.
- Vlasta Hrabak-Žerjavi , V. K. (2007). "Umjesto rije i urednice teme: Pušenje - imbenik rizika za zdravlje." *Hrvatski asopis za javno zdravstvo* 3.

## 5. SAŽETAK

Pušenje je jedna od najštetnijih navika te vode i uzrok karcinoma respiratornih organa, ali i mnogih drugih. Duhanski dim sastoji se od oko 4.700 kemijskih spojeva u koje je uključeno i 50-ak kancerogenih. Kompleksnost duhanskog dima uzrokuje konfuziju u literaturi o mehanizmima kojima karcinogeni iduciraju nastanak karcinoma. Dok pojedini autori previše pojednostavljaju mehanizme, odnose i se prema dimu samo kao katranu ili impliciraju i samo na jednu komponentu (B[a]P-7,8-diol-9,10-epoksid), drugi smatraju da su mehanizmi još uvijek nepoznati.

U ovom radu prikazan je kratki pregled najvažnijih karcinogena iz duhana te na in na koji reagiraju s DNA i uzrokuju genetske promjene, tj. mutacije u onkogenima i tumor supresorskim genima. Naglasak je pritom stavljen na policikličke aromatske ugljikovodike, nitrozamine i aromatske amine koji formiraju DNA adukte kao najvažnije biomarkere u određivanju karcinogenog djelovanja spojeva iz dima. Duhanski dim također je bogat anorganskim kancerogenim tvarima poput metala i slobodnih radikala koji imaju dvojako djelovanje u karcinogenezi, reagiraju i direktno s DNA ili indirektno preko drugih spojeva.

Najvažniji nekarcinogen u dimu je nikotin. Taj spoj izaziva ovisnost zbog koje osoba nastavlja pušiti unatoč štetnim posljedicama po zdravlje. Iz tog razloga nikotin je glavni „krivac“ što je pušenje postalo glavni uzrok nastanka raka, tj. 30% svih smrti uzrokovano rakom povezano je s konzumacijom duhanskih proizvoda.

## 6. SUMMARY

Smoking is one of the most harmful habits, and the leading cause of cancer of respiratory organs, and many others. Tobacco smoke consists of approximately 4.700 of chemical compounds which include about 50 carcinogenic. The complexity of cigarette smoke causes confusion in the literature about the mechanisms by which carcinogens induce cancer development. While some authors simplify mechanisms, referring to the smoke just as tar or implying only one component (B[a]P-7,8-diol-9,10-epoxide), others believe that the mechanisms are still unknown.

This paper presents a brief overview of the most important tobacco-related carcinogens, and the manner in which they react with DNA and cause genetic changes (mutations) in oncogenes and tumor suppressor genes. Emphasis is thereby placed on the polycyclic aromatic hydrocarbons, nitrosamines and aromatic amines that forming DNA adducts as the most important biomarkers in determining the carcinogenic effects of compounds in cigarette smoke. Tobacco smoke also contains large amount of inorganic carcinogens such as metals and free radicals that have a twofold effect in carcinogenesis, reacting directly with DNA or indirectly through other compounds.

The most important non-carcinogen in smoke is nicotine. This compound is addictive and person continues to smoke despite the adverse health consequences. For this reason, nicotine is the main "culprit" as smoking has become a major cause of cancer, ie 30% of all deaths caused by cancer is associated with the consumption of tobacco products.