

RAKOTVORNO DELOVANJE KEMIKALIJ IZ OKOLJA

Metka Filipič

POVZETEK. Nastanek in razvoj raka je kompleksen večstopenjski proces. V prispevku so opisane lastnosti in osnovni mehanizmi rakotvornega delovanja kemikalij. Razlikujemo genotoksične in negenotoksične karcinogene, pri čemer genotoksični povzročijo genetske spremembe potrebne za iniciacijo in napredovanje raka, medtem ko negenotoksični pospešujejo celično proliferacijo in vplivajo predvsem na promocijo raka. Večina organskih karcinogenov deluje indirektno in potrebujejo presnovo v vmesne produkte, ki tvorijo DNK-adekte, ki v kolikor se ne popravijo, povzročijo mutacije in kromosomske aberacije. Nekateri karcinogeni, predvsem kovine, imajo genotoksične učinke prek povzročanja tvorbe prostih kisikovih zvrsti. Kemijski karcinogeni povzročajo tudi epigenetske spremembe izražanja tarčnih genov. Na osnovi poznavanja vseh teh lastnosti lahko sklepamo, da je izpostavljenost kemijskim karcinogenom pomemben nevarnostni dejavnik za nastanek raka.

UVOD

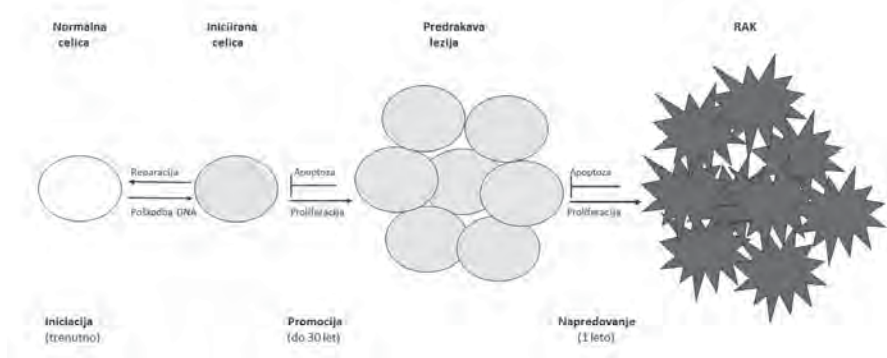
Razvoj raka je večstopenjski proces, v katerem se kopičijo genetske in epigenetske spremembe, ki na koncu privedejo do nastanka celic, ki nenadzorovano rastejo, imajo sposobnost vdiranja v sosednja tkiva in zasevanja in postanejo klinično prepoznavne kot bolezen (Slika 1).

V stopnji iniciacije nastane poškodba DNK, ki privede do mutacije in s tem spremeni genetski zapis celice, novejša raziskave pa so pokazale, da lahko do iniciacije privedejo tudi epigenetske spremembe izražanja genov. Faza promocije raka obsega selektivno klonalno rast iniciiranih celic in lahko traja več let. Nastanejo tudi nadaljnje genetske spremembe, ki v fazi napredovanja privedejo do transformacije predrakavih celic v maligne rakave celice.

Hanahan in Weinberg [1] sta opisala šest ključnih lastnosti, ki so potrebne, za nastanek raka:

1. trajno signaliziranje za celično proliferacijo,
2. neodzivnost na zaviralce rasti,
3. odpornost na celično smrt,
4. vzpostavitev neomejene sposobnosti reprodukcije (nesmrtnost celic),
5. sposobnost sprožitve angiogeneze (tvorbe novih žil) in
6. sposobnost invazije in zasevanja [2]

Te spremembe v veliki meri nastanejo kot rezultat aktivacije onkogenov in inaktivacije tumor-supresorskih genov. Onkogeni raka inducirajo [2]; celici omogočajo proliferacijo in preživetje. Nasprotno pa tumor-supresorski geni celice ščitijo pred spremembami, ki vodijo v nastanek raka [2], na primer tako, da preprečujejo proliferacijo ali pa sprožijo programirano celično smrt (apoptozo).



Slika 1. Večstopenjski model nastanka raka, ki obsega iniciacijo, promocijo in napredovanje

Onkogeni večinoma delujejo kot dominantni. Zvečana aktivnost oziroma izražanje enega alela zadostuje za aktivacijo signaliziranja za večjo rast in preživetje. Onkogeni se aktivirajo zaradi nastanka točkovne mutacije, pomnoževanja segmenta kromosoma, ki vsebuje te gene, ali pa translokacije na mesto, ki je pod nadzorom močnega promotorja. Za inaktivacijo tumor-supresorskih genov pa se smatra, da je potrebna izguba funkcije obeh alelov [3]. Zaradi tega sta navadno potrebni dve stopnji. Najpogosteje nastane točkovna mutacija v enem alelu in izguba v drugem zaradi delecije ali rekombinacije.

MEHANIZMI DELOVANJA RAKOTVORNIH KEMIKALIJ

Glede na mehanizem delovanja lahko kemijske karcinogene delimo na genotoksične in negenotoksične karcinogene (Tabela 1). Prvi povzročajo poškodbe DNK in mutacije, iniciacijo ter napredovanje raka, drugi pa spodbujajo celično delitev v tarčnem tkivu, prispevajo k fiksaciji mutacij, povzročajo spremembe v izražanju genov in spremembe nadzora rasti celic prek delovanja na razne celične receptorje (npr. hormonske, AhR, PPAR) in prispevajo k promociji raka.

Genotoksične kemijske rakotvorne snovi (ali kemijske karcinogene) lahko razdelimo na tiste, ki neposredno reagirajo z molekulo DNK, in tiste, ki potrebujejo poprejšnjo presovno aktivacijo. Primeri neposrednih karcinogenov, ki ne potrebujejo poprejšnjo presovne aktivacije, so etilen oksid, formaldehid ter številni kemoterapevtiki [4]. Indirektni karcinogeni ali prokarcinogeni pa se morajo najprej presnoviti, da nastanejo reaktivni vmesni produkti, ki reagirajo z DNK in povzročijo poškodbe. Ocenjeno je, da je okrog četrtnina karcinogenov takšnih, ki delujejo neposredno, tri četrtnine pa je prokarcinogenov [5].

Tabela 1. Značilnosti genotoksičnih in negenotoksičnih karcinogenov

Genotoksični karcinogeni

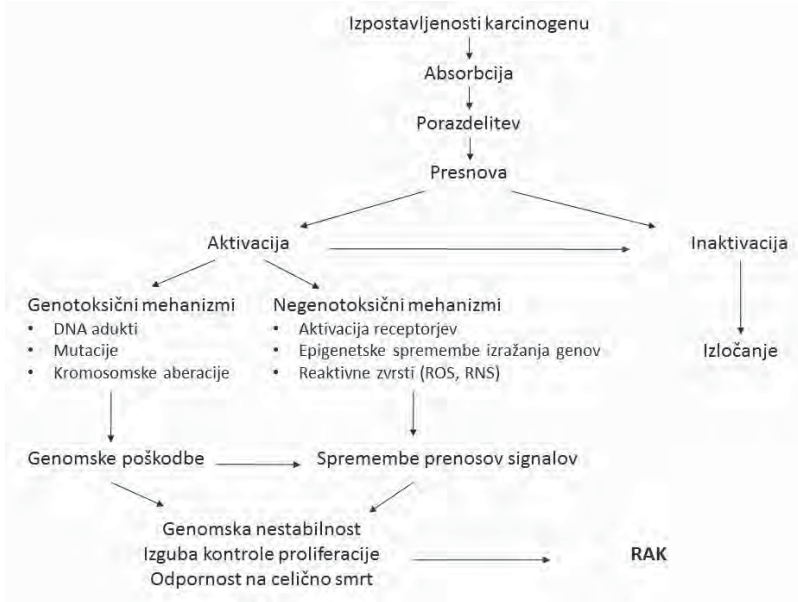
- reagirajo z DNK
 - so mutageni
 - lahko delujejo kot popolni karcinogeni
 - tumorigenost je odvisna od odmerka
 - ni mogoče določiti mejne varne doze izpostavljenosti (nimajo praga delovanja)
 - delujejo v vseh fazah nastanka in razvoja raka
-

Negenotoksični karcinogeni

- ne reagirajo z DNK
 - niso mutageni
 - vplivajo na izražanje genov
 - imajo prag delovanja
 - učinki so reverzibilni (odvisni od odmerka in trajanja izpostavljenosti)
 - tumorigenost je odvisna od odmerka
 - delujejo v fazi promocije raka
-

Kemijski karcinogeni povzročajo poškodbe DNK prek kovalentne vezave na reaktivna mesta molekule DNK, prek oksidativnih poškodb DNK zaradi povzročanja tvorbe prostih kisikovih zvrsti (ROS) in/ali prek povzročanja epigenetskih sprememb [5]. Kemijski karcinogeni oziroma njihovi presnovki morajo biti tudi sposobni vstopiti v organizem in celice, kar pomeni, da morajo biti ali lipofilni, da je omogočen pasivni transport, ali pa morajo v celice vstopiti z aktivnim transportom. Kompleksnost delovanja kemijskih karcinogenov v procesu nastanka in razvoja raka je prikazana na Sliki 2.

Genotoksični kemijski karcinogeni se kovalentno vežejo na nukleotide DNK, pri čemer nastane adukt. DNK-adekte lahko razdelimo v dve glavni skupini: i) majhne (z najhno molekulsko maso) in ii) zajetne (makromolekularne) adukte. Sam DNK-adekt ne povzroči mutacije, različni adukti pa imajo različno sposobnost povzročanja mutacij. Večina kemikalij, ki tvorijo adukte, je močno elektrofili (nepolarne molekule s pozitivnim nabojem elektrofilnega centra), ki tvorijo nereverzibilne stabilne adukte na močnih nukleofilnih mestih (nepolarizirana mesta z močnim negativnim nabojem) v molekuli DNK. Šibki elektrofili (polarizirane molekule z delnim pozitivnim nabojem), kot so aldehidi in ketoni, pa reverzibilno reagirajo s šibkimi nukleofilnimi mesti v molekuli DNK [5]. Te kemijske razlike so pomembne, saj so stabilni adukti povezani z večjo mutagenostjo. Za rakotvorni potencial pa je pomembno tudi vezavno mesto adukta na nukleotid, saj so določena vezavna mesta bolj mutagena.



Slika 2. Metabolična aktivacija kemijskih karcinogenov in njihovi genotoksični in negenotoksični učinki

Majhni, nizkomolekularni DNK-adukti najpogosteje nastanejo po alkilaciji kovalentne vezave funkcionalne alkilne skupine na molekulo DNK. Na splošno je alkilacija dušika nukleinske baze manj mutagena od alkilacije kisika. Ti adukti lahko destabilizirajo DNK, tako da nastanejo nekodirajoča abazična mesta, ali pa lahko povzročijo vgradnjo napačne baze [6]. V to skupino spadajo N-nitrozo spojine in nitrozamini, ki nastajajo tudi endogeno, pa tudi bojni strup iperit. Nekatere alkilirajoče kemikalije pa povzročijo nastanek prečnih vezi med verigama DNK, ki zavrejo transkripcijo in replikacijo DNK [7] in lahko med popraviljanjem povzročijo nastanek dvoverižnih prelomov DNK [8]. Tako deluje na primer kemoterapevtik cisplatin.

Veliki adukti pa večinoma ustavijo transkripcijo in replikacijo DNK in povzročajo prelome kromosomov in velike delecije, kar privede do izgube heterozigotnosti [5]. Epidemiološke in eksperimentalne raziskave potrjujejo povezave med tvorbo DNK-aduktov in nastankom raka [9, 10]. V to skupino spada večina genotoksičnih organskih karcinogenov; tipični primeri so benzo(a)-piren in drugi poliaromatski ogljikovodiki, heterociklični aromatski amini, aflatoksin B1 idr.

Nekatere kemikalije ali njihovi presnovki povzročajo oksidativne poškodbe DNK, ki so pogosto posledica delovanja stranskih reaktivnih produktov, ki nastajajo v presnovi. Oksidativne poškodbe so odgovorne za velik del mutacij [11]. Pretežno jih povzročajo proste reaktivne zvrsti (reaktivne molekule ali ioni z neparnimi elektroni), kot so reaktivne kisikove zvrsti (*Reactive Oxygen Species*, ROS) [12]. Nastanek ROS je posledica neposrednega delovanja kemikalij ali pa posrednega, prek povzročanja vnetij. ROS povzročijo razne molekularne poškodbe, vključno s prelomi verig DNK in kovalentnimi vezmi na nukleinske baze [12]. Dioksini in poliklorirani bifenili so primer karcinogenov, ki povzročajo mutacije s tvorjenjem ROS [13].

Poleg številnih organskih snovi so rakotvorne tudi nekatere kovine, ki jih Mednarodna agencija za raziskovanje raka (IARC) uvršča med karcinogene in verjetno karcinogene za ljudi. Mednje spadajo kadmij, nikelj, kobalt, svinec, vanadij, berilij, arzen in krom. Mehanizmi rakotvornega delovanja kovin so manj raziskani kot mehanizmi delovanja organskih spojin. Mehanizmi delovanja kovin se sicer razlikujejo, večinoma pa povzročajo genetske in epigenetske spremembe, spremembe celične proliferacije in presnove, spremenjene signalne poti ter tvorbo ROS [14]. Kadmij, arzen, nikelj, kobalt in svinec pa tudi kompetitivno inhibirajo encime s cinkovim obročem, med katere spadajo številni encimi, vključeni v popraviljanje poškodb DNK [15]. Posledica je inhibicija popravila poškodb DNK in s tem večja verjetnost, da poškodbe privedejo do mutacij.

V nastanek in razvoj raka niso vključene le mutacije tarčnih genov, ki izvirajo iz poškodb DNK. Novejše raziskave kažejo, da imajo pri tem procesu pomembno vlogo epigenetske spremembe. Epigenetske spremembe so stabilne, dedne, in privedejo do sprememb v izražanju genov [16]. Veliko je dokazov, da izpostavljenost okoljskim dejavnikom spremeni epigenetsko regulacijo genoma, čeprav mehanizmi še niso povsem raziskani. Epigenetske spremembe delujejo na izražanje genov, pri čemer zaporedja DNK niso spremenjena. Za sedaj sta najboljše raziskana mehanizma metilacija DNK in modifikacija histonov.

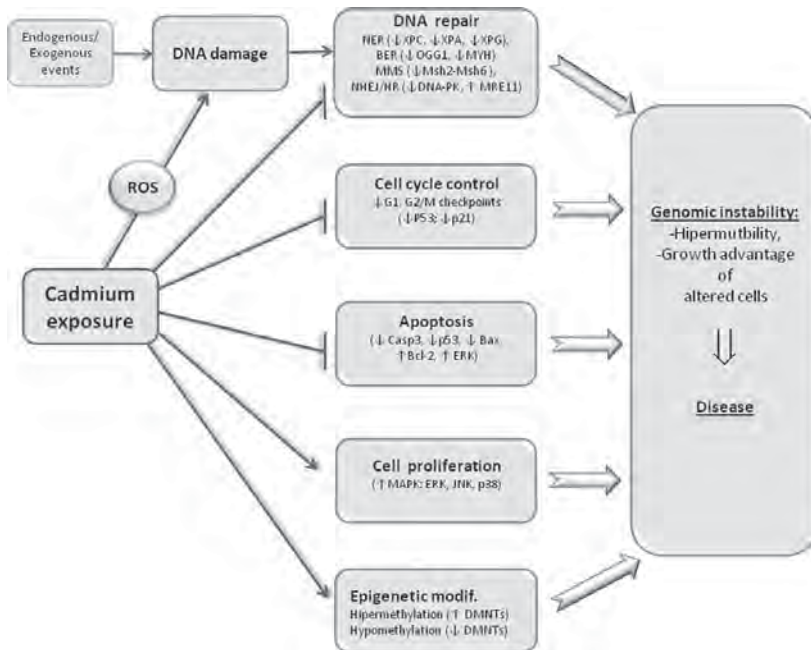
Metilacija DNK je normalen fiziološki proces, pri katerem se metilna skupina (CH₃) kovalentno veže na peti ogljikov atom pirimidina, pri čemer nastane 5-metilcitozin (5-meC). Reakcijo katalizira encim DNK-metiltransferaza [17]. Pretežno so metilirani CpG-dinukleotidi, ki so pogosto locirani v promotorskih regijah genov: tako imenovani CpG-otoki (*CpG islands*, CGI). Metilirani CGI praviloma zavrejo transkripcijo gena. Spremenjeni vzorci metiliranosti so značilni za vse vrste raka. Metilacija DNK deluje na razvoj raka na tri glavne načine: i) splošna hipometilacija, ii) hipermetilacija promotorjev in iii) indukcija točkovnih mutacij [17]. Splošna hipometilacija je zgodnji dogodek pri razvoju raka, ki lahko povzroči večje izražanje onkogenov, povezana pa je tudi z izgubo genomske stabilnosti [17]. Metilacija promotorja je povezana z

utišanjem izražanja genov in se smatra, da je glavni mehanizem inaktivacije tumor-supresorskih genov [18]. Ocenjeno je, da ima večina tumorjev 100–400 hipermetiliranih promotorskih regij [18]. Številne okoljske in poklicne izpostavljenosti so povezane s spremembami metilacije DNK. Povzročajo jih tako ionizirajoča sevanja kot številne organske in anorganske kemikalije, od katerih imajo številne pleiotropne učinke. Če metilirani CpG niso popravljeni, lahko povzročijo tudi točkovne mutacije.

Na izražanje genov delujejo tudi spremembe histonov, katerih posledice so spremembe zgradbe kromatina, ki neposredno vpliva na transkripcijo genov, replikacijo DNK, popravljanje DNK in organizacijo kromosomov [18]. Histoni so proteini, ki jih sestavlja osem podenot, okrog katerih je ovita DNK in tvori zgradbo, ki se imenuje nukleosom [18]. Spremembe lahko nastanejo na različnih podenotah in vključujejo acetilacijo, metilacijo, fosforilacijo ali glikozilacijo na N-koncih proteinov, ki štrlijo iz nukleosoma [18]. Acetilacija histonov je povezana z aktivacijo transkripcije, medtem ko so druge spremembe manj raziskane. Raziskave so pokazale, da so okoljske in poklicne izpostavljenosti, povezane s spremembami histonov, predvsem izpostavljenost kovinam. Krom na primer povzroči utišanje genov z delovanjem na encime, ki katalizirajo acetilacijo histonov [19].

RAKOTVORNO DELOVANJE KADMIJA

Kadmij (Cd) je vsepovsod navzoče onesnaževalo okolja. Najdemo ga v zraku, zemlji in vodi, zaradi zelo dolgega razpolovnega časa pa se akumulira v rastlinah in v tkivih živali in ljudi. Mednarodna agencija za raziskovanje raka ga klasificira kot karcinogenega za ljudi (Skupina 1); povzroča pljučnega raka, povezujejo pa ga tudi z nastankom ledvičnega in jetrnega raka, raka mehurja, prostate, slinavke in hematopoetskega sistema. Molekularne raziskave mehanizmov rakotvornega delovanja so pokazale njegovo kompleksno delovanje, ki se izraža v vseh stopnjah nastanka raka (Slika 3). Neposrednih poškodb DNK kadmij ne povzroča, sproža pa tvorbo ROS, ki povzročijo poškodbe DNK in posledično mutacije. Še pomembnejši mehanizem je zaviranje popravljanih mehanizmov DNK in apoptoze. Posledica je kopičenje nepopravljenih poškodb DNK, kar zveča pogostost mutacij in vodi v genomsko nestabilnost. V fazi promocije kadmij spreminja izražanje genov tako prek epigenetskih mehanizmov (vpliva na metilacijo DNK) kot tudi z delovanjem na signalne poti, ki uravnavajo celično proliferacijo [20].



Slika 3. Mehanizem karcinogenega delovanja kadmija prek indukcije poškodb DNK, inhibicije popravljalnih mehanizmov DNK, nadzora celične rasti in apoptoze, stimulacije celične proliferacije in epigenetskih sprememb izražanja genov [20]

ZAKLJUČEK

Nastanek raka je posledica interakcij med geni in okoljem. Epidemiološke raziskave so pokazale, da na njegov nastanek vplivajo okolje, življenjski slog in genetske predispozicije posameznika. Vendar pa kemijski in fizikalni rakotvorni dejavniki vedno prispevajo k večji grožnji bolezni ne glede na to, ali jo povezujemo z gensko predispozicijo, življenjskim slogom, poklicno izpostavljenostjo ali dejavniki okolja. V zadnjih desetletjih je poznavanje mehanizmov nastanka raka in rakotovornega delovanja kemikalij močno napredovalo, kar je precej doprineslo k boljši diagnostiki in zdravljenju, še vedno pa procesov nastanka raka in mehanizmov delovanja kemikalij ne poznamo dovolj dobro, da bi lahko bolezen uspešneje preprečevali.

LITERATURA

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; 144 (5): 646–74.
2. Weinberg RA. *The biology of cancer*. New York: Garland Science, 2007.

3. Knudson Jr AG. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68 (4): 820–3.
4. NTP Report on carcinogens. 12th edition. Research Triangle Park, NC: US Department of health and human services, Public health service, National toxicology program, 2011.
5. Irigaray P, Belpomme D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. *Carcinogenesis*. 2010; 31 (2): 135–48.
6. Gates KS. An overview of chemical processes that damage cellular DNA: Spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. *Chem Res Toxicol* 2009; 22 (11): 1747–60.
7. Hlavín EM, Smeaton MB, Miller PS. Initiation of DNA interstrand cross-link repair in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen* 2010; 51 (6): 604–24.
8. Sczepanski JT, Jacobs AC, Van Houten B, Greenberg MM. Double-strand break formation during nucleotide excision repair of a DNA interstrand cross-link. *Biochemistry* 2009; 48 (32): 7565–7.
9. Wiencke JK, McDowell ML, Bodell WJ. Molecular dosimetry of DNA adducts and sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated with benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis* 1990; 11 (9): 1497–502.
10. van Schooten FJ, Hillebrand MJ, van Leeuwen FE, Lutgerink JT, van Zandwijk N, Jansen HM, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in lung tissue from lung cancer patients. *Carcinogenesis* 1990; 11 (9): 1677–81.
11. Lu AL, Li X, Gu Y, Wright PM, Chang DY. Repair of oxidative DNA damage: Mechanisms and functions. *Cell Biochem Biophys* 2001; 35 (2): 141–70.
12. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 254 (2): 86–99.
13. Schiestl RH, Aubrecht J, Yap WY, Kandikonda S, Sidhom S. Polychlorinated biphenyls and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induce intrachromosomal recombination in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1997; 57 (19): 4378–83.
14. Galanis A, Karapetsas A, Sandaltzopoulos R. Metal-induced carcinogenesis, oxidative stress and hypoxia signalling. *Mutat Res* 2009; 674 (1–2): 31–5.
15. Witkiewicz-Kucharczyk A, Bal W. Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. *Toxicol Lett* 2006; 162 (1): 29–42.
16. Calvanese V, Lara E, Kahn A, Fraga MF. The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 2009; 8 (4): 268–76.
17. Gronbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 2007; 115 (10): 1039–59.
18. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358 (11): 1148–59.
19. Weidman JR, Dolinoy DC, Murphy SK, Jirtle RL. Cancer susceptibility: epigenetic manifestation of environmental exposures. *Cancer J* 2007; 13 (1): 9–16.
20. Filipič M. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mut Res* 2012: 69–77.