

CZĘŚĆ 3

TOKSYCZNOŚĆ NIESKIEROWANA NA NARZĄD

Rozdział 8 Kancerogeneza chemiczna

James E. Klauning, Lisa M. Kamendulis

Tłumaczenie: Hanna Piotrowska, Barbara Zielińska-Psuja

WPROWADZENIE

Definicje

KANCEROGENEZA WIELOETAPOWA

Inicjacja

Promocja

Progresja

MECHANIZMY DZIAŁANIA KANCEROGENÓW CHEMICZNYCH

Kancerogeny genotoksyczne

Kancerogeny działające bezpośrednio
(niezależne od aktywacji)

Kancerogeny genotoksyczne działające
pośrednio

Mutageneza

Uszkodzenie przez elektrofile alkilujące

Naprawa DNA

Mechanizmy naprawy DNA

Naprawa niesparowanych zasad

Naprawa przez wycinanie końców DNA

Naprawa przez scalanie końców DNA

Klasy kancerogenów genotoksycznych

Wielopierścieniowe węglowodory
aromatyczne

Czynniki alkilujące

Aminy i amidy aromatyczne

Kancerogeny nieorganiczne

Kancerogeny niegenotoksyczne (epigenetyczne)

Cytotoksyczność

Za pośrednictwem receptora

Hormonalny sposób działania

Metylacja DNA i kancerogeneza

Stres oksydacyjny i kancerogeneza chemiczna

Wewnątrzkomórkowa komunikacja
i kancerogeneza

Polimorfizmy w metabolizmie kancerogenów
i naprawie DNA

Protoonkogeny i antykonkogeny

Retrowirusy

Wirusy DNA

Protoonkogeny

Geny supresorowe nowotworów
(antykonkogeny)

Hormeza i kancerogeneza

Chemoprewencja

SYSTEMY BADAŃ W OCENIE KANCEROGENNOŚCI

Krótkotrwałe badania mutagenności

Badania mutacji genów *in vitro*

Badania mutacji genów *in vivo*

Zaburzenia chromosomowe

Uszkodzenia DNA

Badania transformacji

Przewlekłe badania kancerogenności

Badanie przewlekłe (dwuletnie)

Badania narządowo specyficznego działania
biologicznego oraz wieloetapowe modele
zwierzęce

Zwierzęta transgeniczne w ocenie działania
kancerogennego

KANCEROGENEZA CHEMICZNA U CZŁOWIEKA

Klasyfikacja czynników kancerogennych dla
człowieka

NAJWAŻNIEJSZE ZAGADNIENIA

- Termin *rak* opisuje podzbiór zmian nowotworowych.
- *Nowotwór* definiowany jest jako dziedzicznie zmieniony, stosunkowo autonomiczny rozrost tkanki z nieprawidłową regulacją ekspresji genów.
- *Metastaza* to wtórny rozrost komórek z nowotworu pierwotnego.
- *Kancerogen* to czynnik, którego podanie wcześniej nienarażonym zwierzętom prowadzi do wzrostu ryzyka wystąpienia jednego lub więcej rodzajów histogenetycznych nowotworów, w porównaniu ze zwierzętami nienarażonymi.
- *Inicjacja* wymaga jednego lub więcej cykli podziału komórkowego w celu utrwalenia uszkodzenia DNA.
- *Promocja* obejmuje utrwalenie zmian genetycznych w komórkach zainicjowanych oraz komórkach potomnych przez ciągły kontakt z czynnikiem promującym.
- *Progresja* to etap obejmujący przejście od wczesnego potomstwa zainicjowanych komórek do biologicznie złośliwej populacji komórek nowotworowych.

OMÓWIENIE

Rak to choroba, której podłożem są mutacje powodujące niekontrolowaną proliferację komórkową i zaburzony rozrost komórek. Jest jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie. Wskazuje się na wiele możliwych przyczyn raka, wśród których znajdują się czynniki zakaźne, promieniowanie i substancje chemiczne. Szacuje się, że 70–90% wszystkich przypadków raka u człowieka związanych jest z czynnikami środowiskowymi, dietetycznymi i behawioralnymi.

Definicje

W tabeli 8.1 podano definicje powszechnie używanych terminów, omawiając kancerogenezę chemiczną. W przypadku łagodnych nowotworów do nazwy oznaczającej tkankę pochodzenia dodaje się przyrostek *-oma*; na przykład łagodny nowotwór tkanki włóknistej to *fibroma*, czyli włókniak, natomiast łagodny nowotwór tkanki nabłonka gruczołowego to *adenoma*, czyli gruczolak. Nowotwory złośliwe pochodzenia nabłonkowego nazywane są rakami (ang. *carcinoma*), podczas gdy nowotwory pochodzenia mezenchymalnego określane są jako *sarkoma* (mięsak). Tak więc złośliwy nowotwór tkanki włóknistej to *fibrosarkoma* (włókniakomięsak), a nowotwór pochodzący z kości – *osteosarkoma* (kostniakomięsak).

Kancerogeny mogą być *genotoksyczne*, co oznacza, że wchodzi w interakcje z DNA, powodując uszkodzenia lub zmiany jego struktury. Inne kancerogeny mogą zmieniać ekspresję genów bez modyfikacji lub bezpośredniego uszkodzenia struktury DNA, mogą też zwiększać podatność komórek lub tkanek na uszkodzenia DNA pochodzące z innych źródeł. Substancje chemiczne należące do tej ostatniej kategorii określane są mianem kancerogenów *niegenotoksycznych*. Najważniejsze cechy kancerogenów genotoksycznych i niegenotoksycznych przedstawiono w tabeli 8.2.

KANCEROGENEZA WIELOETAPOWA

Proces kancerogenezy obejmuje serię definiowalnych i powtarzalnych etapów. Funkcjonalnie

Tabela 8.1. Terminologia

Neoplazja	nowy rozrost lub autonomiczny rozrost tkanki
Nowotwór	zmiana wynikająca z neoplazji
Łagodny	zmiany charakteryzujące się olbrzymim rozrostem, często wykazujące wolne tempo proliferacji, które nie naciekają sąsiednich tkanek
Złośliwy	zmiany wykazujące rozrost inwazyjny, mające zdolność przerzutów do innych tkanek lub narządów
Metastaza	wtórny rozrost pochodzący od pierwotnego nowotworu złośliwego (przerzut)
Guz	zmiana charakteryzująca się obrzmieniem lub zwiększonym rozmiarem; nie musi być nowotworowa
Rak	nowotwór złośliwy
Kancerogen	czynnik fizyczny lub chemiczny powodujący bądź wywołujący neoplazję
Genotoksyczny	kancerogeny, które oddziałują na DNA, powodując mutację
Niegenotoksyczny	kancerogeny, które zmieniają ekspresję genów, ale nie uszkodzają DNA

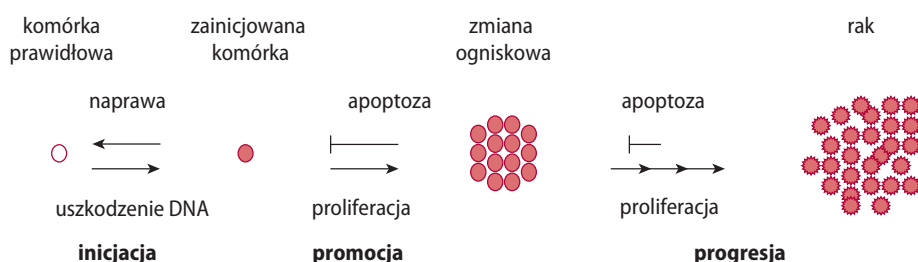
Tabela 8.2. Cechy kancerogenów genotoksycznych i niegenotoksycznych

<p>Kancerogeny genotoksyczne</p> <ul style="list-style-type: none"> • mutagenne • mogą być kompletnymi kancerogenami • tumorogenność zależy od dawki • czynniki bezprogowe
<p>Kancerogeny niegenotoksyczne</p> <ul style="list-style-type: none"> • niemutagenne • istnieje możliwość określenia bezpiecznego stężenia (progu), odwracalne • tumorogenność zależy od dawki • mogą działać na etapie promocji nowotworu • nie uszkodzają bezpośrednio DNA • specyficzne dla gatunku, szczepu, tkanki

etapy te określone są jako inicjacja, promocja i progresja (zob. ryc. 8.1).

Inicjacja

Pierwszy etap kancerogenezy obejmuje *inicjację*, proces definiowany jako zmiana stała i dziedziczna. Etap ten jest szybkim i nieodwracalnym procesem, który prowadzi do zmiany o charak-



Ryc. 8.1. Wieloetapowy proces kancerogenezy.

terze genotypowym i polega na uszkodzeniu DNA wywołanym interakcją z kancerogenem. Czynniki fizyczne i chemiczne, które oddziałują na składniki komórki na tym etapie, nazywane są inicjatorami lub czynnikami inicjującymi. Czynniki inicjujące prowadzą do zmian genetycznych, obejmujących mutacje genowe i chromosomowe. Czynniki inicjującymi są kancerogeny chemiczne, wiążące się kowalencyjnie z DNA i tworzące addukty powodujące mutacje. Zmiany genetyczne zostają utrwalone, kiedy uszkodzenie DNA nie jest właściwe lub całkowicie naprawione przed synteza DNA i podziałem komórki.

Po utworzeniu zainicjowanych komórek ich przeznaczenie może być wielorakie: 1) zainicjowana komórka może pozostać w stanie stabilnym, bez podziału; 2) zainicjowana komórka może posiadać mutacje uniemożliwiające przetrwanie lub prawidłowe funkcjonowanie, może także zostać usunięta w wyniku apoptozy; 3) komórka może przejść cykl podziału komórkowego wiodący do proliferacji zainicjowanej komórki.

Promocja

Drugi etap procesu kancerogenezy to selektywny rozrost klonalny zainicjowanych komórek prowadzący do wytworzenia zmiany przednowotworowej. Etap ten określany jest jako *promocja* w procesie kancerogenezy. Zarówno endogenne, jak i egzogenne czynniki działające na tym etapie nazywane są promotorami nowotworów. Promotory nowotworów wykorzystują kilka mechanizmów obejmujących zmiany ekspresji genów, co powoduje utrzymywanie się

proliferaacji komórek przez jej indukcję i /lub zahamowanie apoptozy. Po usunięciu czynnika promującego promocja staje się procesem odwracalnym, a komórki ogniskowe mogą powrócić do stadium pojedynczych komórek zainicjowanych. Ponadto czynniki promujące wykazują określone wartości bezpiecznego stężenia (prognoza) dla efektów swojego działania. Poniżej pewnej dawki lub częstości stosowania promotory nowotworów są niezdolne do indukowania proliferacji komórek. Promotory nowotworów powodują zazwyczaj efekty specyficzne dla danego narządu, na przykład promotor nowotworu wątroby, jakim jest fenobarbital, nie będzie działał jako promotor nowotworów skóry czy innych tkanek.

Progresja

Progresja polega na przekształceniu łagodnych zmian przednowotworowych w raka. Na tym etapie – na skutek wzrostu syntezy DNA i proliferacji komórek w zmianie przednowotworowej – mogą zachodzić dodatkowe wydarzenia genotoksyczne powodujące dalsze uszkodzenia DNA obejmujące aberracje oraz translokacje chromosomowe. Etap progresji jest nieodwracalny, zarówno w wypadku zmian łagodnych, jak i złośliwych. Wraz z rozwojem nowotworu osiągniany jest autonomiczny i/lub niekontrolowany rozrost. Spontaniczna progresja może być spowodowana samorzutnymi zmianami w kariotypie występującymi w mitotycznie aktywnych komórkach zainicjowanych podczas promocji. Cechami charakterystycznymi progresji są: akumulacja nielosowych aberracji chromosomowych i niestabilność kariotypu.

MECHANIZMY DZIAŁANIA KANCEROGENÓW CHEMICZNYCH

Do rozwoju neoplazji wymagane są dwa główne wydarzenia: powstanie zainicjowanej, zmutowanej komórki i selektywna proliferacja zmutowanej komórki w celu utworzenia nowotworu. Związki chemiczne, które wywołują raka, na podstawie względnej zdolności do oddziaływania na genomowe DNA zostały ogólnie zakwalifikowane do jednej z dwóch kategorii – kancerogenów genotoksycznych, czyli reagujących z DNA, oraz niegenotoksycznych, czyli epigenetycznych.

Kancerogeny genotoksyczne

Kancerogeny genotoksyczne inicjują rozwój raka poprzez uszkodzanie DNA. Kancerogeny reagujące z DNA można dalej podzielić na grupy, zależnie od tego, czy są aktywne w swojej formie macierzystej (tj. kancerogeny działające bezpośrednio – czynniki, które mogą bezpośrednio wiązać się z DNA, zanim ulegną biotransformacji), oraz od tego, czy wymagają aktywacji metabolicznej (tj. kancerogeny działające pośrednio – związki, które w celu utworzenia metabolitów wiążących się z DNA muszą najpierw ulec biotransformacji).

Kancerogeny działające bezpośrednio (niezależne od aktywacji). Kancerogeny działające bezpośrednio są wysoce reaktywnymi cząsteczkami elektrofilowymi, które mogą oddziaływać i wiązać się z nukleofilami, makrocząsteczkami komórkowymi, w tym z DNA. Ogólnie biorąc, wysoce reaktywne związki chemiczne często są przyczyną powstawania nowotworu w miejscu narażenia na dany związek.

Względna siła kancerogenów działających bezpośrednio zależy częściowo od względnej szybkości interakcji między substancją chemiczną a genomowym DNA, a także od reakcji współzawodnictwa z substancją chemiczną i innymi nukleofilami komórkowymi. Działanie kancerogenne danej substancji chemicznej określane jest przez stabilność chemiczną, transport oraz przenikalność błony. Kancerogeny działające bezpośrednio działają w wielu miejscach i u wszystkich przebadanych gatunków.

Kancerogeny genotoksyczne działające pośrednio. Większość związków kancerogennych reagujących z DNA to związki macierzyste lub prokancerogeny, czyli substancje chemiczne, które podczas biotransformacji ulegają przemianie do metabolitów działających kancerogenicznie. Aby zdefiniować związek macierzysty (prokancerogen) oraz jego metabolit, używa się określenia pośredni lub końcowy, który reaguje z DNA. Ostateczna forma kancerogenu jest najprawdopodobniej związkiem chemicznym, który powoduje mutacje i transformację nowotworową. Warto zauważyć, że oprócz aktywacji prokancerogenu do formy reagującej z DNA może również zachodzić detoksykacja powodująca unieczynnienie kancerogenu.

Kancerogeny genotoksyczne działające pośrednio zazwyczaj wywołują rozwój nowotworu w tkance docelowej, w której następuje aktywacja metaboliczna substancji chemicznej, a nie w miejscu narażenia (jak przy kancerogenach genotoksycznych działających bezpośrednio).

Mutagenеза

Efekty mutacji zależą od tego, na którym etapie cyklu komórkowego zostaną utworzone addukty, a także od miejsca ich powstawania oraz typu procesu naprawczego wykorzystywanego w odpowiedzi na uszkodzenie. Mutagenеза może być wywołana przez błąd odczytu DNA, przesunięcie ramki odczytu lub uszkodzenie nici DNA.

Uszkodzenie przez elektrofile alkilujące

Elektrofile łatwo tworzą addukty kowalencyjne z nukleofilowymi celami. Ze względu na ich niesparowane elektrony, atomy S, O i N są celami nukleofilowymi dla wielu elektrofilów. Zasadniczo silniejsze elektrofile posiadają większy zakres celów nukleofilowych, podczas gdy słabe elektrofile mogą alkilować jedynie silne nukleofile.

Istotnym i bogatym źródłem nukleofilów są zasady DNA oraz wiązania fosfodiesterowe. Różne elektrofilowe kancerogeny mogą wykazywać zróżnicowane preferencje dotyczące miejsc nukleofilowych w DNA i odmienne zakresy uszkodzeń.

Inną częstą modyfikacją DNA jest hydroksylacja zasad DNA. Oksydacyjne addukty DNA zostały zidentyfikowane we wszystkich czterech zasadach DNA. Źródłem uszkodzenia oksydacyjnego DNA często są reakcje wolnych rodników, które występują endogennie w komórce lub pochodzą ze źródeł egzogennych.

Metylacja DNA prowadzi do dziedzicznych zmian ekspresji genów bądź represji, hipometylacja związana jest z aktywacją transkrypcji genów, podczas gdy hipermetylacja powoduje wyciszenie transkrypcji. Kancerogeny chemiczne mogą hamować metylację DNA przez tworzenie adduktów kowalencyjnych, uszkodzenia jednoniciowych DNA, zmiany w puli metioniny oraz dezaktywację metylotransferazy DNA odpowiedzialnej za metylację. To, czy dany addukt DNA spowoduje mutację, zależy częściowo od procesu replikacji DNA, a częściowo od naprawy DNA.

Naprawa DNA

Po utworzeniu się adduktu kancerogenu z DNA jego trwałość jest głównym czynnikiem determinującym wywoływane efekty. Trwałość adduktu zależy od zdolności komórki do naprawy zmienionego DNA. Obecność adduktów DNA nie jest jednak wystarczającym czynnikiem postępowania procesu kancerogenezy. Ważnym czynnikiem determinującym kancerogenezę może być natomiast względna szybkość lub trwałość poszczególnych adduktów DNA. Różnice we wrażliwości na kancerogeny są najprawdopodobniej spowodowane przez wiele czynników, w tym replikację DNA w tkance i naprawę adduktu DNA. Ze względu na zdolność komórki do rozpoznawania i naprawy uszkodzonego DNA rozwój raka po narażeniu na kancerogen chemiczny jest stosunkowo rzadkim zjawiskiem. Aby doszło do skutecznej naprawy DNA w uszkodzonej komórce, proces ten musi nastąpić przed jej podziałem.

Mechanizmy naprawy DNA

Chociaż komórka posiada mechanizmy umożliwiające naprawę wielu rodzajów uszkodzeń DNA, nie zawsze są one całkowicie skuteczne, a pozostałe uszkodzenie DNA może prowadzić

do syntezy zmienionych białek. Mutacje onkogenu, genów supresorowych nowotworu lub genu kontrolującego cykl komórkowy mogą spowodować powstanie klonalnej populacji komórek z możliwością przetrwania.

Komórki wykorzystują wiele mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA. Naprawa uszkodzenia DNA nie zawsze zachodzi przed replikacją komórki, a naprawa uszkodzenia DNA przez niektóre substancje chemiczne bywa mało skuteczna.

Naprawa niesparowanych zasad. Wiele mutacji spontanicznych to mutacje punktowe, obejmujące zamianę pojedynczego nukleotydu w sekwencji DNA. Depurynacja jest częstym zjawiskiem zachodzącym samorzutnie u ssaków i powodującym tworzenie się miejsc apurynowych. Wszystkie komórki ssaków zawierają endonukleazy purynowe, których funkcją jest przecinanie DNA w pobliżu miejsc apurynowych. Następnie egzonukleazy powodują odłączanie nukleotydów od końców łańcuchów DNA, a powstała przerwa naprawiana jest przez polimerazy i ligazy DNA.

Naprawa przez wycinanie końców DNA. Obszary DNA, zawierające zasady zmodyfikowane chemicznie lub chemiczne addukty DNA, są zazwyczaj naprawiane przez wycinanie. Białka, które prześlizgują się po powierzchni cząsteczki dwuniciowego DNA, rozpoznają nieprawidłowości w kształcie podwójnej helisy i indukują naprawę zmian.

Naprawa przez scalanie końców DNA. Łączenie niehomologicznych końców DNA to jeden z dwóch mechanizmów naprawy uszkodzeń obu nici DNA. Komórka, która zawiera uszkodzenie dwuniciowe, może zostać naprawiona przez połączenie wolnych zakończeń DNA. Łączenie oderwanych końców z różnych chromosomów może jednak prowadzić do translokacji fragmentów DNA z jednego chromosomu na drugi, a translokacje te mogą wpływać na nieprawidłowy rozrost komórek. Rekombinacja homologiczna (zwana naprawą rekombinacyjną) jest jednym z dwóch mechanizmów odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń dwuniciowych DNA. W tym procesie uszkodzenie obu nici DNA jednego z chromosomów naprawiane jest

Tabela 8.3. Kancerogenność metali

Zwierzę				Człowiek	
Metal	Gatunek	Miejsce nowotworu	Rodzaj nowotworu	Narażenie	Rodzaj nowotworu
Arsen	myszy, psy, szczury	nie zaobserwowano	nie zaobserwowano	rafinerie Cu pestycydy zawierające As zakłady chemiczne woda pitna (doustnie)	rak płuc chłoniak, białaczka rak skóry naczyniakomięsak
Beryl	myszy, szczury, małpy	kości płuca	kostniakomięsak rak	nie zaobserwowano	nie zaobserwowano
Kadm	myszy, szczury, kurczaki	miejsce iniekcji jądra	mięsak potworniak	rafinerie Cd	płuczny
Chrom	myszy, szczury, króliki	miejsce iniekcji płuca	mięsak rak	rafinerie Cd chromowanie pigmenty zawierające chrom	rak płuc rak układu pokarmowego
Kobalt	szczury, króliki	miejsce iniekcji	mięsak	nie zaobserwowano	nie zaobserwowano
Żelazo	chomiki, myszy, szczury, króliki	miejsce iniekcji	mięsak	nie zaobserwowano	nie zaobserwowano
Ołów	myszy, szczury	nerki	rak	nie zaobserwowano	nie zaobserwowano
Nikiel	myszy, szczury, koty, chomiki, króliki, świnki morskie	miejsce iniekcji płuca nerki	rak rak rak	rafinerie Ni	rak płuc rak nosa i krtani rak żołądka i nerek mięsak (?)
Tytan	szczury	miejsce iniekcji	mięsak	nie zaobserwowano	nie zaobserwowano
Cynk	kurczaki, szczury, chomiki	jądra jądra	rak potworniak	nie zaobserwowano	nie zaobserwowano

przy użyciu informacji na homologicznym nie-naruszonym chromosomie.

Przeważającym mechanizmem naprawy dwuniciowego uszkodzenia DNA w organizmach wielokomórkowych jest naprawa niehomologiczna, która oznacza powtórne łączenie końców dwóch cząsteczek DNA. Wprawdzie w procesie tym powstaje ciągle dwuniciowa cząsteczka, ale wiele par zasad ulega delecji, co może wywołać potencjalnie mutagenne zmiany kodowania.

Klasy kancerogenów genotoksycznych Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Wysokie poziomy wielopierścieniowych węglowodórów aromatycznych, takich jak benzo[*a*]piren, znajdują się w żywności grillowanej na węglu drzewnym, w dymie papierosowym i w spalinach silników dieslowskich.

Czynniki alkilujące. Alkilujące substancje chemiczne stanowią ważną grupę kancerogenów chemicznych. Niektóre substancje alkilujące są czynnikami genotoksycznymi działającymi bezpośrednio, wiele z nich jednak wymaga aktywacji metabolicznej w celu wytworzenia elektrofilowych metabolitów, mogących wchodzić w reakcję z DNA. Czynniki alkilujące można podzielić na kilka grup, do których należą bezpośrednio działające alkiloalkanosulfoniany (metanosulfonian metylu i etylu) i nitrozoamidy (*N*-metylo-*N*-nitrozomocznik, *N*-etylo-*N*-nitrozomocznik, *N*-metylo-*N*-nitro-*N*-nitrozoguanidyna) oraz pośrednio działające nitrozamidy (dimetylo- i dietylonitrozaminy). Czynniki alkilujące łatwo reagują z DNA, co najmniej w 12 miejscach. Najbardziej reaktywnymi miejscami w DNA dla alkilujących substancji chemicznych są pozycja N⁷ guaniny i N³ adeniny.

Aminy i amidy aromatyczne. Aminy i amidy aromatyczne obejmują grupę substancji chemicznych o zróżnicowanej strukturze. Aminy aromatyczne podlegają metabolizmowi I fazy (hydroliza, redukcja i utlenianie) oraz II fazy (sprzęganie). Reakcje I fazy zachodzą głównie za pośrednictwem cytochromu P450, wytwarzając metabolity hydroksylowe, które często tworzą addukty z białkami i DNA, a także wykazują działanie kancerogenne na wątrobę i pęcherz moczowy.

Kancerogeny nieorganiczne

Wiele metali wykazuje działanie kancerogenne u eksponowanych zwierząt doświadczalnych i/lub ludzi. W tabeli 8.3 zamieszczono listę często występujących metali i odpowiadającej im kancerogenności u zwierząt i ludzi. Dodatkowe omówienie wybranych metali znajduje się w rozdziale 23.

Kancerogeny niegenotoksyczne (epigenetyczne)

Wiele substancji chemicznych wywołujących nowotwory u zwierząt doświadczalnych w następstwie przewlekłej ekspozycji może działać poprzez mechanizmy nie obejmujące bezpośredniego wiązania, uszkodzenia bądź interakcji substancji chemicznej lub jej metabolitów z DNA. Czynniki te nazwane zostały kancerogenami niegenotoksycznymi. Do wystąpienia nowotworu niezbędne jest długotrwałe narażenie na stosunkowo wysokie stężenia substancji chemicznych. Różnorodne biochemiczne sposoby działania kancerogenów niereagujących z DNA przedstawiono w tabeli 8.4.

Cytotoksyczność. Substancje chemiczne wykazujące działanie cytotoksyczne powodują śmierć komórek. Metabolizmowi substancji chemicznej często towarzyszy stały rozrost regeneracyjny, stwarzający możliwość wystąpienia spontanicznych mutacji DNA oraz umożliwiający zmutowanym komórkom gromadzenie się i proliferację. Proces ten następnie zapoczątkowuje przednowotworowe zmiany ogniskowe, które po rozprzestrzenieniu się mogą prowadzić do powstawania nowotworu. Wiele

kancerogenów – zarówno genotoksycznych, jak i niegenotoksycznych – w wysokich stężeniach wykazuje działanie cytotoksyczne. Dlatego indukcja cytotoksyczności wraz z kompensacyjnym rozrostem komórek może przyczynić się do obserwowanego tumorogennego działania dużych dawek wielu rakotwórczych substancji chemicznych.

Za pośrednictwem receptora

Indukторы CYP450: kancerogeny podobne do fenobarbitalu. Fenobarbital jest często badanym związkiem niereagującym z DNA, który powoduje powstawanie nowotworów w wyniku mechanizmu niegenotoksycznego związanego z przerostem komórek wątroby. Indukcja CYP2B przez fenobarbital odbywa się za pośrednictwem aktywacji konstytutywnego receptora androstanu (CAR), należącego do rodziny receptorów jądrowych. Inne działania fenobarbitalu zależne od CAR, które są krytyczne dla procesu powstawania nowotworu, obejmują zwiększoną proliferację komórek, hamowanie apoptozy, hamowanie komunikacyjnych połączeń jonowo-metabolicznych typu *gap*, hipertrofię i powstawanie przednowotworowych zmian ogniskowych w wątrobie.

Receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów α (PPAR- α). Różne substancje chemiczne mogą zwiększać liczbę i objętość peroksysomów w cytoplazmie komórkowej. Proliferatory peroksysomów obejmują takie substancje chemiczne, jak: herbicydy, rozpuszczalniki chlorowane (np. trichloroetylen i perchloroetylen), plastyfikatory (np. dietyloheksyloftalan i inne ftalany), leki z grupy fibratów obniżające poziom lipidów (np. ciprofibrat i kłofibrat) oraz produkty naturalne. Ponadto wiele z tych substancji wpływa na powiększenie wątroby i powoduje raka wątrobowo-komórkowego u szczurów i myszy w wyniku mechanizmów niezwiązanych z oddziaływaniem na DNA. Obecnie przyjmuje się, że sposobem działania tej grupy substancji chemicznych jest wiązanie agonistów z jądrowym receptorem hormonalnym PPAR- α .

Receptory PPAR- α wykazują ekspresję w komórkach, które mają zdolność utleniania kwasów tłuszczowych. PPAR- α odgrywa głów-

Tabela 8.4. Proponowane mechanizmy działania wybranych chemicznych kancerogenów niegenotoksycznych

Sposób działania	Przykład
Cytotoksyczność	chloroform melamina
Wiązanie z $\alpha_2\mu$ -globuliną	D-limonen, 1,4-dichlorobenzen
Za pośrednictwem receptora CAR	fenobarbital
PPAR- α	dietyloheksyloftalan fibraty (np. klofibrat) perchloroetylen trichloroetylen
AhR	polibromowane bifenyle (PBB) polichlorowane bifenyle (PCB) TCDD
Hormonalnie	aminy biogenne DES fenobarbital fitoestrogeny (bisfenol-A) hormony sterydowe i peptydowe tamoksyfen
Zmiana metylacji	dietanoloamina fenobarbital niedobór cholicy
Induktory stresu oksydacyjnego	akrylonitryl dieldryna etanol lindan TCDD

ną rolę w metabolizmie lipidów i ich przemian wewnątrzkomórkowych, działając jako ligandozależny czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję genów.

Hormonalny sposób działania. Do hormonalnie aktywnych substancji chemicznych należą aminy biogenne, steroidy i hormony peptydowe, wywołujące zmiany specyficzne dla danej tkanki w wyniku interakcji z receptorem. Hormony troficzne indukują proliferację komórek w swoich dla nich narządach docelowych. Kiedy mechanizmy kontroli hormonalnej zostają zaburzone, a poziom niektórych hormonów jest stale podwyższony, wówczas proliferacja może doprowadzić do rozwoju nowotworu.

Czynniki estrogenowe mogą wywoływać nowotwory w tkance zależnej od estrogenu. Zwiększone ryzyko rozwoju raka dotyczy osób mających podwyższony poziom estrogenów oraz narażonych na kontakt z silnym czynnikiem

estrogenowym, np. dietylostilbestrolem (DES). DES wykazuje związek przyczynowy ze zwiększoną częstością występowania gruczolakoraka pochwy i szyjki macicy u córek kobiet leczonych tym hormonem w czasie ciąży. Działanie steroidowych substancji chemicznych na cykl komórkowy i na gromadzenie się mikrotubuli może być istotne w wypadku niektórych czynników hormonalnych wywołujących działanie aneuploidalne.

Wiele substancji chemicznych obniżających stężenie hormonów tarczycy (T_4 i/lub T_3) oraz zwiększających stężenie hormonu tyreotropowego (TSH) wywołuje neoplazję w tarczycy gryzoni. TSH wykazuje działanie proliferacyjne, prowadząc w tarczycy do hipertrofii komórek pęcherzykowych, przerostu, a wreszcie do neoplazji.

Metylacja DNA i kancerogeneza. Stopień metylacji genu jest odwrotnie proporcjonalny do eks-

presji tego genu. Wiele kancerogenów chemicznych modyfikuje metylację DNA, aktywność metylotransferazy oraz strukturę chromosomu. Podczas kancerogenezy zaobserwowano zarówno hipometylację, jak i hipermetylację genomu. Geny supresorowe (antyonkogeny) mogą ulegać hipermetylacji. Hipometylacja z kolei łączona jest ze zwiększoną szybkością mutacji, ponieważ wiele onkogenów jest hipometylowanych, a ich ekspresja zostaje wzmocniona.

Reaktywne formy tlenu także mogą zmieniać metylację DNA przez zakłócanie zdolności metylotransferazy do interakcji z DNA; wynikająca z tego hipometylacja umożliwia ekspresję genów, które zazwyczaj są nieaktywne. Podobnie nieprawidłowy wzór metylacji występujący w komórkach, które uległy transformacji przez utleniające chemiczne, może przyczynić się do ogólnej zaburzonej ekspresji genów i powodować onkogenezę.

Stres oksydacyjny i kancerogeneza chemiczna.

Rodniki tlenowe mogą być wytwarzane zarówno przez źródła endogenne, jak i egzogenne. Zazwyczaj są równoważone przez przeciwutleniacze, które mogą działać na drodze enzymatycznej (np. dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationu, katalaza) i nieenzymatycznej (np. witamina E, witamina C, beta-karoten, glutation). Endogenne źródła reaktywnych form tlenu obejmują fosforylację oksydacyjną, metabolizm z udziałem CYP450, peroksydazy oraz aktywację komórek zapalnych. Wykorzystując te i inne, obecnie jeszcze nieznanne, mechanizmy, wiele czynników chemicznych wywołujących raka (np. związki chlorowane, promieniowanie jonizujące, jony metali, barbiturany, niektórzy agoniści PPAR- α) indukuje powstawanie reaktywnych form tlenu i/lub stres oksydacyjny.

Uszkodzenia oksydacyjne i kancerogeneza. Reaktywne formy tlenu, nie zrównoważone przez przeciwutleniacze, mogą powodować uszkodzenie makrocząstek komórkowych. W wypadku DNA reaktywne formy tlenu mogą powodować: 1) jedno- lub dwuniciowe uszkodzenia DNA; 2) modyfikację puryny, pirymidyny lub deoksyrybozy; 3) wiązania krzyżowe DNA.

W wielu rodzajach raka stwierdzono mutacje i uszkodzenie oksydacyjne mitochondrial-

nego DNA. W porównaniu z DNA jądrowym genom mitochondrialny jest stosunkowo podatny na oksydacyjne uszkodzenie zasad ze względu na: 1) bliskość systemu transportu elektronów, głównego źródła reaktywnych form tlenu; 2) fakt, że mitochondrialny DNA nie jest chroniony przez histony; 3) fakt, że zdolność naprawy mitochondrialnego DNA jest ograniczona.

Stres oksydacyjny i regulacja wzrostu komórek.

Aktywacja kaskad sygnałowych przez reaktywne formy tlenu indukowane przez kancerogeny chemiczne prowadzi ostatecznie do zaburzonej ekspresji wielu genów, w tym odpowiadających za proliferację, różnicowanie i apoptozę. Aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF- κ B częściowo jest regulowana przez reaktywne formy tlenu oraz równowagę redoks w komórce i pojawia się w następstwie dużej liczby bodźców zewnątrzkomórkowych, obejmując narażenie na chemiczne kancerogeny, takie jak agoniści PPAR- α czy PCB.

Wewnątrzkomórkowa komunikacja połączenia jonowo-metabolicznego i kancerogeneza

Wewnątrzkomórkowa komunikacja połączenia jonowo-metabolicznego odgrywa ważną rolę w regulacji wzrostu i śmierci komórki, częściowo z powodu możliwości wymiany małych cząsteczek (< 1 kDa) pomiędzy komórkami. Jeżeli komunikacja komórkowa między komórkami rakowymi a prawidłowymi jest zablokowana, niemożliwa staje się wymiana sygnałów hamujących wzrost między komórkami prawidłowymi a zainicjowanymi, co pozwala na niekontrolowany rozrost i klonalną ekspansję zainicjowanej populacji komórek.

Polimorfizmy w metabolizmie kancerogenów i naprawie DNA

Polimorfizmy genetyczne wywodzą się z różnorodności genetycznej człowieka. Mogą odpowiadać za podatność niektórych osobników na rozwój pewnych rodzajów raka. W enzymach metabolizujących kancerogeny zidentyfikowano wiele polimorfizmów wiążących się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju wybranych

rodzajów raka. U człowieka wysoce polimorficzne są S-transferazy glutationu (GST). Izofорма GSTM1, ze względu na swą wysoką reaktywność wobec epoksydów, jest szczególnie ważna w procesie kancerogenezy.

Ryzyko indukcji kancerogenezy zależy zarówno od narażenia (dawki i czasu trwania), jak i od podatności genetycznej. Jeżeli podatność genetyczna jest duża, to narażenie na kancerogen chemiczny spowoduje większe ryzyko rozwoju raka.

Protoonkogeny i antyonkogeny

Protoonkogeny i antyonkogeny kodują duży zbiór białek, których funkcją jest kontrola wzrostu i proliferacji komórek. Główne cechy onkogenów i antyonkogenów przedstawiono w tabeli 8.5. Mutacje zarówno onkogenów, jak i antyonkogenów przyczyniają się do postępującego rozwoju raka u człowieka. Skumulowane uszkodzenia wielu onkogenów i/lub antyonkogenów mogą powodować zmienioną proliferację komórek, różnicowanie i/lub przetrwanie komórek rakowych.

Retrowirusy. *Wirus mięsaka Rousa* (RSV) może przekształcać prawidłowe komórki i prowadzić do rozwoju mięsaka (sarkomy). Genom RSV i innych retrowirusów składa się z dwóch identycznych kopii mRNA, który następnie podlega odwrotnej transkrypcji do DNA i jest wbudowywany w genom komórki gospodarza. Wirusy transformujące onkogeny, takie jak RSV, zawierają gen *v-src*, niezbędny do indukcji kancerogenezy. Zdrowe komórki zawierają gen homologiczny do wirusowego genu *v-src*. Odkrycie tego faktu dowodzi, że proces nowotworowy może być indukowany przez działanie prawidłowych lub nieznacznie zmienionych genów.

Wirusy DNA. Zakażenie małymi wirusami DNA jest śmiertelne dla większości komórek zwierzęcych, jednak niewielka ich część łączy się z wiralnym DNA i jest włączana w genom komórki gospodarza. Komórki, które przetrwają infekcję, zostają trwale przekształcone z powodu obecności jednego lub więcej onkogenów w DNA wirusa. Wirusy brodawczaka mogą zakażać

Tabela 8.5. Cechy charakterystyczne protoonkogenów, onkogenów komórkowych i antyonkogenów

Protoonkogeny	Onkogeny	Antyonkogeny
dominujące	dominujące	recesywne
szeroka specyficzność tkankowa w rozwoju nowotworu złośliwego	szeroka specyficzność tkankowa w rozwoju nowotworu złośliwego	znaczna specyficzność tkankowa w rozwoju nowotworu złośliwego
dziedziczenie linii zarodkowej rzadko związane z rozwojem nowotworu złośliwego	dziedziczenie linii zarodkowej często związane z rozwojem nowotworu złośliwego	dziedziczenie linii zarodkowej często związane z rozwojem nowotworu złośliwego
analogiczne do pewnych onkogenów wirusowych	brak znanych analogii u wirusów onkogennych	brak znanych analogii u wirusów onkogennych
mutacje somatyczne aktywowane podczas wszystkich etapów kancerogenezy	mutacje somatyczne aktywowane podczas wszystkich etapów kancerogenezy	mutacje linii zarodkowej mogą inicjować, lecz mutacje w kierunku neoplazji zachodzą tylko podczas etapu progresji

i powodować raka u człowieka. Spośród wielu rodzajów wirusów brodawczaka ludzkiego typy 16, 18, 31 i 33 związane są z rakiem szyjki macicy u kobiet.

Protoonkogeny. Onkogen koduje białko, które może przekształcać komórki w kulturach komórkowych lub powodować raka. Większość znanych onkogenów pochodzi od normalnych genów (tj. protoonkogenów) i jest włączana w kaskady sygnałowe komórek. Ponieważ większość protoonkogenów niezbędna jest do podtrzymania zdolności do życia, są one w dużym stopniu zachowywane. Aktywacja protoonkogenów do onkogenów zachodzi w wyniku wydarzeń mutacyjnych wewnątrz protoonkogenów. Ustalono, że wiele kancerogenów chemicznych ma zdolność wywoływania mutacji protoonkogenów. Produkty onkogenów mogą działać na wielu poziomach kaskad sygnałowych, obejmujących ligand, receptor i czynniki transkrypcyjne wpływające na transdukcję.

Tabela 8.6. Przykładowe antyonkogeny i ich powiązanie z nowotworami złośliwymi

Antyonkogen	Zaburzenie	Nowotwór
<i>Rb1</i>	glejak siatkówki	drobnokomórkowy rak płuca
<i>p53</i>	zespół Li-Fraumeni	rak piersi, okrężnicy, płuca
<i>BRCA1</i>	nieznane	rak piersi
<i>WT-1</i>	guz Wilmsa	rak płuca
<i>p16</i>	nieznane	czerniak

Geny supresorowe nowotworów (antyonkogeny)**Gen glejaka siatkówki (retinoblastomy – *Rb*).**

Białka kodowane przez większość antyonkogenów działają jako inhibitory proliferacji albo przetrwania komórek (zob. tab. 8.6). Prototypowy antyonkogen, *Rb*, został zidentyfikowany w badaniach nad dziedziczeniem glejaka siatkówki. Utrata lub dezaktywacja mutacyjna *Rb* przyczynia się do rozwoju wielu rodzajów raka u ludzi. W formie niefosforylowanej *Rb* wiąże się z czynnikiem transkrypcyjnym E2F, zapobiegając aktywacji transkrypcyjnej wielu genów, których produkty są konieczne do syntezy DNA. Gen *Rb* ulega fosforylacji podczas późnej fazy G1, powodując dysocjację z E2F – proces ten pozwala E2F na indukcję syntezy enzymów replikacji DNA zaangażowanych w cykl komórkowy.

Gen *p53*. Białko *p53*, kodowane przez gen supresorowy nowotworów, jest głównym punktem kontrolnym umożliwiającym zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 w komórkach z uszkodzonym DNA. Komórki z funkcjonalnym białkiem *p53*, po narażeniu na czynniki uszkodzające DNA, zatrzymują cykl komórkowy w fazie G1, podczas gdy komórki, w których brakuje funkcjonalnego *p53*, nie mogą blokować podziału komórkowego. Gen *p53* aktywowany jest przez wiele szkodliwych czynników, do których należą promienie UV, promieniowanie gamma, ciepło i pewna liczba kancerogenów.

W większości komórek kumulacja *p53* prowadzi także do indukcji procesu apoptozy i dlatego zapobiega proliferacji komórek, w których mogłyby się kumulować wielokrotne mutacje.

Kiedy „strażnik genomu”, jakim jest *p53*, działa nieprawidłowo, uszkodzony DNA może się replikować, wytwarzając mutacje i rearanżacje DNA, które pozwalają na rozwój transformowanych komórek.

Hormeza i kancerogeneza

Hormeza jest definiowana jako krzywa dawka-odpowiedź, dla której obserwuje się kształt litery U, J lub odwróconego U; przy czym ekspozycja na małe dawki często działa korzystnie, a nie szkodliwie. W celu wyjaśnienia hormezy występującej po narażeniu na kancerogeny chemiczne proponuje się reakcje adaptacyjne. Reakcje te najczęściej obejmują działanie substancji chemicznej na komórkowe ścieżki sygnalizacyjne prowadzące do zmian ekspresji genów, co z kolei prowadzi do zwiększonej detoksykacji i wydalania substancji chemicznej, a także utrwalenia cyklu komórkowego i programowanej śmierci komórki. Po podaniu bardzo małych dawek substancji chemicznych stymulacja tych mechanizmów rekompensuje uszkodzenie komórki w taki sposób, że obserwuje się zmniejszenie promocji nowotworu i/lub rozwoju nowotworu, co wyjaśnia kształt litery U lub J, przyjmowany przez krzywą odpowiedzi uzyskaną po narażeniu na kancerogen. Do wspólnych cech kancerogenów chemicznych, które reprezentują zjawisko hormezy zalicza się tworzenie reaktywnych form tlenu i indukcję izoenzymów cytochromu P450.

Chemoprewencja

Chemoprewencją nazywana jest nauka o substancjach chemicznych, które zapobiegają, hamują lub spowalniają proces kancerogenezy. Wiele substancji chemicznych, w tym leki, przeciwutleniacze, składniki odżywcze oraz witaminy, hamuje lub opóźnia rozwój raka, zarówno w modelach *in vivo*, jak i *in vitro*. Podstawowym założeniem chemoprewencji jest to, że leczenie we wczesnym etapie może zatrzymać bądź opóźnić progresję procesu nowotworowego. Czynniki chemoprewencyjne mogą funkcjonować jako inhibitory tworzenia się kancerogenów, czynniki blokujące i/lub czynniki supresyjne. Czynniki blokujące służą zapobieganiu aktywacji metabo-

licznej kancerogenów genotoksycznych lub niegenotoksycznych przez hamowanie ich metabolizmu albo przez wspomaganie mechanizmów detoksykacji. Czynniki supresyjne indukują różnicowanie tkanek, mogą neutralizować onkogeny, wspomagać aktywność antyonkogenów, hamować proliferację komórek przednowotworowych lub modyfikować działanie kancerogenów na tkankę docelową.

SYSTEMY BADAŃ W OCENIE KANCEROGENNOŚCI

Krótkotrwałe badania mutagenności

Krótkoterminowe badania mutagenności zostały opracowane w celu identyfikacji potencjalnie kancerogennych substancji chemicznych na podstawie ich zdolności do powodowania mutacji DNA *in vivo* lub *in vitro*. Większość testów określa mutagenność związków chemicznych jako zamiennik kancerogenności. Wprawdzie testy te są bardzo skuteczne w przewidywaniu działania pośredniego lub bezpośredniego (jeżeli zapewnione jest źródło metaboliczne), ale są nieskuteczne w wykrywaniu kancerogenów niegenotoksycznych.

Badania mutacji genów *in vitro*. Powszechnie wykorzystywanym badaniem krótkoterminowym jest test Ames. Szczepki *Salmonella typhimurium*, pozbawione mechanizmu naprawy DNA i możliwości syntetyzowania histydyny, poddawane są działaniu kilku poziomów dawki badanego związku, po którym ocenia się rewersję do fenotypu pozytywnego wobec histydyny.

Badanie chłoniaka u myszy jest badaniem mutagenności stosowanym w celu określenia, czy substancja chemiczna jest zdolna do wywołania mutacji w komórkach eukariotycznych. Ocenia się ilościowo zdolność hodowli komórkowych do wytworzenia oporności na trifluorotymidynę (wynik mutacji postępowej w *locus* kinazy tymidynowej). Innym badaniem mutacji komórek u ssaków, powszechnie stosowanym w ocenie potencjalnej mutagenności substancji chemicznych, jest test na komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO), w którym jako parametr końcowy wykorzystuje się gen fosfo-

rybozylotransferazy hipoksantyno-guaninowej (HGPRT).

Badania mutacji genów *in vivo*. Badania *in vivo* przynoszą więcej korzyści niż systemy badań *in vitro*, ponieważ uwzględniają wszystkie procesy zachodzące u zwierząt, takie jak wchłanianie, dystrybucja do tkanek, metabolizm i wydalanie substancji chemicznych oraz ich metabolitów. Często używane modele *in vivo* obejmują systemy badań mutacji u gryzoni transgenicznych na podstawie genów operonu *lac*, MutaTMMouse oraz BigBlue[®].

Aby wykryć mutacje będące następstwem narażenia myszy na badane substancje chemiczne, są one analizowane w DNA o dużej masie cząsteczkowej, wyizolowanym z badanej tkanki. Współczynnik mutantów względem całkowitej populacji dostarcza informacji na temat częstości mutacji dla każdej badanej substancji oraz narządu. Systemy badań genotoksyczności *in vivo* są nieprzydatne w identyfikacji związków niegenotoksycznych, niereagujących z DNA.

Zaburzenia chromosomowe. Zmiany w obrębie chromosomów często występują w nowotworach złośliwych. Do oceny zmian chromosomowych można wykorzystać zarówno badania *in vivo*, jak i *in vitro*. Aby ocenić indukcję zmian chromosomowych, komórki pobierane są na etapie pierwszego podziału mitotycznego po rozpoczęciu ekspozycji na daną substancją chemiczną. Komórki wybarwione metodą Giemsy są oceniane pod kątem kompletności kariotypu (21 ± 2 chromosomy). Klasy odnotowywanych anomalii obejmują pęknięcia i delecje terminalne, rearanżacje i translokacje, a także rozwinięte chromosomy oraz komórki zawierające 10 lub więcej aberracji.

Wymiana chromatyd siostrzanych (SCE) to test mierzący uszkodzenie DNA, które związane jest z indukcją mutacji i raka. SCE stanowi odzwierciedlenie wymiany DNA pomiędzy różnymi chromatydami w homologicznych *loci* wewnątrz replikującego się chromosomu. Komórki metafazy drugiego podziału oceniane są pod kątem częstości SCE na komórkę, przy każdej dawce. Przerwanie procesu replikacji DNA lub uszkodzenie chromosomów przez substancje chemiczne może zmienić materiał genetyczny

rozmieszczany w każdym z dwóch potomnych jąder. Materiał genetyczny, który nie ulega inkorporacji do nowego jądra, może wówczas tworzyć własne mikrojądro, które jest dobrze widoczne pod mikroskopem. W badaniu tym zwierzęta poddawane są działaniu substancji chemicznej, po czym – w określonym czasie po narażeniu – określa się częstość występowania komórek zawierających mikrojądra.

Uszkodzenia DNA. Pierwotne uszkodzenie DNA odzwierciedla możliwe zdarzenia przedmutacyjne, które można wykryć przy użyciu hodowli komórek ssaków lub tkanek gryzoni. Nieplanowana synteza DNA (UDS) jest często używanym badaniem sprawdzającym zdolność substancji chemicznej do wywoływania uszkodzenia DNA na podstawie oceny wzrostu naprawy DNA. Pośród dostępnych technik znajduje się pomiar pęknięć nici DNA zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*.

Badania transformacji. W celu oceny potencjału kancerogennego substancji chemicznych rozwinęto różne systemy badań *in vitro*. W badaniach transformacji często wykorzystywana jest linia komórek C3H/10T^{1/2}, która wywodzi się z fibroblastów pobranych z prostaty embrionu myszy C3H. Komórki są zazwyczaj tetraploidalne, lecz mają znacznie zróżnicowaną liczbę chromosomów. Komórki te są chromosomowo anormalne i przeszły już przez niektóre z etapów, które mogą inicjować proces kancerogenezy. Po posianiu komórek, po osiągnięciu wystarczająco wysokiej gęstości (100% konfluencji), przestaną one rosnąć (kontaktowe zahamowanie wzrostu). Niemniej jednak hamowanie kontaktowe nie zawsze jest skuteczne, dochodzi bowiem do narastania warstw komórek tworzących transformowaną kolonię. Dlatego badanie to ocenia potencjał kancerogenności ksenobiotyku na podstawie odsetka transformowanych kolonii.

Najczęściej wykorzystywanym parametrem docelowym w badaniach transformacji komórek jest ocena transformacji morfologicznej fibroblastów ssaków w hodowli komórkowej. Do oceny potencjału kancerogennego substancji chemicznych istnieją też badania transformacji wykorzystujące komórki zarodka chomika sy-

ryjskiego (SHE). Badanie komórek SHE mierzy potencjał kancerogenności ksenobiotyków dzięki ocenie transformowanych kolonii na podstawie kryteriów morfologicznych.

Przewlekłe badania kancerogenności

Badanie przewlekłe (dwuletnie). Dwuletnie badania obejmujące cały okres życia gryzonia pozostają najważniejszą metodą, za pomocą której identyfikuje się substancje fizyczne lub chemiczne potencjalnie szkodliwe dla człowieka. Badania przewlekłe prowadzi się u 50 samców i 50 samic (myszy i szczurów), rozpoczynając je w ósmym tygodniu życia zwierząt. Podawanie dwóch lub trzech poziomów dawki (do maksymalnej tolerowanej dawki, MTD) badanej substancji oraz wehikulum w grupie kontrolnej kontynuuje się przez cały okres życia zwierząt. Podczas badań monitoruje się spożycie pokarmu i przyrost masy ciała, a zwierzęta poddane są regularnej obserwacji klinicznej. W trakcie badania sekcyjnego u każdego zwierzęcia dokładnie ocenia się liczbę zmian nowotworowych, ich umiejscowienie oraz zmiany patologiczne.

Badania narządowo specyficznego działania biologicznego oraz wieloetapowe modele zwierzęce. Podjęto wiele badań tkankowo specyficznych mających na celu opracowanie testów pozwalających na uzyskanie danych w okresie krótszym niż dwuletnie badanie przewlekłe. Badania te są często używane do oceny aktywności kancerogennej substancji chemicznych w różnych narządach docelowych.

Badanie działania kancerogennego na wątrobę. Wątroba stanowi główny narząd docelowy dla kancerogenów chemicznych. Ocenia się, że prawie połowa substancji chemicznych przebadanych w dwuletnim badaniu przewlekłym w ramach National Toxicology Program [Narodowego Programu Toksykologicznego] w USA powoduje zwiększone występowanie raka wątroby. Badania działania kancerogennego na wątrobę zostały rozwinęte w celu oceny i odróżnienia substancji chemicznych, które mają wpływ na etap inicjacji lub promocji hepatokancerogenezy. Testy te umożliwiają ocenę

zdolności badanej substancji do promowania wzrostu zmian przednowotworowych.

Badanie działania kancerogennego na skórę.

Model skóry myszy wykorzystywany jest w celu wnikliwej analizy mechanizmów kancerogenezy, poza tym jest użyteczną próbą biologiczną, trwającą krócej niż klasyczne dwuletnie badania działania kancerogennego. Model ten wykorzystuje wiele wyjątkowych właściwości mysiej skóry, przy czym jedną z największych zalet jest to, że rozwój neoplazji można ocenić wzrokowo. Ponadto liczba i rozmiar brodawek oraz zmian rakowych pozwalają na ocenę postępu rozwoju procesu nowotworowego. Użycie tego modelu pozwala na ocenę zarówno inicjujących, jak i promujących właściwości kancerogenów chemicznych. Zainicjowane komórki skóry są w dużym stopniu podobne do zdrowej skóry. Ostatecznie zróżnicowane komórki skóry nie mogą już przejść cyklu podziału komórkowego, natomiast zainicjowane komórki nadal zachowują zdolność proliferacyjną, reprezentując w ten sposób populację zapoczątkowującą nowotwór. Przy powtarzanej aplikacji promotorów występuje selektywna proliferacja klonów zainicjowanych keratynocytów, powodując powstawanie brodawek, które z czasem mogą przekształcać się w zmiany nowotworowe.

Badanie działania kancerogennego w innych narządach.

Opracowano także systemy oceny zdolności substancji chemicznych do promowania rozwoju nowotworów w innych narządach niż wątroba i skóra. Dostępne systemy obejmują modele zwierzęce skierowane na badanie kancerogenności w płucach, nerkach, pęcherzu moczowym, trzustce, żołądku, jelicie grubym, jelicie cienkim oraz w jamie ustnej. Modele te różnią się użytym kancerogenem inicjującym, częstością, czasem trwania, miejscem zastosowania, a także czasem trwania narażenia na czynnik indukujący promocję.

Zwierzęta transgeniczne w ocenie działania kancerogennego

Do modeli zwierzęcych z modyfikacjami genetycznymi warunkującymi zwiększoną podatność na kancerogenezę indukowaną przez

substancje chemiczne zaliczane są myszy transgeniczne Tg.AC i radH2, a także myszy *knock-out* p53^{+/-} oraz XPA^{-/-}. Możliwość wykorzystania tych modeli zwierzęcych jako badań alternatywnych wobec dwuletnich przewlekłych badań biologicznych była niedawno oceniana przez Health and Environmental Sciences Institute [Instytut Badań Środowiskowo-Zdrowotnych] (HESI), wchodzących w skład International Life Sciences Institute [Międzynarodowego Instytutu Nauk Biologicznych] (ILSI). Wnioski płynące z raportu naukowego sugerują, że modele te są przydatne jako badania przesiewowe w ocenie kancerogenności chemicznej, nie dostarczają jednak ostatecznych dowodów na potencjalne działanie kancerogenne u człowieka. Rada naukowa zaproponowała, aby modele te zastąpiły dwuletnie badania u myszy. Alternatywne modele z wykorzystaniem myszy – łącznie z informacjami dotyczącymi genotoksyczności, a zwłaszcza reaktywności z DNA, zależności między strukturą chemiczną a aktywnością, wyników pochodzących z innych badań i wyników badań mechanistycznych obejmujących toksykokinetykę oraz metabolizmu – wydają się użytecznymi modelami służącymi do oceny kancerogenności związków chemicznych.

KANCEROGENEZA CHEMICZNA U CZŁOWIEKA

Na indukcję powstawania nowotworów u ludzi wpływa wiele czynników. Substancje zakaźne, styl życia, terapie medyczne, a także kontakt

Tabela 8.7. Czynniki kancerogenne związane ze stylem życia

Czynniki	Nowotwór
Aflatoksyny	wątroba
Dieta (tłuszcz, białka, kalorie)	piersi, jelito grube, endometrium, pęcherzyk żółciowy
Napoje alkoholowe	przełyk, wątroba, ustna część gardła, krtań
Palenie tytoniu	jama ustna, gardło, krtań, płuca, przełyk, pęcherz moczowy
Żucie betelu	jama ustna

Tabela 8.8. Czynniki kancerogenne w środowisku zawodowym człowieka

Czynnik	Proces przemysłowy	Nowotwór
Arsen	górnictwo i wytop żelaza	skóra, oskrzela, wątroba
Azbest	budownictwo, kopalnie azbestu	otrzewna, oskrzela
Benzen	przemysł chemiczny	szpik kostny
Benzydyna, beta-naftyloamina	farbiarstwo i przemysł tekstylny	pęcherz moczowy
Beryl	przemysł lotniczy, elektroniczny	oskrzela
Chrom i chromiany	garbarstwo i wytwarzanie pigmentów	zatoki nosowe, oskrzela
Czynniki alkilujące (chlorowodorek mechloroetaminy i bis(chlorometylo)eter)	przemysł chemiczny	oskrzela
Formaldehyd	przemysł tworzyw sztucznych, tekstylny i chemiczny	zatoki nosowe, oskrzela
Kadm	wytop żelaza	oskrzela
Monomer chlorku winylu	przemysł chemiczny	wątroba
Nikiel	rafinacja niklu	zatoki nosowe, oskrzela
Polichlorowane bifenyle	wytwarzanie i konserwacja sprzętu elektronicznego	wątroba
Pył drzewny	meblarstwo	zatoki nosowe
Tlenek etylenu	wytwarzanie materiałów szpitałnych	szpik kostny
Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne	produkcja stali, blacharstwo, kominiarstwo	skóra, moszna, oskrzela

środowiskowy i zawodowy odpowiadają pośrednio i bezpośrednio za większość rodzajów raka obserwowanych u człowieka. Spośród wymienionych najważniejszym czynnikiem mającym wpływ na indukcję i rozwój nowotworów złośliwych u ludzi jest styl życia: użycie tytoniu, picie alkoholu zły sposób odżywiania

się (zob. tab. 8.7). Palenie lub żucie tytoniu oraz stosowanie produktów tytoniowych przeznaczonych do wciągania przez nos może być odpowiedzialne za 25–40% wszystkich rodzajów raka u człowieka. Istnieje szczególnie silny związek między używaniem tytoniu a rakiem jamy ustnej, krtani, płuc, przełyku i pęcherza moczowego. Ocenia się, że 85–90% wszystkich przypadków raka płuc w Stanach Zjednoczonych bezpośrednio wynika ze stosowania tytoniu. Również indukcja raka trzustki wiązana jest z używaniem tytoniu. Spożycie alkoholu przyczynia się do powstania 2–4% raków przełyku, wątroby i krtani.

Nieodpowiednia dieta, narażenie zawodowe i stosowanie chemioterapeutyków odpowiadają za wiele rodzajów raka u ludzi. Pożywienie bogate w tłuszcze i wysokokaloryczne ma związek z rakiem piersi, jelita grubego i pęcherzyka żółciowego. Dieta uboga w przeciwutleniacze i/lub witaminy, np. witaminy A i E, również może przyczyniać się do rozwoju procesu nowotworowego. Sposób przyrządzania posiłków wpływa na powstawanie kancerogenów podczas gotowania. Kancerogenne aminy heterocykliczne oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne wytwarzane są podczas smażenia i grillowania mięsa. Akrylamid, związek podejrzewany o kancerogenność u ludzi, wykryty został w niskich stężeniach w mrożonej żywności. Z rozwojem konkretnych rodzajów raka związane są również pewne zawody, które wymieniono w tabeli 8.8. Do wywołania raka u człowieka przyczynia się również wiele medycznych środków terapeutycznych, a także diagnostycznych (zob. tab. 8.9). Leki immunosupresyjne podawane pacjentom po przeszczepach lub pacjentom z chorobami wtórnymi do innych schorzeń, takich jak nabyty zespół braku odporności (AIDS), powodują zwiększone występowanie wielu różnych nowotworów. Wyniki te podkreślają rolę układu odpornościowego w rozpoznawaniu i usuwaniu wczesnych komórek przednowotworowych z organizmu.

Klasyfikacja czynników kancerogennych dla człowieka

Szacowanie i określanie substancji chemicznej lub mieszanin substancji jako rakotwórczych

Tabela 8.9. Kancerogeny chemiczne związane z terapią i diagnostyką medyczną

Substancja chemiczna lub lek	Nowotwór
Azatiopryna	chłoniak, mięsak siateczkowokomórkowy, skóra, mięsak Kaposiego (?)
Chloramfenikol	białaczka
Czynniki alkilujące (cyklofosfamid, melfalan)	pęcherz moczowy, białaczka
Dietylostilbestrol	pochwa (rak jasnokomórkowy)
Estrogeny	gruczołak wątrobowokomórkowy, endometrium, skóra
Fenacetyna	miedniczki nerkowe (rak)
Fenytoina	chłoniak, nerwiak zarodkowy
Thorotrast	wątroba (naczyniakomięsak)

dla ludzi podlega ocenie różnych agencji na całym świecie. Ocena zazwyczaj obejmuje dane epidemiologiczne, wyniki badań na zwierzętach doświadczalnych oraz analizy testów *in vitro*, co zostało opisane wcześniej w tym rozdziale. Jeden z pierwszych schematów klasyfikacji kancerogenności substancji sporządzony został przez International Agency for Research on Cancer [Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem] (IARC) (zob. tab. 8.10). Podejście przyjęte przez IARC przydziela daną substancję lub mieszaninę substancji do jednej z pięciu grup na podstawie siły dowodów działania kancerogennego dla konkretnego czynnika, czyli możliwą, prawdopodobną lub stwierdzoną rakotwórczość dla człowieka. Podobne klasyfikacje stworzone zostały przez U.S.EPA, Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) oraz Unię Europejską. Klasyfikacja substancji w odniesieniu do rakotwórczości u ludzi może być bardzo trudna, zwłaszcza gdy

Tabela 8.10. Klasyfikacja czynników kancerogennych dla człowieka według IARC

Grupa	Dowody
1. Substancje rakotwórcze dla człowieka	silne dowody z badań na ludziach silne dowody z badań na zwierzętach
2A. Substancje prawdopodobnie rakotwórcze dla człowieka.	dane epidemiologiczne wskazujące na działanie kancerogenne u ludzi pozytywne dane z badań na zwierzętach
2B. Substancje możliwie rakotwórcze dla człowieka	słabe dane epidemiologiczne dotyczące ludzi pozytywne dane z badań na zwierzętach
3. Substancje niemożliwe do zaklasyfikowania jako rakotwórcze dla człowieka	niedostateczne dane z badań na ludziach i zwierzętach
4. Substancje prawdopodobnie nierakotwórcze dla człowieka	negatywne dane z badań na ludziach i zwierzętach

dane uzyskane u zwierząt i/lub dane epidemiologiczne dotyczące człowieka nie są rozstrzygające albo są niejednoznaczne.

BIBLIOGRAFIA

- Shields PG (ed): *Cancer Risk Assessment*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005.
- Tannock IF, Hill RP, Bristow RG, Harrington L (eds): *The Basic Science of Oncology*. New York: McGraw-Hill, 2005.
- Warszawsky D, Landolph JR (eds): *Molecular Carcinogenesis and the Molecular Biology of Human Cancer*. Boca Raton: CRC/Taylor and Francis, 2006.